

Schlussbericht

zu dem IGF-Vorhaben

Entwicklung eines Raman-Detektors für flüssigkeitschromatografische Anwendungen zur Charakterisierung komplexer pharmazeutischer Formulierungen

der Forschungsstelle(n)

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. und

Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Institut für Physikalische Chemie, Arbeitsgruppe für Flüssigphasen-Laserspektroskopie

Das IGF-Vorhaben 17497 N der Forschungsvereinigung Arzneimittelhersteller wurde über die



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



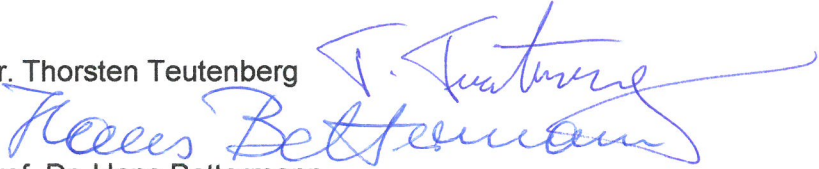
Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Duisburg, 27.8.2014

Düsseldorf, 28.08.2014
Ort, Datum

Dr. Thorsten Teutenberg


Prof. Dr. Hans Bettermann

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	13
Abkürzungen	15
1 Zielstellung des Projektes	19
2 Wissenschaftlich technische Umsetzung	21
2.1 Auswahl der Substanzen und Extrakte.....	21
2.2 Entwicklung eines Verfahrens zur Fraktionierung und Aufreinigung der Extrakte	21
2.2.1 Auswahl einer Methode zur Probenvorbereitung	21
2.2.2 Automatisierung der Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung	24
2.2.3 Säulenwahl bei der automatisierten Festphasenextraktion	29
2.2.4 Anwendungsbeispiel 1: Multimethode für die Untersuchung von Arzneimitteln in Kläranlagenablauf.....	31
2.2.4.1 Voraussetzung	31
2.2.4.2 Integration der automatisierten Festphasenextraktion	31
2.2.4.3 Ergebnisse	31
2.2.4.4 Fazit.....	33
2.2.5 Anwendungsbeispiel 2: Methodenentwicklung für zwei Hormone.....	33
2.2.5.1 Voraussetzung	33
2.2.5.2 Integration der automatisierten Festphasenextraktion	34
2.2.5.3 Ergebnisse	35
2.2.5.4 Fazit.....	38
2.2.6 Anwendungsbeispiel 3: Neonicotinoide.....	38
2.2.6.1 Voraussetzung	38
2.2.6.2 Integration der automatisierten Festphasenextraktion	39
2.2.6.3 Ergebnisse	39
2.2.6.4 Fazit.....	43

2.2.7	Injektion großer Probenvolumina und Anreicherung mittels XLC Modus	43
2.2.8	Möglichkeiten der Kopplung von Online SPE und Raman Detektion	45
2.3	Entwicklung und Anpassung der chromatografischen Methoden.....	47
2.3.1	Methodenentwicklungstools	49
2.3.1.1	Kommerzielle Software-Pakete	49
2.3.1.1.1	DryLab.....	49
2.3.1.1.2	ChromSword	50
2.3.1.2	Akademische Software-Pakete und Tools.....	51
2.3.1.2.1	Nikitas-Tools.....	51
2.3.1.2.2	PREGA.....	52
2.3.2	Chromatografische Messmodi für die HPLC-Raman-Kopplung	54
2.3.3	Generierung der erforderlichen Eingangsdatensätze (Basisdaten).....	56
2.3.3.1	Verwendete Trennsäulen	56
2.3.3.2	Ausgewählte Analytgemische	56
2.3.3.3	Isokratische / Isotherme Basismessungen	57
2.3.3.4	Lösungsmittelgradientenmessungen unter isothermen Bedingungen.....	58
2.3.3.5	Kombinierte Lösungsmittel- und Temperaturgradientenmessungen.....	58
2.3.4	Vergleich und Bewertung der Methodenentwicklungstools	59
2.3.4.1	Isokratische / Isotherme Retentionszeitvorhersagen.....	59
2.3.4.1.1	Retentionszeitvorhersagen auf Grundlage von zwei Messungen in Abhängigkeit des organischen Anteils in der mobilen Phase.....	59
2.3.4.1.2	Retentionszeitvorhersagen auf Grundlage von drei oder mehr Messungen in Abhängigkeit des organischen Anteils in der mobilen Phase	61
2.3.4.2	Retentionszeitvorhersagen in Abhängigkeit von Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen	65
2.3.4.3	Retentionszeitvorhersagen in Abhängigkeit von Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen	67
2.3.4.4	Retentionszeitvorhersagen in Abhängigkeit kombinierter Lösungsmittel- und Temperaturgradienten.....	69
2.3.5	Handhabung der Methodenentwicklungstools.....	71
2.3.6	Hinweise zur Methodenentwicklung im Kontext der HPLC-Raman-Kopplung	72

2.3.6.1	Allgemeine Hinweise zur Anwendung von Methodenentwicklungs-Software	72
2.3.6.2	Isokratische / Isotherme Simulationen.....	72
2.3.6.3	Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen.	73
2.3.6.4	Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen.....	73
2.3.6.5	Kombinierte Lösungsmittel- und Temperaturgradienten	73
2.4	Herstellung von Metall-Kolloid-Lösungen	74
2.4.1	Herstellung von Metall-Kolloiden mittels Laserablation	75
2.4.2	Synthese von Silber-Kolloiden in Wasser.....	76
2.4.3	Synthese von Silber-Kolloiden in organischen Lösungsmitteln	77
2.5	Modifikation des bestehenden Raman-Detektors für das SERS-Experiment	78
2.5.1	Statische SERS-Messungen in einer Probenkammer.....	79
2.5.2	Dynamische SERS-Messungen im Durchfluss - Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt	79
2.5.3	Online Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt.....	81
2.6	Charakterisierung der Metall-Kolloid-Lösungen	83
2.6.1	Beurteilung der verwendeten Metallart der Kolloide hinsichtlich der genutzten Anregungswellenlänge	83
2.6.2	Kinetik des SERS-Effektes (Adsorptions- und Agglomerationszeiten).....	86
2.6.2.1	Reihenfolge der Substanzzufuhr	87
2.6.2.1.1	Agglomeration	88
2.6.2.1.2	Konkurrenz	88
2.6.2.1.3	Adsorption	88
2.6.2.2	Adsorptionszeiten des Analyten an der Kolloidoberfläche	89
2.6.2.3	Agglomerationszeiten von Metall-Kolloiden bei Zugabe eines Elektrolyten	90
2.6.3	Langzeitstabilität bei Lagerung der Metall-Kolloide	91
2.7	Verwendung organischer Lösungsmittel als mobile Phase	92
2.8	Optimierung des Raman-Detektors	93
2.8.1	Entwicklung einer Lichtkoppeloptik mit wechselbarem Inlay	93
2.8.2	Beschichtung des Einkoppelfensters mit Teflon AF	96
2.9	SERS-Messergebnisse	98

2.9.1	Überprüfung allgemeiner SERS-Aktivitäten an ausgewählten Modellsubstanzen	98
2.9.2	SERS-Messungen im Durchfluss - Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt.....	99
2.9.3	SERS-Messungen im Durchfluss - Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt	103
2.10	Kopplung des Raman-Detektors mit UV und MS-Detektion.....	107
3	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse.....	112
3.1.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrages.....	112
3.1.2	Alternative Anreicherungstechniken und Anwendung der Online Festphasenextraktion	113
3.1.3	Chromatografische Methodenentwicklung	113
3.1.4	Raman-Spektroskopie	114
3.2	Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der Ergebnisse – Innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten.....	115
3.2.1	Alternative Anreicherungstechniken und Anwendung der Online Festphasenextraktion	115
3.2.2	Chromatografische Methodenentwicklung	116
3.2.3	Raman-Spektroskopie	116
3.3	Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft	118
3.3.1	Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses.....	118
3.3.2	Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA.....	118
3.3.3	Wissenschaftliche Publikationen wie Dissertationen und Beiträge in Fachzeitschriften	118
3.3.4	Vorstellung der Ergebnisse durch Vorträge und Posterpräsentationen	119
3.3.5	Übernahme der Ergebnisse in die akademische Lehre oder berufliche Weiterbildung	119
3.3.6	Bau eines Demonstrators bzw. Funktionsmusters	119
3.3.7	Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen	120

4	Literatur	122
5	Anhang	126
5.1	Übersicht der ausgewählten Substanzen	126
5.2	Messparameter der Multimethode in Anwendungsbeispiel 1 (Kapitel 2.2.4).....	127
5.3	Zusätzliche Daten zu den Retentionszeitvorhersagen	129
5.4	Weiterführende Informationen zu den Raman- und SERS-Messungen.....	131
5.5	Technische Zeichnung der Lichtkoppeloptik	133
5.6	Versuchsvorschriften zur Synthese von Silber-Kolloiden	134
5.6.1	Synthese nach Lee-Meisel	135
5.6.2	Synthese nach Leopold-Lendl	135
5.6.3	Synthese nach Zou-Dong.....	135
5.6.4	Silber-Kolloide nach Lee-Meisel mit anteilig organischem Lösungsmittel	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Allgemeine Vorgehensweise bei der Probenaufbereitung mittels Disposable Pipette Extraction (DPX) [3].	22
Abbildung 2-2:	Aufreinigung eines stark verunreinigten Hausstaubextraktes durch die Disposable Pipette Extraction (DPX) in mehreren Einzelschritten (A - D).	22
Abbildung 2-3:	Screening von 45 Arzneimittelwirkstoffen in Kläranalgenablauf mittels a) HPLC-MS und b) Offline SPE und HPLC-MS. BG = Bestimmungsgrenze.	23
Abbildung 2-4:	Kalibrationsgeraden von Carbamazepin in Klärschlamm ohne Aufreinigung (schwarz), nach Festphasenextraktion (rot) und nach Nanofiltration (grün).	23
Abbildung 2-5:	Symbiosis™ Pico Einheit mit Beschreibung der einzelnen Komponenten [4].	24
Abbildung 2-6:	Online SPE Kartusche (HySphere C-18).	25
Abbildung 2-7:	Gegenüberstellung der Einzelschritte von Offline und Online SPE. In Anlehnung an [6].	26
Abbildung 2-8:	Darstellung der drei Betriebsmodi der Symbiosis™ Pico Einheit, a) LC Modus, b) XLC mit Gradientenelution und c) XLC mit HPD-Fokussierung. In gelb unterlegt ist der jeweilige Flussweg beim Elutionsschritt. Weitere Erläuterungen im Text. HPD = Hochdruckspritzenpumpe, ACE = automatisierter Kartuschenwechsler, MS = Massenspektrometer, EDV = elektronische Datenverarbeitung [7].	27
Abbildung 2-9:	Schematischer Aufbau unterschiedlicher HPLC-Säulentypen.	30
Abbildung 2-10:	Messung von 45 Arzneimittelwirkstoffen, 4 Metaboliten und einem Hormon mittels HPLC-MS/MS. Betrieb des Sybiosis™ Pico Systems im LC Modus. $\beta = 100 \text{ ng mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,4 mL min ⁻¹ ; Lösungsmittelgradient: 1 % B auf 99 % B mit 6,3 % B min ⁻¹ ; Temperatur: 50 °C; Injektionsvolumen: 40 μL .	32
Abbildung 2-11:	Messung von 45 Arzneimittelwirkstoffen, 4 Metaboliten und einem Hormon mittels Online SPE HPLC-MS. Betrieb des Sybiosis™ Pico Systems im XLC Modus mit Gradientenelution. $\beta = 100 \text{ ng mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,4 mL min ⁻¹ ; Lösungsmittelgradient: 1 % B auf 99 % B mit 6,3 % B min ⁻¹ ; Temperatur: 50 °C; Injektionsvolumen: 40 μL .	32

Abbildung 2-12:	Strukturen der Hormone 17 β -Estradiol (E2) und 17 α -Ethinylestradiol (EE2).....	34
Abbildung 2-13:	Reaktion von 17 β -Estradiol (E2) mit Dansylchlorid (DANS) unter Abspaltung von Salzsäure (HCl) in 0,1 M Natriumcarbonat/Natriumhydroxid Lösung bei pH 10 zu dem Derivat 17 β -Estradiol-Dansylchlorid.....	36
Abbildung 2-14:	Vergleich zweier Chromatogramme von 17 β -Estradiol zum einen nativ als [M-H ₂ O] ⁺ (<i>m/z</i> 255 $\rightarrow$ 159) und zum anderen derivatisiert als 17 β -Estradiol-Dansylchlorid (<i>m/z</i> 506 $\rightarrow$ 171) gemessen. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μ m); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 2 mM Ammoniumacetat, B: Methanol mit 2 mM Ammoniumacetat; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Lösungsmittelgradient: 20 % B auf 95 % B mit 12,5 % B min ⁻¹ ; Temperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 50 μ L.	37
Abbildung 2-15:	Trennung von sechs Neonicotinoiden, Konzentration: β = 10 ng mL ⁻¹ . Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μ m); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 100 % B mit 13,6 % B min ⁻¹ ; Temperatur: 30 °C; Injektionsvolumen: 50 μ L.	40
Abbildung 2-16:	Wiederfindungsraten von Thiocloprid und Thiamethoxam nach automatisierter Anreicherung im XLC Modus mit Gradientenelution auf unterschiedlichen Festphasenmaterialien. Der Bereich zwischen den schwarzen, gestrichelten Linien markiert eine zufriedenstellende Wiederfindung von 80 – 120 %.....	41
Abbildung 2-17:	Anreicherung von sechs Neonicotinoiden mittels Online SPE mit C-18 Festphasenmaterial, Konzentration β = 0,5 ng mL ⁻¹ . Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μ m); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 100 % B mit 13,6 % B min ⁻¹ ; Temperatur: 30 °C; Injektionsvolumen: 1000 μ L.	42
Abbildung 2-18:	Chromatogramm der Fluorquinolone Ofloxacin (grün) und Ciprofloxacin (blau) im XLC Modus mit Gradientenelution. Online SPE über HySphere C-18, Konzentration β = 1 ng L ⁻¹ . S/N = Signal-zu-Rausch-Verhältnis. NWG = Nachweisgrenze. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μ m); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min ⁻¹ ; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 50 % B mit 4,5 % B min ⁻¹ ; Temperatur: 50 °C; Injektionsvolumen: 10 mL.	44

Abbildung 2-19:	Chromatografische Trennung von vier Arzneimitteln unterschiedlicher Polaritätsbereiche und Online SPE Anreicherung auf einer HySphere C-18 Kartusche. Konzentration $\beta = 1 \text{ ng L}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min^{-1} ; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 99 % B mit 9,8 % B min^{-1} ; Temperatur: 50 °C; Injektionsvolumen: 10 mL.	45
Abbildung 2-20:	Übersicht der bevorzugten chromatografischen Messmodi für die HPLC-Raman-Kopplung.	54
Abbildung 2-21:	Vergleich der durch die Softwarepakete vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Sulfonamide für a) 40 °C und 90/10 (v/v), b) 40 °C und 80/20 (v/v), c) 50 °C 90/10 (v/v), d) 50 °C und 80/20 (v/v). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters Acquity C-18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril mit jeweils 0,1 % Ameisensäure, a, c) 90/10 (v/v), b, d) 80/20 (v/v). Temperatur: a, c) 40 °C, b, d) 50 °C. Basismessungen für die Retentionsvorhersage: a, b) 95/5 (v/v), 85/15 (v/v) bei 40 °C und c, d) bei 50 °C.	60
Abbildung 2-22:	Vergleich der durch die Softwarepakete vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Sulfonamide für a) 40 °C und 90/10 (v/v), b) 70 °C und 90/10 (v/v). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters Acquity C-18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril mit jeweils 0,1 % Ameisensäure. Basismessungen für die Retentionsvorhersage: 95/5 (v/v) ACN, 85/15 (v/v) ACN, 75/25 (v/v) ACN bei a) 40 °C und b) 70 °C.	61
Abbildung 2-23:	Verlauf des logarithmischen Retentionsfaktors von N-Acetylsulfamethazin in Abhängigkeit des Acetonitrilanteils in der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters Acquity BEH C-18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril mit jeweils 0,1 % Ameisensäure; Temperatur: 40 °C.	63
Abbildung 2-24:	Vergleich der durch die Softwaretools DryLab, ChromSword und PREGA vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK in Abhängigkeit eines Lösungsmittelgradienten bei 40 °C und 80 °C. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C-18 (50 x 2,1 mm; 2,5 μm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril.	66

Abbildung 2-25:	Vergleich der durch DryLab und PREGA vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK in Abhängigkeit von Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C-18 (50 × 2,1 mm; 2,5 µm); mobile Phase: 45/55 (v/v) Wasser/Acetonitril. Vorhergesagt wurden Temperaturgradienten von 10 °C auf 150 °C in 15 min, 20 min und 25 min.	68
Abbildung 2-26:	Vergleich der durch PREGA vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK in Abhängigkeit simultaner Lösungsmittel- und Temperaturgradienten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C-18 (50 × 2,1 mm; 2,5 µm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril.	70
Abbildung 2-27:	Schematische Darstellung des verwendeten Raman-Spektrometers [73]. * Zur Messung der Probe kann eine Quarzglasküvette, eine Edelstahlplatte mit Probenmulde oder eine Lichtkoppeloptik mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter adaptiert werden.	78
Abbildung 2-28:	links: Raman-Messung in einer Quarzglasküvette, rechts: Raman-Messung auf Edelstahlplatte mit Probenmulde [74].	79
Abbildung 2-29:	links: Raman-Messung im Durchfluss "ohne" Flüssigkern-Lichtwellenleiter, rechts: Raman-Messung im Durchfluss "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].	80
Abbildung 2-30:	Schematische Darstellung der Online Zusammenführung von Metall-Kolloid, Analyt und Elektrolyt im Durchfluss mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].	81
Abbildung 2-31:	Online Zusammenführung von Metall-Kolloid, Analyt und Elektrolyt im Durchfluss [71].	82
Abbildung 2-32:	SERS-Spektrum von Nilblau mit Particular Gold-Kolloiden (50 bis 70 nm).	84
Abbildung 2-33:	SERS-Spektrum von Nilblau mit Particular Silber/Gold-Kolloiden (50 bis 70 nm).	85
Abbildung 2-34:	SERS-Spektrum von Nilblau mit Particular Silber-Kolloiden (50 bis 70 nm).	86
Abbildung 2-35:	SERS-Spektren von Koffein bei verschiedenen Reihenfolgen der Zusammenmischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt. Messung mit Quarzglasküvette (siehe Kapitel 2.5.1) bei Endkonzentrationen von $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Mit Kolloid LL-80 bei einer Laserleistung von 70 mW und einer Ausleserate von 1 Hz [74].	87
Abbildung 2-36:	Reihenfolge der Substanzzusammenführung: Der Analyt wird einem zuvor angesetzten Elektrolyt-Kolloid-Gemisch zugegeben [74].	88
Abbildung 2-37:	Reihenfolge der Substanzzusammenführung: Der Elektrolyt wird einem zuvor angesetzten Analyt-Kolloid-Gemisch zugegeben [74].	89

Abbildung 2-38:	Auftragung der SERS-Signalintensitäten der Koffein-Bande bei 1253 cm^{-1} gegen die Adsorptionszeit. Normiert auf die Intensität der ersten Messung bei 0 Sekunden ohne Adsorptionszeit. Messung mit Edelstahlplatte bei Endkonzentrationen von $3,3 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$. Mit Kolloid LL-80 bei einer Laserleistung von 750 mW und einer Ausleserate von 1 Hz [74].	90
Abbildung 2-39:	SERS-Spektren von Koffein in Wasser (schwarzer Kurvenverlauf) und einem 50/50 (v/v) Wasser/Methanol-Gemisch (roter Kurvenverlauf). Messung mit Edelstahlplatte bei einer Endkonzentration von $3,3 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$. Mit Kolloid ZD-60, bei einer Laserleistung von 750 mW und einer Aufnahmezeit von 1 Hz [74].	92
Abbildung 2-40:	Explosionszeichnung der Lichtkoppeloptik mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].	94
Abbildung 2-41:	Schnittzeichnung der Lichtkoppeloptik mit Inlay (oben) und Außenfassung (unten) [71].	95
Abbildung 2-42:	Verschiedene Inlay-Materialien für die Lichtkoppeloptik [71].	95
Abbildung 2-43:	Partikelabscheidung auf dem Einkoppelfenster (Lichtmikroskop-Aufnahme) [71].	97
Abbildung 2-44:	Konzentrationsabhängige SERS-Messungen von Adenin im Durchfluss "ohne" Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].	100
Abbildung 2-45:	SERS-Chromatogramm bei Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt [71].	101
Abbildung 2-46:	Konzentrationsabhängige SERS-Messungen von Adenin im Durchfluss "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].	102
Abbildung 2-47:	SERS-Messungen von Adenin im Durchfluss "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter und Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt [71].	104
Abbildung 2-48:	SERS-Chromatogramme: Vergleich Vormischung vs. Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt [71].	105
Abbildung 2-49:	Darstellung der Belegung der SERS-Messzelle durch die Abscheidung von Metall-Kolloiden [71].	106
Abbildung 2-50:	UV-Beispielchromatogramm für die Trennung von 12 Zytostatika. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Agilent Zorbax SB C-18 ($50 \times 2,1\text{ mm}$, $1,8\text{ }\mu\text{m}$); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: $0,35\text{ mL min}^{-1}$; Lösungsmittelgradient: 1 % B auf 99 mit $9,8\text{ % B min}^{-1}$; Temperatur: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; Injektionsvolumen: $2\text{ }\mu\text{L}$. Analyten: 1) 5-Fluorouracil, 2) Gemcitabin, 3) Doxorubicin, 4) Epirubicin, 5) Methotrexat, 6) Etoposid, 7) Ifosfamid, 8) Cyclophosphamid, 9) Topotecan, 10) Irinotecan, 11) Docetaxel, 12) Paclitaxel.	108
Abbildung 2-51:	Raman-Spektren von Ifosfamid und Cyclophosphamid.	109
Abbildung 2-52:	Raman-Spektren von Topotecan und Irinotecan.	110
Abbildung 2-53:	SERS-Spektren von Topotecan und Irinotecan.	111

Abbildung 5-1:	Technische Zeichnung der Lichtkoppeloptik.....	133
Abbildung 5-2:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Synthese der Silber-Kolloide [72].....	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Auswahl kommerziell verfügbarer Festphasenadsorbentien für die Online SPE.	29
Tabelle 2-2:	Vergleich der linearen Arbeitsbereiche bei Messung der Hormone 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol ohne automatisierte Festphasenextraktion (LC Modus) bei einem Injektionsvolumen von 50 μ L und mit automatisierter Festphasenextraktion (XLC Modus) bei einem Injektionsvolumen von 1.000 μ L.	35
Tabelle 2-3:	Vergleich der Bestimmungsgrenzen einer nativen Messung und nach Derivatisierung mit Dansylchlorid. Anreicherung von 1 L Probe mittels Offline SPE vor der HPLC-MS Messung mit einem Injektionsvolumen von 50 μ L.	37
Tabelle 2-4:	Auflistung der Massenübergänge zur massenspektrometrischen Detektion der sechs untersuchten Neonicotinoide. Q1 = Massenübergang zur Quantifizierung. Q3 = Massenübergang zur Verifizierung.	39
Tabelle 2-5:	Bestimmungsgrenzen (BG) von sechs Neonicotinoiden im LC Modus und im XLC Modus mit integrierter Online SPE.	42
Tabelle 2-6:	Vergleich der Software-Programme DryLab, ChromSword, Nikitas und PREGA anhand einer Methodenmatrix. Hierbei bedeuten: ✓: eine Vorhersage ist mit den Datensätzen möglich, - : eine Vorhersage ist nicht möglich, (✓): eine Vorhersage ist mit der neuen Version DryLab 2010 Version 4.0 möglich, ✓*: Vorhersage ist möglich, es werden zusätzliche Gradientendaten benötigt.	55
Tabelle 2-7:	Verwendete Trennsäulen zur Aufnahme der erforderlichen Basisdaten.	56
Tabelle 2-8:	Auflistung der Substanzen der verwendeten Testgemische.	57
Tabelle 2-9:	Metall-Kolloide, die mittels Laserablation hergestellt wurden.	75
Tabelle 2-10:	Synthetisierte Silber-Kolloide in Wasser, die eine besonders hohe SERS-Aktivität zeigen.	76
Tabelle 2-11:	Synthetisierte Silber-Kolloide in 50/50 (v/v) Wasser/Lösungsmittel-Gemischen mit hoher SERS-Aktivität.	77
Tabelle 2-12:	Getestete Materialien als Inlay für die Lichtkoppeloptik.	96
Tabelle 2-13:	Substanzen, bei denen eine SERS-Aktivität beobachtet wurde und Bewertung der relativen SERS Intensitäten mit: +++ sehr stark, ++ mittel, + schwach.	98
Tabelle 2-14:	Messparameter für SERS-Messungen im Durchfluss "ohne" und "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter.	99
Tabelle 2-15:	Bestimmung der SERS-Erfassungsgrenze im Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71,72].	103

Tabelle 3-1:	Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen.	120
Tabelle 5-1:	Übersicht der ausgewählten Substanzen.	126
Tabelle 5-2:	Liste der untersuchten Arzneimittelwirkstoffe in Kläranlagenablauf mit den zugehörigen Massenübergängen zur Quantifizierung (Q1).....	127
Tabelle 5-3:	Vergleich der relativen Fehler in % der vorhergesagten (vorh.) Retentionszeiten (RT) bestimmt durch die Programme mit den experimentell (exp.) bestimmten Retentionszeiten. Vorhersagen basierten auf den chromatografischen Läufen 40 °C und 5% B sowie 15% B.	129
Tabelle 5-4:	Vergleich der relativen Fehler in % der vorhergesagten (vorh.) Retentionszeiten bestimmt durch die Programme mit den experimentell (exp.) bestimmten Retentionszeiten. Vorhersagen basierten auf den chromatografischen Läufen 40 °C und 5% B sowie 15% B und 25% B bzw. 70 °C und 5% B sowie 15% B und 25% B.	129
Tabelle 5-5:	Ausgewählte Substanzen, die auf einen SERS-Effekt hin untersucht wurden.	131
Tabelle 5-6:	Verwendete Chemikalien zur Silber-Kolloid-Synthese.	135

Abkürzungen

Griechische Formelzeichen

β	Massenkonzentration
φ	Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase

Lateinische Formelzeichen

a, b, c	Regressionsparameter
c_1, c_2, c_3, c_4	Fitparameter
DG	Energie der Interaktion zwischen dem Stoff und Wasser
k	Retentionsfaktor
k_w	extrapolierter Retentionsfaktor für Wasser als mobile Phase
l	Länge
ln	natürlicher Logarithmus
log	dekadischer Logarithmus
Q	Flussrate / Gesamtflussrate
R^2	Bestimmtheitsmaß
S	Konstante für einen gegebenen gelösten Stoff
t	Zeit / Durchflusszeit
T	Temperatur in Kelvin
V	Volumen / Innenvolumen
V_{mol}	molekulares Volumen des gelösten Stoffes

Abkürzungen

%	Prozent
(v/v)	Volumenanteil
$[M-H_2O]^+$	Molekülion-Dehydrat
°	Grad (Winkel)
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter

µm	Mikrometer
Å	Ångström
a.u.	absorption units
ACE	automated cartridge exchanger (automatisierter Kartuschenwechsler)
ACN	Acetonitril
Ag	Argentum (Silber)
Alu	Aluminium
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
Au	Aurum (Gold)
BG	Bestimmungsgrenze
bzw.	beziehungsweise
C-18	Octadecan
ca.	circa
CAMD	computer aided method development (Computerunterstützte Methodenentwicklung)
CAS	Chemical Abstracts Service
CCD	charge-coupled device (ladungsgekoppeltes Bauteil)
cm	Zentimeter
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
cps	counts per second
CRF	Chromatographic Response Function (chromatografische Antwortfunktion)
d. h.	das heißt
DANS	Dansylchlorid
DLS	Dynamic Light Scattering (dynamische Lichtstreuung)
DM	Data Manager
DPX	Disposable Pipette Extraction
E2	17β-Estradiol
E2-DANS	17β-Estradiol-Dansylchlorid
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EE2	17α-Ethinylestradiol
ESI	Elektrospray Ionisierung
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FEP	Fluorethylenpropylen
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDP	high pressure dispensor pump (Hochdruckverdünnungs- spritzenpumpe)
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HLB	Hydrophilic liquid balance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatografie)
HT-HPLC	High Temperature - High Performance Liquid Chromatography (Hochtemperatur-Hochleistungsflüssig- chromatografie)
Hz	Hertz
ID	Innendurchmesser
IGF	Industrielle Gemeinschaftsforschung
IUTA	Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
KCl	Kaliumchlorid
Konz.	Konzentration
L	Liter
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatografie)
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
Lsg.	Lösung
LSS	linear-solvent-strength
M	Mol
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mol	Mol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
mSPE	multidimensionale SPE
mW	Milliwatt
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
NWG	Nachweisgrenze(n)
o. g.	oben genannte/n/s
OPT	Optimization Module
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PEEK	Poly-ether-ether-keton
PET	Polyethylenterephthalat
PE-UHMW	Polyethylene (ultra high molecular weight)
pg	Pikogramm
pH	Potentium Hydrogenium
PMMA	Polymethylmethacrylat
Prof.	Professor
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q1	Massenübergang zur Quantifizierung
Q3	Massenübergang zur Verifizierung
QSRR	quantitative structure-retention relationship
rel.	relativ(e)
s	Sekunde(n)
S/N	Signal-to-Noise
SERS	Surface-enhanced Raman spectroscopy/scattering
sMRM	Scheduled Multiple Reaction Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
Teflon-AF	Teflon - Amorphous Fluoroplastics
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Ultrahochleistungsflüssigchromatografie)
UQN	Umweltqualitätsnorm
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
WFR	Wiederfindungsrate(n)
z. B.	zum Beispiel

1 Zielstellung des Projektes

In vielen Bereichen der Lebenswissenschaften (Life Sciences), und hier insbesondere im Bereich der pharmazeutischen Analytik, ist die Charakterisierung, Identifizierung und Quantifizierung von Leitsubstanzen und deren Metabolite eine der Herausforderungen für die zukünftigen Forschungsaktivitäten sowie die Routineanalytik. Hierbei müssen immer komplexere Substanzgemische, die häufig Hunderte von Einzelkomponenten enthalten, analysiert werden. Dies stellt extreme Anforderungen an die chromatografischen Verfahren bzw. an die entsprechenden Detektionstechniken. In den Life Sciences haben sich hochauflösende Massenspektrometer etabliert, welche ansatzweise eine Strukturaufklärung unbekannter Metabolite ermöglichen. Allerdings stößt auch die Massenspektrometrie bei strukturell ähnlichen Komponenten immer wieder an ihre Grenzen, wenn z. B. isobare Komponenten detektiert werden. Isobare Störungen treten immer dann auf, wenn Ionen mit demselben Masse-zu-Ladungsverhältnis detektiert werden. Einfache Massenspektrometer, die z. B. nur die Aufnahme des Molekülionenpeaks erlauben, lassen dann keine eindeutigen Rückschlüsse auf die detektierte Verbindung zu. In diesem Fall muss auf komplexere und teurere Systeme auf Basis von Triple-Quadrupol-Geräten oder Flugzeitmassenspektrometern mit hoher Auflösung zurückgegriffen werden. Allerdings stellen diese Geräte hohe Anforderungen an die Qualifikation des Anwenders. Insbesondere die Interpretation komplexer Massenspektren setzt ein hohes Expertenwissen voraus. Nicht vergessen werden darf, dass z. T. erhebliche Investitions- und Wartungskosten bei der Beschaffung und dem Betrieb dieser Geräte entstehen.

Demgegenüber stehen viele Verfahren wie die UV-Detektion, die als kostengünstige und einfache Methoden in jedem Laboratorium, welches flüssigkeitschromatografische Analysen durchführt, vorhanden sind. Nachteile ergeben sich hier eindeutig in der gegenüber modernen Massenspektrometern höheren Bestimmungsgrenze und ungenügenden Identifikationsmöglichkeiten, da sich die UV-Spektren strukturell verwandter Komponenten oft nur geringfügig voneinander unterscheiden. Insbesondere im Konzentrationsbereich nahe der Bestimmungsgrenze werden keine aussagekräftigen Spektren erhalten.

Die pharmazeutische Analytik verfolgt daher das Ziel, so genannte Multidetektions-Systeme zu verwenden, wobei auf die Kompatibilität zwischen den einzelnen Detektionssystemen geachtet werden muss. Der Grad der Kopplung hängt dann lediglich von den finanziellen und personellen Ressourcen des Unternehmens ab und lässt sich beliebig erweitern. Die Integration eines Raman-Detektors in bestehende Multidetektions-Systeme für flüssigkeitschromatografische Anwendungen kann deshalb als ideale Ergänzung zu den bereits etablierten Detektionstechniken betrachtet werden. Die Raman-Spektroskopie kann z. B. ein Massenspektrometer ersetzen, wenn wenige Zielanalyten quantifiziert werden müssen und die zu erfassenden Komponenten nicht durch ihr UV-Spektrum identifiziert werden können. Die Raman-

Spektroskopie kann jedoch auch in Kombination mit der Massenspektrometrie eingesetzt werden, wenn die Struktur unbekannter Metabolite aufgeklärt werden muss.

Das IGF-Vorhaben „Entwicklung eines Raman-Detektors für flüssigchromatografische Anwendungen zur Charakterisierung komplexer pharmazeutischer Formulierungen“ stellt das Nachfolgeprojekt zum Vorhaben „Entwicklung eines flüssigkeitschromatografischen Analyseverfahrens zur Struktur- und Identitätsaufklärung mittels gekoppelter Raman/IRMS Detektoren“ dar, das seitens des IUTA, des Instituts für Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und dem Bereich Instrumentelle Analytische Chemie der Universität Duisburg-Essen bearbeitet wurde. In diesem Vorhaben wurde ein Raman-Detektor entwickelt, der mittels Strukturaufklärung die qualitative Analyse in wässriger Lösung vorliegender Substanzen erlaubt. Zudem ist eine quantitative Bestimmung der Substanzen aufgrund der linearen Beziehung zwischen Konzentration und Streulicht-Intensität mit Hilfe der Raman-Spektroskopie ebenso möglich. Damit können mit diesem Detektor – wie auch mit einem Massenspektrometer – Substanzen erfasst werden, die mittels Hochtemperatur-Flüssigchromatografie aus einem komplexen Gemisch abgetrennt wurden.

Ziel des Vorhabens „Entwicklung eines Raman-Detektors für flüssigchromatografische Anwendungen zur Charakterisierung komplexer pharmazeutischer Formulierungen“ ist es nun, die Nachweisstärke des Raman-Detektors durch Ausnutzung der Oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS: surface enhanced Raman scattering) so zu verbessern, dass er in bestehende Analytikkonfigurationen integriert werden kann. Als Proben kommen pharmazeutische Mischungen zum Einsatz, die mittels einer vollautomatisierten Festphasenextraktion (SPE) im Sinne einer Teilfraktionierung aufgearbeitet und sodann mit Hilfe einer Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie aufgetrennt werden. Dabei wird angestrebt, den Zusatz organischer Modifier zur mobilen Phase möglichst gering zu halten, um eine störungsfreie Detektion mittels Raman-Spektroskopie zu gewährleisten.

2 Wissenschaftlich technische Umsetzung

2.1 Auswahl der Substanzen und Extrakte

Innerhalb des Arbeitspaketes erfolgte die gemeinsame Abstimmung, welche Substanzen für die im Rahmen des Projektes geplanten Untersuchungen verwendet werden sollen. Diese sind in Tabelle 5-1 im Anhang aufgelistet.

2.2 Entwicklung eines Verfahrens zur Fraktionierung und Aufreinigung der Extrakte

2.2.1 Auswahl einer Methode zur Probenvorbereitung

Aufreinigung und Anreicherung der Extrakte sind entscheidend, um die im Projekt vorgesehene Kopplung mit der Raman Detektion voranzutreiben. Aus der Vielzahl technischer Lösungsansätze ist das Verfahren der Festphasenextraktion (SPE) vielerorts am besten etabliert [1,2]. Ein alternatives Verfahren stellt die Disposable Pipette Extraction (DPX) dar. Der Arbeitsablauf für diese Methode ist in Abbildung 2-1 dargestellt. Dabei erfolgen die Wechselwirkungen ähnlich wie bei der SPE über ein Festphasenmaterial, das aber innerhalb einer Pipettenspitze zwischen zwei Fritten frei beweglich ist und so einen größtmöglichen Stoffaustausch ermöglicht. Die Pipettenspitze wird üblicherweise nach einmaliger Anwendung entsorgt, so dass das Risiko von Kreuzkontaminationen zwischen verschiedenen Proben ausgeschlossen wird.

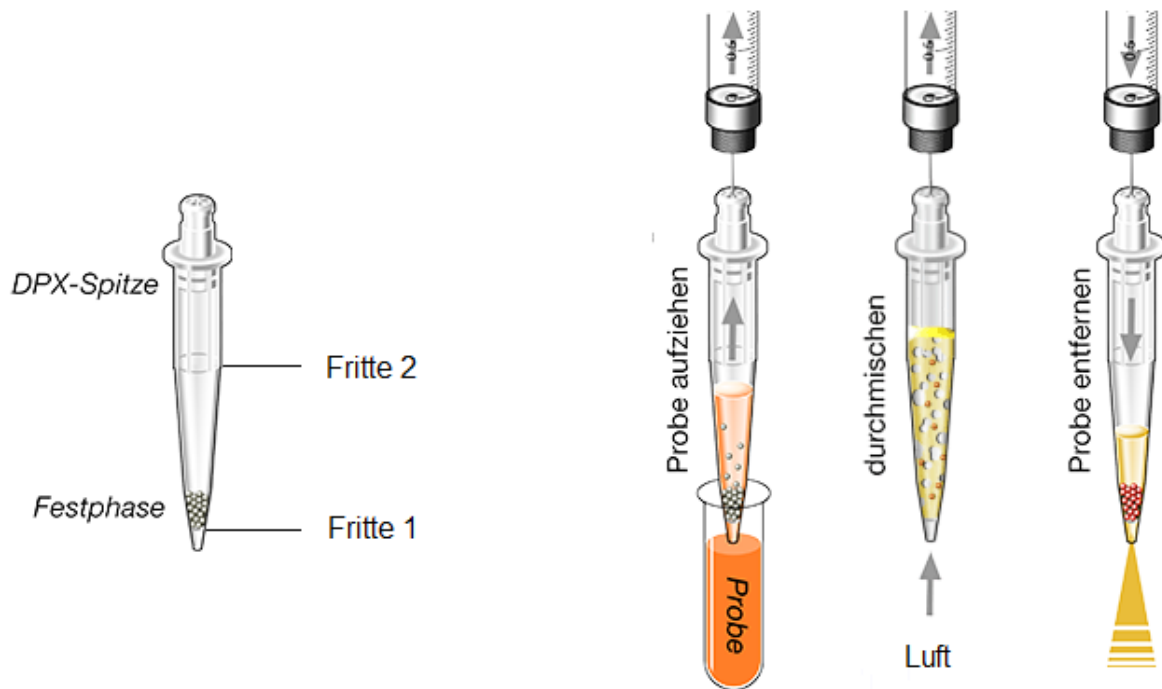


Abbildung 2-1: Allgemeine Vorgehensweise bei der Probenaufbereitung mittels Disposable Pipette Extraction (DPX) [3].

Vorversuche mit der DPX-Technologie ergaben, dass dieses Verfahren gut zur Aufreinigung grob verunreinigter Proben zu verwenden ist. Dies ist in Abbildung 2-2 verdeutlicht, in der ein stark verunreinigter Hausstaubextrakt über mehrere Schritte (A - D) mittels DPX aufgereinigt wurde.

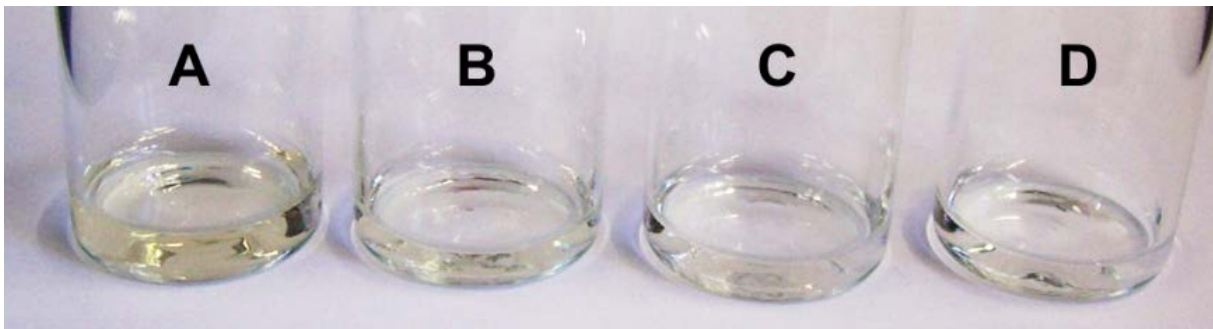


Abbildung 2-2: Aufreinigung eines stark verunreinigten Hausstaubextraktes durch die Disposable Pipette Extraction (DPX) in mehreren Einzelschritten (A - D).

Dennoch zeigten sich bei Anwendung der DPX-Pipetten Schwächen in der Anreicherung großer Probenvolumina. Daher ist dieses Verfahren für die im Projekt vorgesehene Anwendung nicht ideal geeignet.

Vergleichend wurde das Potential der SPE für den Anwendungszweck der Anreicherung und Aufreinigung im Kontext dieses Projektes geprüft. Die Substanzen wurden über eine HPLC-

MS Kopplung chromatografisch getrennt und detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-3 und Abbildung 2-4 dargestellt.

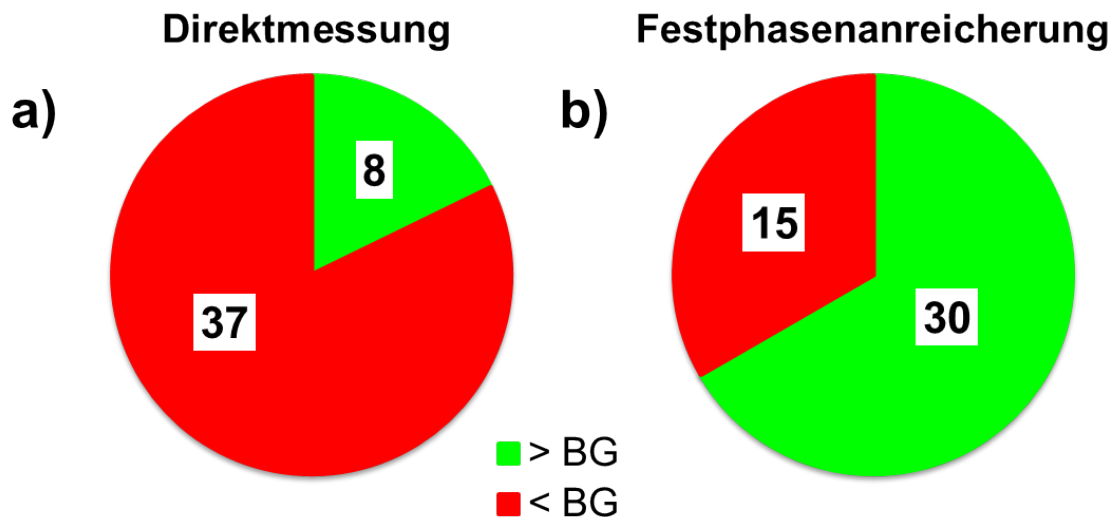


Abbildung 2-3: Screening von 45 Arzneimittelwirkstoffen in Kläranalgenablauf mittels a) HPLC-MS und b) Offline SPE und HPLC-MS. BG = Bestimmungsgrenze.

Abbildung 2-3 zeigt anhand eines einfachen Anwendungsbeispiels, dass die Anreicherung mittels SPE einen positiven Effekt auf die Nachweisstärke der Messmethode hat. Während bei der Direktmessung von Kläranlagenablauf nur 8 von 45 Arzneimittelwirkstoffen oberhalb der Bestimmungsgrenze lagen, konnten mit Hilfe der SPE 30 der 45 Substanzen in Kläranlagenablauf quantifiziert werden.

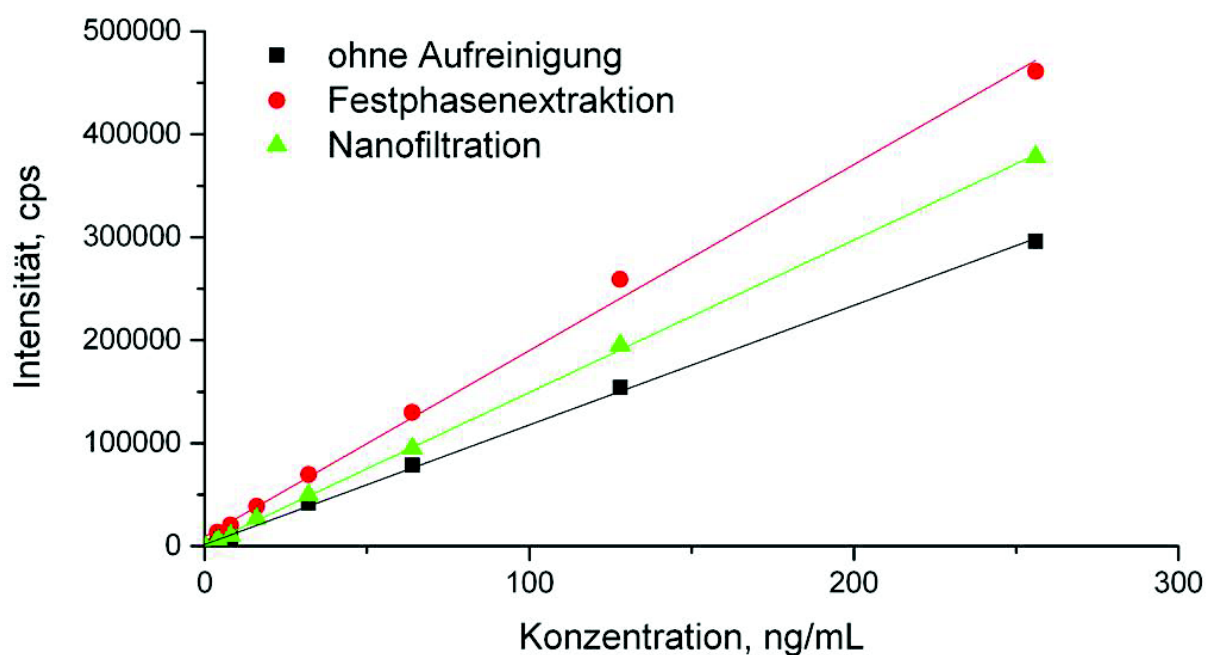


Abbildung 2-4: Kalibrationsgeraden von Carbamazepin in Klärschlamm ohne Aufreinigung (schwarz), nach Festphasenextraktion (rot) und nach Nanofiltration (grün).

In Abbildung 2-4 ist der Effekt der Aufreinigungsleistung durch die SPE anhand der Messung von Carbamazepin in Klärschlamm aufgeführt. Die Empfindlichkeit der Messmethode, die über der Steigung der dargestellten Kalibrationsgerade definiert ist, wurde durch die Aufreinigungsschritte erhöht, wobei die SPE der Nanofiltration noch überlegen ist.

Die Ergebnisse der Experimente zur Anreicherung und Aufreinigung belegen, dass die Festphasenextraktion grundsätzlich als Probenvorbereitung zu diesem Zwecke geeignet ist. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden alternative Verfahren wie die DPX-Technologie oder die Mikroextraktion nicht weiter berücksichtigt.

2.2.2 Automatisierung der Festphasenextraktion zur Probenvorbereitung

Zur Automatisierung der Festphasenextraktion wurde eine Symbiosis™ Pico Einheit verwendet, die von der Firma Axel Semrau GmbH & Co. KG für die Dauer des Forschungsvorhabens zur Verfügung gestellt wurde. Abbildung 2-5 zeigt die Einheit mit ihren Einzelkomponenten.

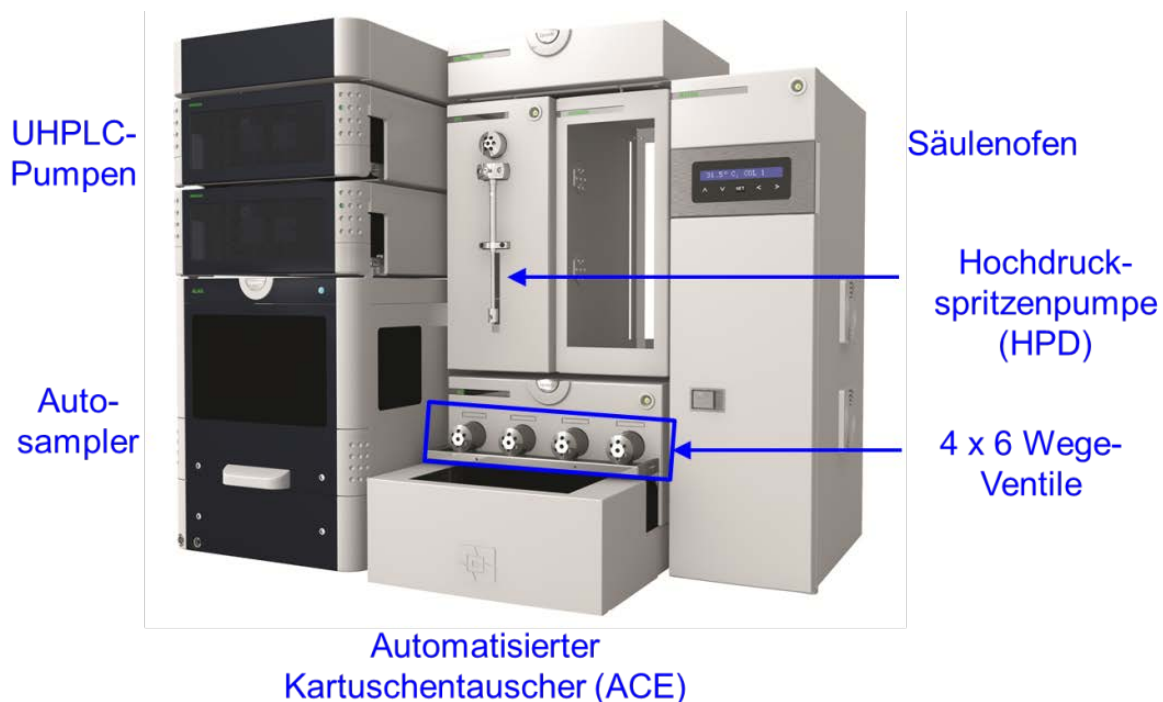


Abbildung 2-5: Symbiosis™ Pico Einheit mit Beschreibung der einzelnen Komponenten [4].

Dabei werden die Hochdruckspritzenpumpe (HPD) und der automatisierte Kartuscentauscher (ACE) als Online SPE Einheit zwischen die Probeninjektion und die chromatografische Trennung geschaltet. Eine typische Kartusche für die Online SPE ist in Abbildung 2-6 gezeigt. Im Vergleich zur Offline SPE ist die Kartusche kleiner und mit weniger Festphasenmaterial befüllt.



Abbildung 2-6: Online SPE Kartusche (HySphere C-18).

Eine typische C-18 Offline SPE Kartusche ist 80 x 10 mm groß und mit 100 - 600 mg Material befüllt, auf die üblicherweise etwa 100 - 1000 mL Probe aufgegeben werden, um mit wenigen mL eines organischen Lösemittels eluiert zu werden. Auf diese Weise werden Anreicherungsfaktoren von bis zu 1000 erreicht. Im Gegensatz dazu ist die Online SPE Kartusche mit 10 x 2 mm vielfach kleiner und mit nur etwa 15 mg Material bestückt [5]. Auch die Partikelgröße der Online Kartuschen ist deutlich kleiner als die konventioneller Offline SPE Kartuschen. Über die Probeninjektion der Online SPE können prinzipiell Volumina bis zu 10 mL oder mehr angereichert werden. Bis zu 3 mL sind mit hoher Präzision über den Autosampler möglich (bei dreifacher Überfüllung der Probenschleife), größere Volumina werden reproduzierbar über den HPD aufgegeben. Der Elutionsschritt erfolgt so, dass die adsorbierten Zielsubstanzen vollständig von der Kartusche auf die HPLC-Säule überführt werden. Dadurch werden Prozessschritte eingespart und ein erneuter Analytverlust durch Verdünnung verhindert. So kann bei einem Injektionsvolumen von beispielsweise 10 mL ein Anreicherungsfaktor von 1000 im Vergleich zur Direktinjektion von 10 μ L erreicht werden. Eine

[illegible]

Das Symbiosis™ Pico System lässt sich in den drei Betriebsmodi LC (a), XLC mit Gradientenelution (b) und XLC mit HPD-Fokussierung (c) betreiben, wie in Abbildung 2-8 abgebildet ist.

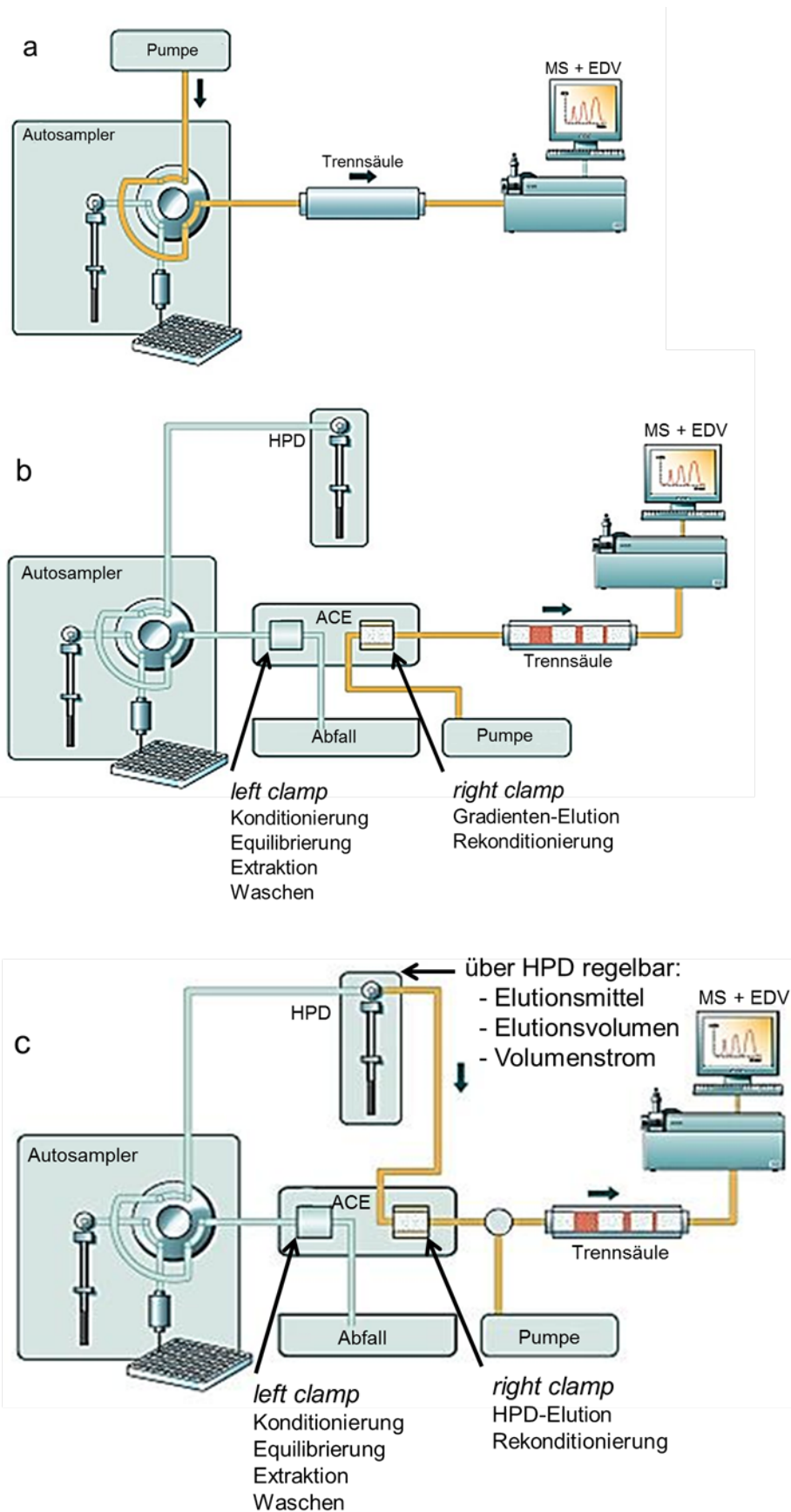


Abbildung 2-8: Darstellung der drei Betriebsmodi der Symbiosis™ Pico Einheit, a) LC Modus, b) XLC mit Gradientenelution und c) XLC mit HPD-Fokussierung. In gelb unterlegt ist der jeweilige Flussweg beim Elutionsschritt. Weitere Erläuterungen im Text. HPD = Hochdruckspritzenpumpe, ACE = automatisierter Kartuschenwechsler, MS = Massenspektrometer, EDV = elektronische Datenverarbeitung [7].

Im Betriebsmodus LC findet keine Anreicherung über die Online SPE statt, das System wird in diesem Fall als konventionelle Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie genutzt. Hierbei kann der Betrieb bei einem Druck von bis zu 1200 bar erfolgen.

Der Betriebsmodus XLC bezeichnet die Integration der SPE Einheit. Hier beträgt das Druckmaximum 350 bar. In der Variante mit Gradientenelution (b) wird die Kartusche zunächst über den HPD konditioniert und equilibriert. Dann wird die Probe über den Autosampler oder den HPD auf die Kartusche gegeben. Das Lösemittel der Probe gelangt in den Abfall. Anschließend kann ein Waschschriff erfolgen, um störende Probenbestandteile von der Kartusche zu entfernen und die Probe weiter aufzureinigen. Danach wird die Kartusche von der linken Klammer (left clamp) in die rechte Klammer (right clamp) überführt. Nun werden die Pumpen der HPLC zugeschaltet und die Elution der Analyten erfolgt direkt im Gradientenfluss.

Im XLC Modus mit HPD-Fokussierung (c) entsprechen die Schritte in der linken Klammer dem Betriebsmodus b. Die Elution der Kartusche erfolgt nun aber über ein eigenes Lösemittel, das vom HPD auf die Kartusche gegeben wird. Das Gemisch von Elutionsmittel und Analyten wird anschließend über ein Ventil in den Gradientenfluss der HPLC-Pumpen geschaltet. Erst dann gelangt das gesamte Gemisch auf die Trennsäule.

Unterschiede beider XLC Modi ergeben sich aus der Schaltung der Flüsse während des Elutionsschrittes. Dabei ist die Elution im Gradientenfluss (b) die einfache Variante, bei der der Fluss der HPLC Pumpen über die Kartusche geführt wird. Die Analyten werden entsprechend der eingestellten LC Methode mit steigendem Organikanteil im Lösemittelgradienten eluiert. Bei der HPD-Fokussierung (c) ist dieser Ablauf abgeändert, um zusätzliche Flexibilität im Elutionsschritt zu ermöglichen. Über die separate Elution mittels HPD und nachfolgende Zuschaltung in den Lösemittelgradienten der HPLC kann erreicht werden, dass die Analyten mit einem hohen Organikanteil von der Kartusche eluiert werden. So werden die Analyten, verglichen mit der Elution im Gradientenfluss, in einer kürzeren Zeit von der Kartusche eluiert. Dadurch kann das Volumen des Elutionspropfens minimiert werden. Die Zuschaltung des Gradienten der HPLC Pumpen verdünnt den vergleichsweise hohen Anteil organischen Lösemittels der Elution, so dass die Startbedingungen für die nachfolgende chromatografische Trennung erreicht werden.

Neben dem einfachen XLC Modus können auch mehrere Läufe ineinander verschachtelt werden. Das bedeutet, dass beim Elutionsschritt der einen Kartusche schon die nächste Kartusche für die nachfolgende Messung mit Konditionierung, Equilibrierung und Probenaufgabe vorbereitet wird. Dieser Modus wird als multidimensionale SPE (mSPE) bezeichnet. Die Verschachtelung ermöglicht eine deutliche Verkürzung der Analysezeiten.

In dem System können SPE-Kartuschen mit unterschiedlichen Festphasenadsorbentien verwendet werden. Grundsätzlich ist jedes Festphasenmaterial für die Automatisierung geeignet. Die gängigsten Materialien werden in einem sog. Methoden-Entwicklungskit angeboten und sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Dieses Kit erleichtert ein automatisiertes Kartuschen-screening. So kann für vorliegende Trennprobleme die am besten geeignete Phase ermittelt werden, ohne auf eine zeit- und personalaufwändige manuelle Auswahl eines geeigneten Kartuschenmaterials angewiesen zu sein.

Tabelle 2-1: Auswahl kommerziell verfügbarer Festphasenadsorbentien für die Online SPE.

Kartusche	Partikelgröße in μm
HySphere CN-SE	8
HySphere C-2-SE	8
HySphere C-8-SE	8
HySphere C-18-SE	8
HySphere Resin GP	12
HySphere Resin SH	20
HySphere Anionentauscher	10
HySphere Kationentauscher	10

2.2.3 Säulenwahl bei der automatisierten Festphasenextraktion

In der Entwicklung neuer HPLC Systeme geht der Trend vermehrt in Richtung druckstabiler UHPLC Einheiten, die bei einem Druck von bis zu 1.500 bar [8] betrieben werden können, um Probendurchfluss und -durchsatz zu erhöhen.

Je nach Konzept unterstützt die Online SPE diese Entwicklung oder steht ihr zunächst entgegen. Die Firma Waters, beispielsweise, bietet ein Online SPE System an, das UHPLC-kompatibel ist. Ein Nachteil dieses druckstabilen Systems ist allerdings die fest installierte SPE-Säule, die nach jeder Analyse regeneriert werden muss und nur wenig Flexibilität für unterschiedliche Anforderungen bei der Anreicherung bietet. Derzeit erhältliche Online SPE Systeme mit austauschbaren Kartuschen werden mit einem Druckmaximum von 350 bar betrieben. Vor diesem Hintergrund ist die Auswahl einer für diesen Druckbereich geeigneten Säulenteknologie von besonderem Interesse, um einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten. Konventionelle HPLC-Säulen sind gewöhnlich mit vollporösen Partikeln gepackt und generieren bei Verwendung von kleinen Partikeldurchmessern (z. B. $\leq 2 \mu\text{m}$) und kleinen Innendurchmessern (z. B. $\leq 2,1 \text{ mm}$) der Trennsäule Drücke von $\geq 1.000 \text{ bar}$, so dass diese Phasen für die Online SPE mit austauschbaren Kartuschen eher ungeeignet sind. In den letzten Jahren sind jedoch alternative Säulenteknologien entwickelt worden. So können

anstelle der vollporösen Partikel auch sogenannte Core-Shell Materialien genutzt werden. Im Vergleich zu vollporösen Partikeln bestehen Core-Shell Partikel aus einem festen Kern, welcher mit einer dünnen vollporösen Schicht des Partikelmaterials ummantelt ist. Dadurch werden die Diffusionswege der Analyten im Vergleich zu vollporösen Materialien deutlich verkürzt und gleichzeitig resultiert ein niedrigerer Gegendruck. Weiterhin zeichnen sich Core-Shell Materialien durch eine sehr homogene Partikelgrößenverteilung aus, so dass Eddy-Diffusion und Longitudinaldiffusion im Vergleich zu vollporösen Partikeln geringer sind, wodurch mit Core-Shell Materialien eine höhere Trenneffizienz erzielt wird [9,10]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit Hilfe von Core-Shell Materialien im Vergleich zu vollporösen Partikeln eine bessere Auflösung, höhere Empfindlichkeit und Peakkapazität bei deutlich reduziertem Gegendruck erreicht werden können [11]. Vor diesem Hintergrund sind Core-Shell Trennsäulen ideal für die auf Kartuschen basierende Online SPE geeignet.

Eine weitere Alternative zu vollporösen Packungsmaterialien stellen sogenannte monolithische Trennsäulen dar. Diese bestehen aus einem hochporösen silica-basierten Einkristall und zeichnen sich durch eine gute Trennleistung bei vergleichsweise geringem Druck aus. Ein schematisches Bild der drei Säulentypen ist in Abbildung 2-9 aufgeführt.

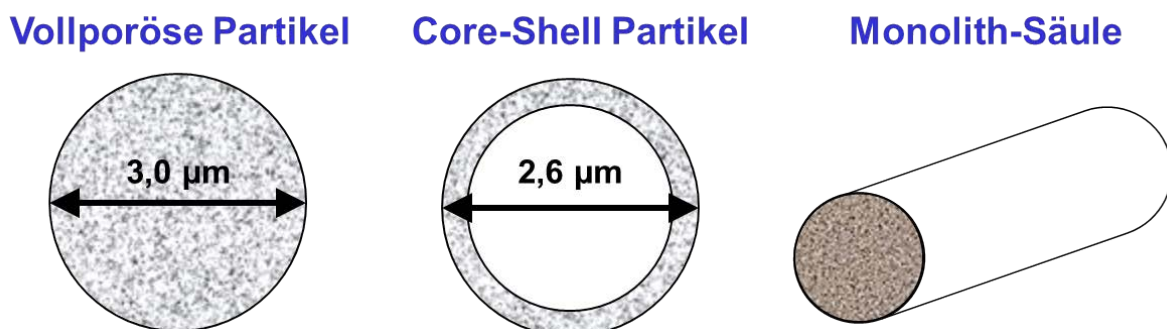


Abbildung 2-9: Schematischer Aufbau unterschiedlicher HPLC-Säulentypen.

Die drei unterschiedlichen Säulentypen (vollporöse C-18 Säule, Core-Shell Säule und Monolith) wurden für ihren Einsatz im XLC Modus vergleichend untersucht. Dabei ergab sich, dass bei einem Wasser-Acetonitril Gradienten, einer Flussrate von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ und einer Ofentemperatur von 40°C der Druck der vollporösen Säule mit 230 - 340 bar dem Druckmaximum von 350 bar sehr nahe kommt und hier die Gefahr bestünde, dass sich das System aus Sicherheitsgründen abschaltet. Im Gegensatz dazu erreicht die Core-Shell Säule mit ähnlichen Abmessungen und gleichen Messbedingungen nur einen Druck von 80 - 180 bar bei vergleichbarer Trennleistung. Für die ebenfalls untersuchte monolithische Säule ergab sich bei gleichen Messbedingungen und guter Trennleistung ein Druck von gerade einmal 20 - 40 bar. Sowohl die Core-Shell Trennsäule als auch der Monolith eignen sich also besonders für den Einsatz mit dem hier verfügbaren Online SPE System.

2.2.4 Anwendungsbeispiel 1: Multimethode für die Untersuchung von Arzneimitteln in Kläranlagenablauf

2.2.4.1 Voraussetzung

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Verabreichung von Arzneimitteln in der Human- und Veterinärmedizin dazu führt, dass ein Teil dieser Substanzen ins Abwasser und von dort aus über Kläranlagen auch in andere Gewässer gelangen kann [12,13]. Um die Belastung des Ökosystems durch diesen Eintragspfad besser einschätzen zu können, bedürfen die Kläranlagenabläufe regelmäßiger Überwachung. Ziel dieser Überwachung ist meist die Abdeckung eines möglichst breiten Stoffspektrums, so dass von geschätzt mehr als 1.000 eingebrachten Wirkstoffen zumindest die Hauptvertreter der einzelnen Substanzklassen in einer Methode erfasst werden können. Diese sogenannten Multimethoden beinhalten üblicherweise mindestens 30 und bis zu mehr als 100 Arzneimittelwirkstoffe [14,15].

Der etablierte Ablauf dieser Überwachung beinhaltet einen Schritt zur Anreicherung und Aufreinigung des Kläranlagenablaufs mittels Festphasenextraktion. Stand der Technik ist hier die Offline SPE. Die anschließende Analytik erfolgt üblicherweise mittels HPLC-MS.

2.2.4.2 Integration der automatisierten Festphasenextraktion

Eine am IUTA bestehende Methode mit Offline SPE und HPLC-MS Messung von 45 Arzneimittelwirkstoffen, 4 Metaboliten und einem Hormon sollte im Rahmen des Projektes auf die Online SPE mit anschließender HPLC-MS Messung übertragen werden, um die technische Integration der Online SPE zu prüfen.

Das breite Stoffspektrum von 50 Substanzen, die mitsamt der angewandten SPE Methode und der im MS detektierten Massenspuren im Anhang in Abschnitt 5.2 aufgeführt sind, soll in diesem Beispiel die Möglichkeiten und Grenzen für Multimethoden aufzeigen.

2.2.4.3 Ergebnisse

Zur Prüfung der Übertragbarkeit werden eine HPLC-MS Direktmessung (Abbildung 2-10) und eine Online SPE HPLC-MS Messung (Abbildung 2-11) gegenüber gestellt.

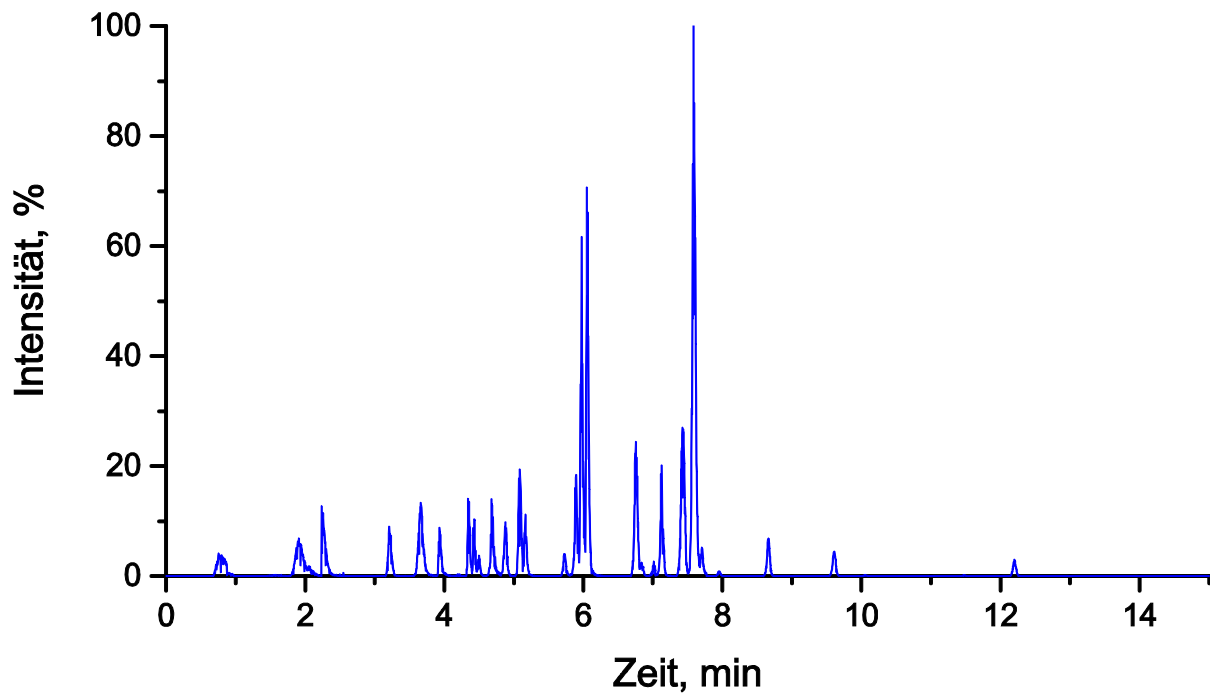


Abbildung 2-10: Messung von 45 Arzneimittelwirkstoffen, 4 Metaboliten und einem Hormon mittels HPLC-MS/MS. Betrieb des Sybosis™ Pico Systems im LC Modus. $\beta = 100 \text{ ng mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,4 mL min^{-1} ; Lösungsmittelgradient: 1 % B auf 99 % B mit 6,3 % B min^{-1} ; Temperatur: 50 °C; Injektionsvolumen: 40 μL .

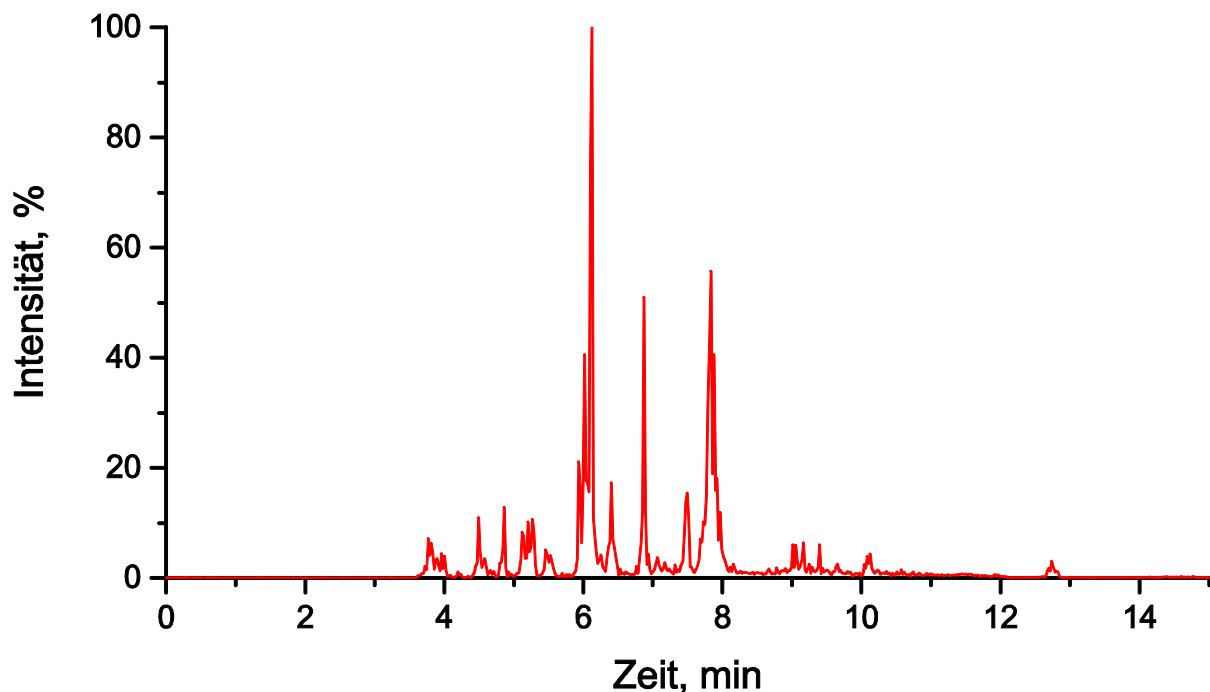


Abbildung 2-11: Messung von 45 Arzneimittelwirkstoffen, 4 Metaboliten und einem Hormon mittels Online SPE HPLC-MS. Betrieb des Sybosis™ Pico Systems im XLC Modus mit Gradientenelution. $\beta = 100 \text{ ng mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,4 mL min^{-1} ; Lösungsmittelgradient: 1 % B auf 99 % B mit 6,3 % B min^{-1} ; Temperatur: 50 °C; Injektionsvolumen: 40 μL .

Die beiden Chromatogramme in Abbildung 2-10 und Abbildung 2-11 geben insgesamt ein ähnliches Bild wider, wobei die Signale der einzelnen Analyten im LC Modus etwas schärfer voneinander getrennt sind. Die zusätzlichen Systemvolumina durch die SPE Kartusche im XLC-Modus führen hier zu einer leichten Bandenverbreiterung.

Im LC Modus konnten Signale von 49 der 50 Analyten detektiert werden, nur Ibuprofen blieb unterhalb der Nachweisgrenze. Im XLC Modus konnten 40 der 50 untersuchten Substanzen nachgewiesen werden. Wieder blieb Ibuprofen unterhalb der Nachweisgrenze. Zusätzlich wurden die Analyten mit einer sehr schwachen Retention von weniger als 2,3 min auf der verwendeten C-18 Phase der Online SPE unter den gewählten Bedingungen nicht erfasst. Darunter fallen Allopurinol, Paracetamol, Metronidazol, Gemcitabin, Sotalol, 17 β -Estradiol, Amoxicillin, Amidotrizoesäure und Iomeprol. Vergleichbare Studien zeigen ebenfalls Probleme bei der Erfassung sehr polarer Substanzen auf C-18 Phasen bei der Entwicklung von Multimethoden auch mittels Offline SPE [15]. Somit ist dieses Problem nicht auf die Übertragung der Methode vom LC auf den XLC Modus zurückzuführen.

2.2.4.4 Fazit

Insgesamt waren 40 von 50 Substanzen der Multimethode ohne zusätzlichen Aufwand auf die Online SPE Einheit übertragbar. Dazu wurden bestehende Informationen und Parameter der Offline SPE für die Automatisierung übernommen und in den Ablauf des XLC Modus integriert. Die nicht erfassten polaren Substanzen mit schwacher Retention auf C-18 Säulen bedürfen allerdings einer gesonderten Methodenentwicklung. Die Substanzen können weder Offline noch Online auf der gewählten C-18 SPE Kartusche angereichert werden, weshalb schlechtere Nachweisgrenzen resultieren. Die Wahl einer alternativen Kartusche zur gesonderten Erfassung der polaren Analyten könnte hier Abhilfe schaffen. Ein geeignetes Kartuschenmaterial wäre zum Beispiel poröser, graphitisierter Kohlenstoff, der in Trennsäulen als Hypercarb™ vertrieben wird und für die Retention sehr polarer Substanzen gut geeignet ist. Dieses Material stand jedoch für die weiteren Untersuchungen nicht zur Verfügung.

2.2.5 Anwendungsbeispiel 2: Methodenentwicklung für zwei Hormone

2.2.5.1 Voraussetzung

Der wichtigste Vertreter der natürlichen weiblichen Sexualhormone ist das 17 β -Estradiol (E2). Bei den künstlichen Sexualhormonen, die z. B. über Anti-Baby-Pillen verabreicht werden, gilt das 17 α -Ethinylestradiol (EE2) als repräsentativ. Die chemischen Strukturen der beiden Substanzen sind in Abbildung 2-12 dargestellt. In dicht besiedelten Gebieten können diese Hormone durch Punktquellen, aber auch über kommunale Kläranlagen in den Wasser-

kreislauf eingetragen werden [16,17]. Dies führt zu Gewässerkonzentrationen im unteren ng/L Bereich [18,19].

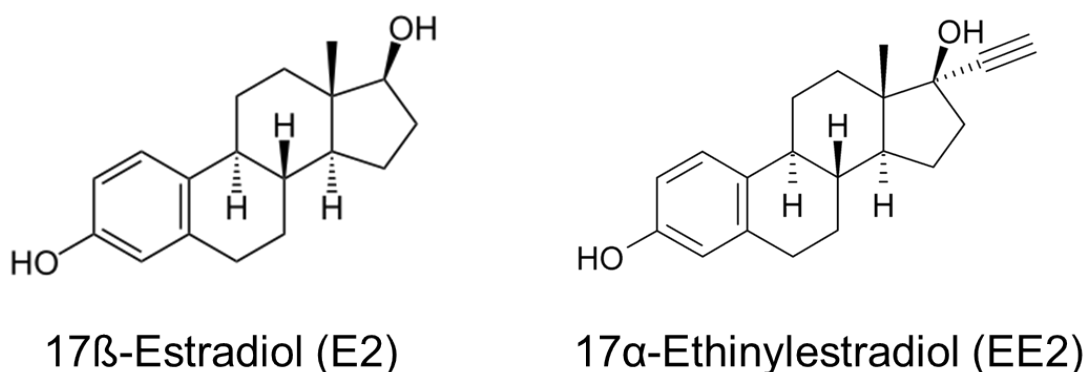


Abbildung 2-12: Strukturen der Hormone 17β-Estradiol (E2) und 17α-Ethinylestradiol (EE2).

Die Überwachung der Hormone im Gewässer stellt eine besondere Herausforderung dar, weil die Substanzen sehr geringe Wirkkonzentrationen von 0,3 bis 3 ng L⁻¹ aufweisen [20]. Mögliche ökotoxikologische Auswirkungen sind eine Demaskulinisierung, eine reduzierte Spermienmobilität und der Rückgang erfolgreicher Befruchtungen [21-23]. Derzeit sind die beiden Substanzen auf der Beobachtungsliste zur Überwachung von Spurenstoffen in Gewässern. Am 31.01.2012 wurde von der EU Kommission eine Umweltqualitätsnorm (UQN) von 400 pg L⁻¹ für E2 und 35 pg L⁻¹ für EE2 vorgeschlagen [24]. Für eine robuste Analytik ist damit eine Nachweisgrenze von 10 pg L⁻¹ für EE2 notwendig. Derzeitig verfügbare Methoden sind nicht in der Lage, diese Anforderung zu erfüllen. Stand der Technik ist eine Nachweisgrenze im niedrigen ng/L Bereich mit vorangehender Offline SPE bei einem Anreicherungsfaktor von 1.000. Hier ist eine Weiterentwicklung der Methode nötig, um die Einhaltung der möglichen zukünftigen UQN zu gewährleisten.

2.2.5.2 Integration der automatisierten Festphasenextraktion

Zunächst soll die grundsätzliche Übertragung einer bestehenden LC Methode auf die XLC geprüft werden. Dazu wird die Online SPE Einheit in die Methode integriert.

Die massenspektrometrische Detektion erfolgt mittels positiver chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) als Dehydrat [M-H₂O]⁺ mit den Massenübergängen m/z 255 → 159 und m/z 255 → 133 für 17β-Estradiol sowie m/z 279 → 133 und m/z 279 → 159 für 17α-Ethinylestradiol.

Weiterhin wurde eine Derivatisierung als alternativer oder zusätzlicher Probenvorbereitungsschritt untersucht, um Matrixeffekte zu reduzieren und einen niedrigeren Konzentrationsbereich zu erreichen. Die Derivate werden wiederum als Dehydrate, in diesem Fall aber nach Elektrospray-Ionisierung (ESI), mit den Massenübergängen m/z 506 → 171 und

m/z 506 $\rightarrow$ 115 für 17 β -Estradiol sowie m/z 530 $\rightarrow$ 171 und m/z 530 $\rightarrow$ 115 für 17 α -Ethinylestradiol gemessen.

2.2.5.3 Ergebnisse

Für die Übertragung der bestehenden LC Methode auf eine XLC Methode werden die beiden Hormone zunächst nativ detektiert. Durch Integration der Online SPE konnte das Injektionsvolumen von 50 μ L in der LC Methode auf 1.000 μ L in der XLC Methode erhöht werden. Tabelle 2-2 vergleicht die linearen Arbeitsbereiche beider Methoden für E2 und EE2.

Tabelle 2-2: Vergleich der linearen Arbeitsbereiche bei Messung der Hormone 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol ohne automatisierte Festphasenextraktion (LC Modus) bei einem Injektionsvolumen von 50 μ L und mit automatisierter Festphasenextraktion (XLC Modus) bei einem Injektionsvolumen von 1.000 μ L.

Analyt	Linearer Arbeitsbereich, ng L ⁻¹	
	LC Modus	XLC Modus
17 β -Estradiol	100 - 50.000	7,5 - 2.000
17 α -Ethinylestradiol	100 - 50.000	7,5 - 2.000

Ein Vergleich der linearen Arbeitsbereiche aus Tabelle 2-2 zeigt, dass beide Methoden über etwa drei Zehnerpotenzen linear verlaufen. Der lineare Arbeitsbereich wird also durch Integration der Online SPE nicht eingeschränkt. Im Vergleich zum LC Modus liegt der lineare Arbeitsbereich nach automatisierter Anreicherung im XLC Modus in einem niedrigeren Konzentrationsbereich. Dies lässt sich durch das höhere Injektionsvolumen begründen, durch das eine größere Substanzmenge in das System eingegeben wird. Mit dieser Konfiguration lassen sich Bestimmungsgrenzen von 25 ng L⁻¹ für E2 und 21 ng L⁻¹ für EE2 erreichen.

Um die Empfindlichkeit der Methode zu steigern und störende Matrixeffekte auszublenden, besteht für die Hormone die Möglichkeit einer Derivatisierung [25,26]. Dies wird unter Zugabe von Dansylchlorid erreicht. Die Reaktion von 17 β -Estradiol mit Dansylchlorid ist beispielhaft in Abbildung 2-13 aufgeführt. Die Hormone benötigen bei einer Temperatur von 60 °C 5 min für eine vollständige Umsetzung zum Dansylchlorid-Derivat.

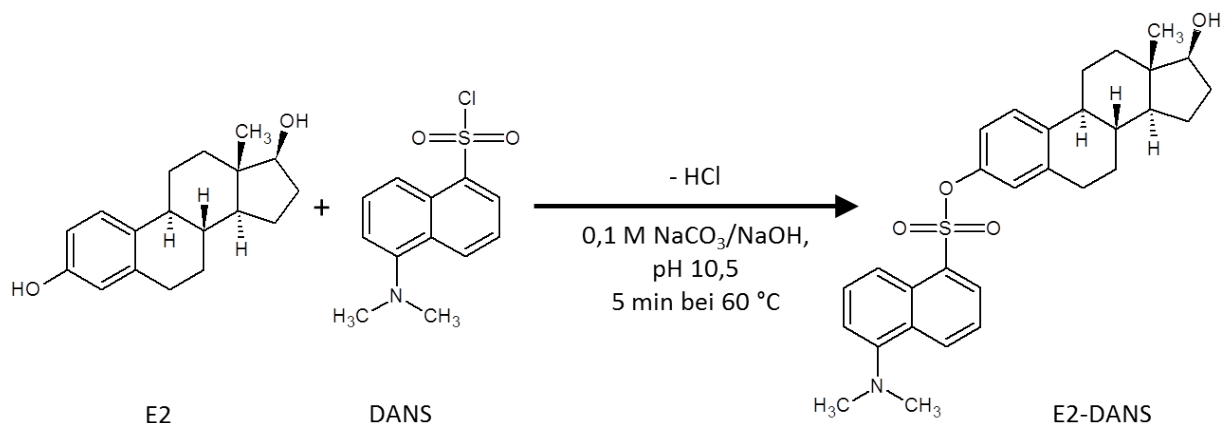


Abbildung 2-13: Reaktion von 17β-Estradiol (E2) mit Dansylchlorid (DANS) unter Abspaltung von Salzsäure (HCl) in 0,1 M Natriumcarbonat/Natriumhydroxid Lösung bei pH 10 zu dem Derivat 17β-Estradiol-Dansylchlorid.

Die Messung der Dansylchlorid-Derivate zeigt, dass der Derivatisierungsschritt hilft, störende Matrixbestandteile auszublenden und so Matrixeffekte zu vermindern. Dies wird im Vergleich zweier Chromatogramme von E2 und 17β-Estradiol-Dansylchlorid (E2-DANS) in Kläranlagenablauf bei gleichen Messbedingungen in Abbildung 2-14 veranschaulicht. Dabei ist zu erkennen, dass die Messung des nativen E2 (blaue Linie) stark von Matrixeffekten beeinflusst wird. Um die erwartete Retentionszeit ist ein hohes Grundrauschen zu erkennen, das einen negativen Einfluss auf die Nachweisstärke der Methode hat. Zudem können auftretende Störsignale, sogenannte Geisterpeaks, zu Fehlinterpretationen und falsch positiven Ergebnissen führen. Die Messung von E2-DANS (rote Linie) zeigt ein wesentlich niedrigeres Grundrauschen. Zudem ist diese Massenspur frei von Geisterpeaks, wodurch eine geringere Nachweisgrenze erzielt wird.

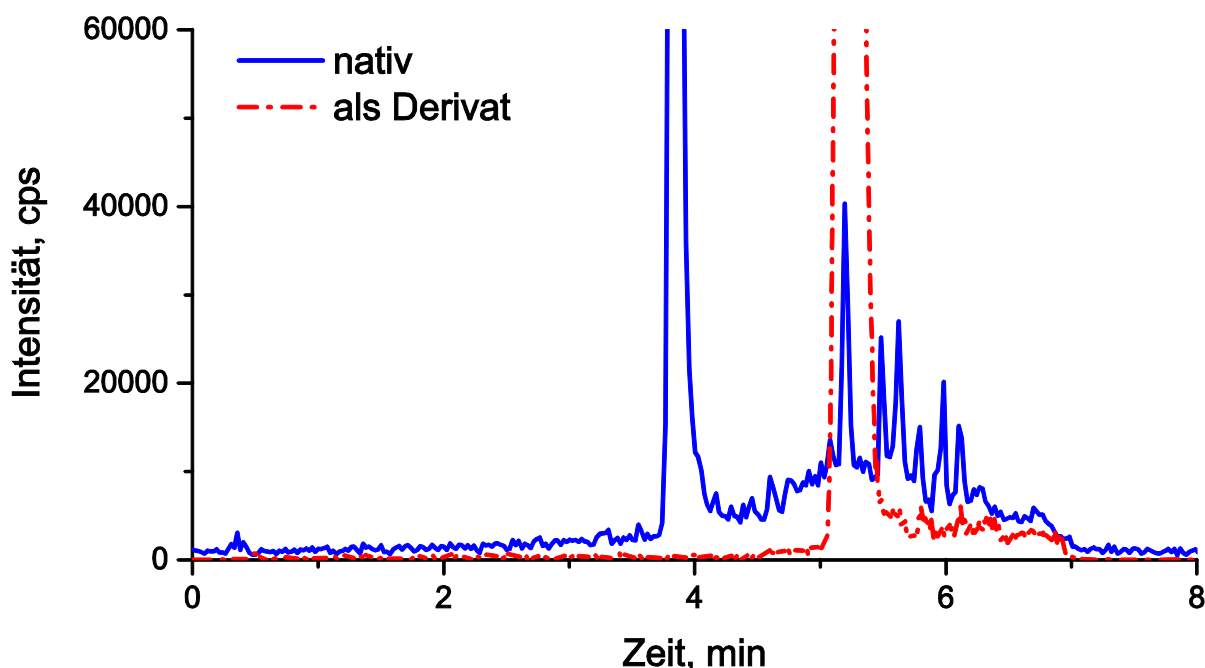


Abbildung 2-14: Vergleich zweier Chromatogramme von 17β-Estradiol zum einen nativ als $[M-H_2O]^+$ (m/z 255 → 159) und zum anderen derivatisiert als 17β-Estradiol-Dansylchlorid (m/z 506 → 171) gemessen. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 2 mM Ammoniumacetat, B: Methanol mit 2 mM Ammoniumacetat; Flussrate: 0,5 mL min⁻¹; Lösungsmittelgradient: 20 % B auf 95 % B mit 12,5 % B min⁻¹; Temperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 50 μL.

Der in Tabelle 2-3 abgebildete Vergleich der Bestimmungsgrenzen zeigt, dass die Derivatisierung einen positiven Effekt auf die Nachweisstärke der Methode hat. Für EE2 konnte die Bestimmungsgrenze um den Faktor 6 verbessert werden, für E2 um den Faktor 20. Dieser Teilschritt allein reicht aber nicht aus, um den Nachweisbereich der vorgeschlagenen UQN zu erreichen. Der Einsatz der Online SPE erzielt einen vergleichbaren Faktor für die Bestimmungsgrenzen wie die Derivatisierung. Allerdings ist die Online SPE weniger zeit- und personalaufwändig, wodurch letztendlich auch die Kosten reduziert werden. Somit kann die Online SPE das bekannte Verfahren der Derivatisierung ersetzen oder aber ergänzen, um mit der Kombination beider Verfahren noch geringere Bestimmungsgrenzen zu erreichen.

Tabelle 2-3: Vergleich der Bestimmungsgrenzen einer nativen Messung und nach Derivatisierung mit Dansylchlorid. Anreicherung von 1 L Probe mittels Offline SPE vor der HPLC-MS Messung mit einem Injektionsvolumen von 50 μL.

Analyt	Bestimmungsgrenze, ng L ⁻¹	
	Nativ	Dansylchlorid-Derivat
17β-Estradiol	23	1
17α-Ethinylestradiol	18	3

2.2.5.4 Fazit

Die Umsetzung der automatisierten SPE hat für die Detektion der Hormone E2 und EE2 problemlos funktioniert. Im Vergleich zu einer Direktmessung konnten die Bestimmungsgrenzen durch die Aufgabe eines höheren Probenvolumens mit einem Faktor von ca. 13 verbessert werden.

Für die Hormone ist die Derivatisierung mit Dansylchlorid vorteilhaft, weil so Matrixeffekte minimiert werden und damit die Empfindlichkeit der Methode gesteigert werden kann. Für die Überwachung der vorgeschlagenen UQN könnte sich eine Verfahrensvariante mit der Kombination aus Offline SPE, Derivatisierung und Online SPE anbieten. Alle drei Schritte steigern die Nachweisstärke der Methode prinzipiell um mehrere Zehnerpotenzen. Hier müsste allerdings noch abschließen geprüft werden, ob die Kombination der Schritte ausreicht, die erforderliche Bestimmungsgrenze für die UQN zu erreichen.

Nichtsdestotrotz konnte auch für dieses Anwendungsbeispiel gezeigt werden, dass die Online SPE zur Empfindlichkeitssteigerung geeignet ist und somit die Kopplung zu nachweis-schwächeren Detektoren ermöglicht. Dabei stellt die hier gezeigte Anwendung noch nicht die obere Grenze der möglichen Online Anreicherung dar. Anstelle des angewandten Injektionsvolumens von 1.000 µL können auch wesentlich höhere Volumina, z. B. 10 mL, über den HPD auf die Kartusche gegeben werden.

2.2.6 Anwendungsbeispiel 3: Neonicotinoide

2.2.6.1 Voraussetzung

Neonicotinoide gehören zur Stoffgruppe der Insektizide aus der Substanzklasse der Pestizide. In den letzten Jahren sind Neonicotinoide vermehrt in den Fokus der Öffentlichkeit gerückt, weil sie im Verdacht stehen, ein großes Bienensterben zu verursachen. Die geringe Toxizität auf den menschlichen Organismus scheint hier nicht auf andere Organismen übertragbar zu sein, da schon sehr geringe Wirkkonzentrationen einen Einfluss auf das Orientierungsvermögen von Bienen haben [27]. Diese und weitere Studien haben dazu geführt, dass die EU Kommission die Nutzung der Neonicotinoide stark eingeschränkt hat. Trotz der Einschränkung liegt der derzeitige Marktanteil an Neonicotinoiden weltweit bei etwa 25 % aller eingesetzten Pestizide [28].

Ungeachtet der hohen Verbrauchszahlen sind der Eintrag in die Umwelt und die dortige Verteilung bislang kaum untersucht. Hier ist es wichtig, analytische Methoden zu entwickeln, um Gewässer, die an Nutzungsgebiete angrenzen, sowie das umgebende Grundwasser zu überwachen.

2.2.6.2 Integration der automatisierten Festphasenextraktion

Besonders gefragt für die Analyse der Neonicotinoide sind einfache und robuste Methoden, die ohne manuelle Probenvorbereitung auskommen und von unterschiedlichen Gewässertypen und -inhaltsstoffen nicht beeinflusst werden.

Für diese Anforderungen bietet die Online SPE einen passenden Lösungsansatz. Die Proben werden mittels Online SPE angereichert, so dass die vorkommenden Umweltkonzentrationen ohne zusätzliche manuelle Probenanreicherung gemessen werden können. Zusätzlich werden störende Wasserinhaltsstoffe über die Festphase abgetrennt, so dass die Messung nicht von Matrixeffekten beeinflusst wird.

Die Methode wurde für die sechs meist verwendeten Neonicotinoide Acetamiprid, Clothianidin, Imidacloprid, Thiacloprid, Nitenpyram und Thiamethoxam entwickelt. Für die chromatografische Trennung wurde eine Umkehrphase verwendet. Die Anreicherung der Zielanalyten erfolgte auf unterschiedlichen Festphasenmaterialien, um alle sechs Neonicotinoide in einer Methode erfassen zu können.

2.2.6.3 Ergebnisse

Um die chromatografische Trennung der sechs ausgewählten Neonicotinoide auf einer C-18 Säule zu testen, wurde das Symbiosis™ Pico System zunächst im LC Modus betrieben. Zur Trennung wurde eine Phenomenex Kinetex C-18 Säule (50 × 2,1 mm, 2,6 µm Partikelgröße) mit Core-Shell Partikeln verwendet. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im MRM Modus. Die Massenübergänge der Analyten sind in Tabelle 2-4 aufgelistet.

Ein Chromatogramm eines Neonicotinoidstandards ($\beta = 10 \text{ ng mL}^{-1}$) ist in Abbildung 2-15 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Auflistung der Massenübergänge zur massenspektrometrischen Detektion der sechs untersuchten Neonicotinoide. Q1 = Massenübergang zur Quantifizierung. Q3 = Massenübergang zur Verifizierung.

Analyt	Q1, m/z	Q3, m/z
Acetamiprid	223 → 126	223 → 90
Clothianidin	250 → 169	250 → 132
Thiacloprid	253 → 126	253 → 90
Imidacloprid	257 → 210	257 → 176
Nitenpyram	271 → 225	271 → 126
Thiamethoxam	292 → 211	292 → 181

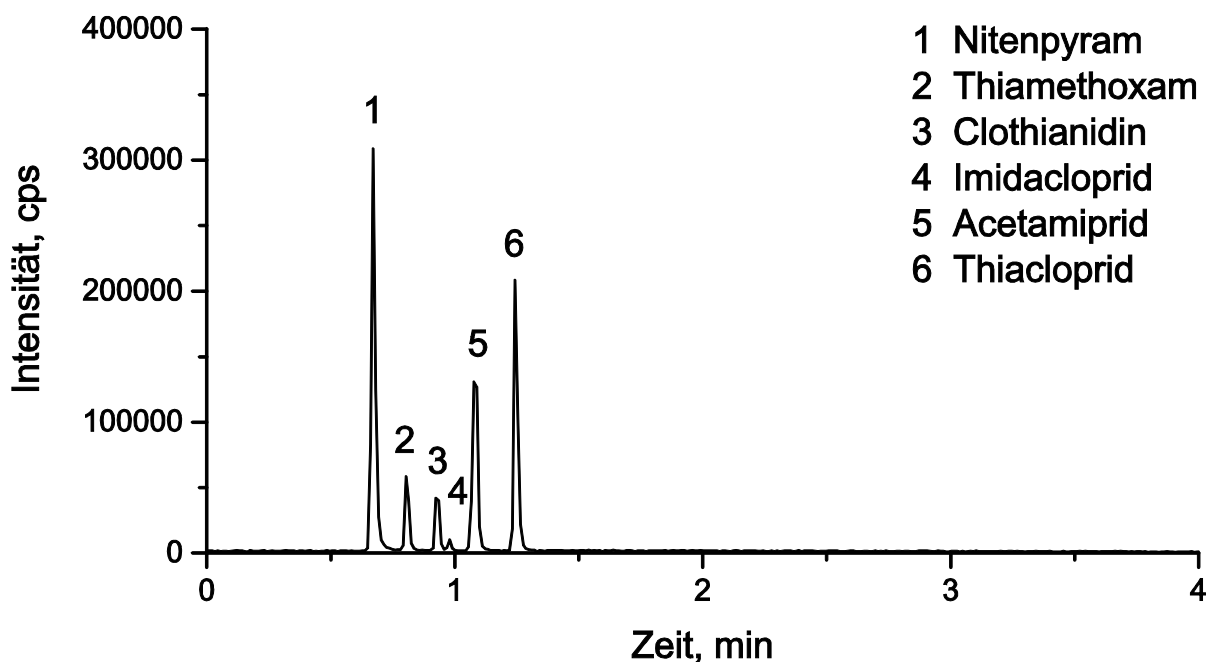


Abbildung 2-15: Trennung von sechs Neonicotinoiden, Konzentration: $\beta = 10 \text{ ng mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min^{-1} ; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 100 % B mit 13,6 % B min^{-1} ; Temperatur: 30 °C; Injektionsvolumen: 50 μL .

Aus Abbildung 2-15 ist zu entnehmen, dass die chromatografische Trennung der sechs Neonicotinoide über eine C-18 Phase mit einem linearen Lösemittelgradienten innerhalb von unter 2 Minuten erfolgen kann. Das kritische Peakpaar Clothianidin und Imidacloprid ist mit einer kritischen Auflösung von 1,14 getrennt. Dies spielt aber bei der verwendeten massenspektrometrischen Detektion aufgrund der unterschiedlichen Massenübergänge auf beiden Massenspuren nur eine untergeordnete Rolle und beeinflusst die Identifizierung der Verbindungen nicht.

In einem nächsten Schritt wurde die Online SPE als zusätzliches Element in die Methode integriert. Dazu wurden zunächst unterschiedliche verfügbare Materialien getestet. Die Wiederfindungsraten (WFR) sind beispielhaft für das polare Thiamethoxam und das am stärksten retardierte Thiacloprid für die unterschiedlichen Festphasenmaterialien in Abbildung 2-16 aufgeführt. Dabei zeigte sich, dass ein Teil der Festphasenmaterialien für die Anreicherung der Neonicotinoide nur bedingt geeignet ist.

Der HySphere Anionentauscher zeigt das schlechteste Ergebnis, die Analyten wiesen eine erhöhte Wiederfindung auf. Insgesamt lagen für das Material nur die Analyten Imidacloprid und Clothianidin innerhalb des akzeptierten Bereichs von 80 - 120% der Wiederfindung. Das HySphere Resin CN-SE Material ist für die Substanzklasse der Neonicotinoide nicht geeignet. Bei der HyShere Resin GP Phase und dem HySphere Kationentauscher zeigte Thiacloprid eine leicht reduzierte WFR. Hier reichte die Elutionskraft des Gradienten nicht, um alle Substanzen vollständig von der Kartusche zu eluieren. Die besten WFR erreichten die

Materialien HLB, HySphere Resin SH und HySphere C-18-SE, bei denen die Analyten im Bereich zwischen 80 und 120% wiedergefunden wurden.

Trotz der guten Wiederfindungsraten zeigte die HySphere Resin SH Phase Schwächen bei dem nachfolgenden Elutionsschritt. Die Substanzen wurden nur schlecht eluiert, wodurch in der chromatografischen Trennung vergleichsweise breite Peaks von etwa 1 min entstehen, während die Peakbreiten bei Verwendung der anderen Festphasen meist unter 10 sec lagen. Ein möglicher Erklärungsansatz bietet das Material, das mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 20 µm vorliegt, während die übrigen Materialien geringere Partikeldurchmesser haben. Die längeren Diffusionswege führen somit zu einer ausgeprägten Bandenverbreiterung.

Daraus resultiert, dass die HLB Kartuschen sowie das HySphere C-18-SE Material für eine leicht umsetzbare, robuste Methode zur Anreicherung der Neonicotinoide geeignet ist. Da das C-18-Festphasenmaterial in vielen Laboratorien das gängigste Material für die Anreicherung unterschiedlicher Spurenstoffe in Gewässern ist, wurden nachfolgende Versuche mit den HySphere C-18-SE Kartuschen durchgeführt.

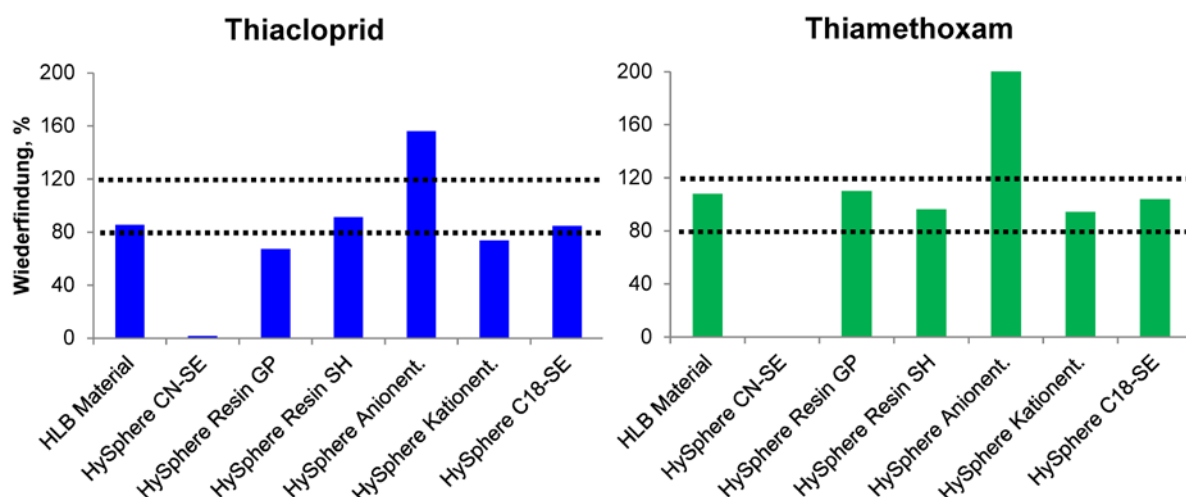


Abbildung 2-16: Wiederfindungsraten von Thiocloprid und Thiamethoxam nach automatisierter Anreicherung im XLC Modus mit Gradientenelution auf unterschiedlichen Festphasenmaterialien. Der Bereich zwischen den schwarzen, gestrichelten Linien markiert eine zufriedenstellende Wiederfindung von 80 – 120 %.

Die finale Methode mit Online SPE integriert die automatisierte Anreicherung der sechs Neonicotinoide auf einer C-18 Kartusche. Ein aus dieser Methode generiertes Chromatogramm ist in Abbildung 2-17 dargestellt.

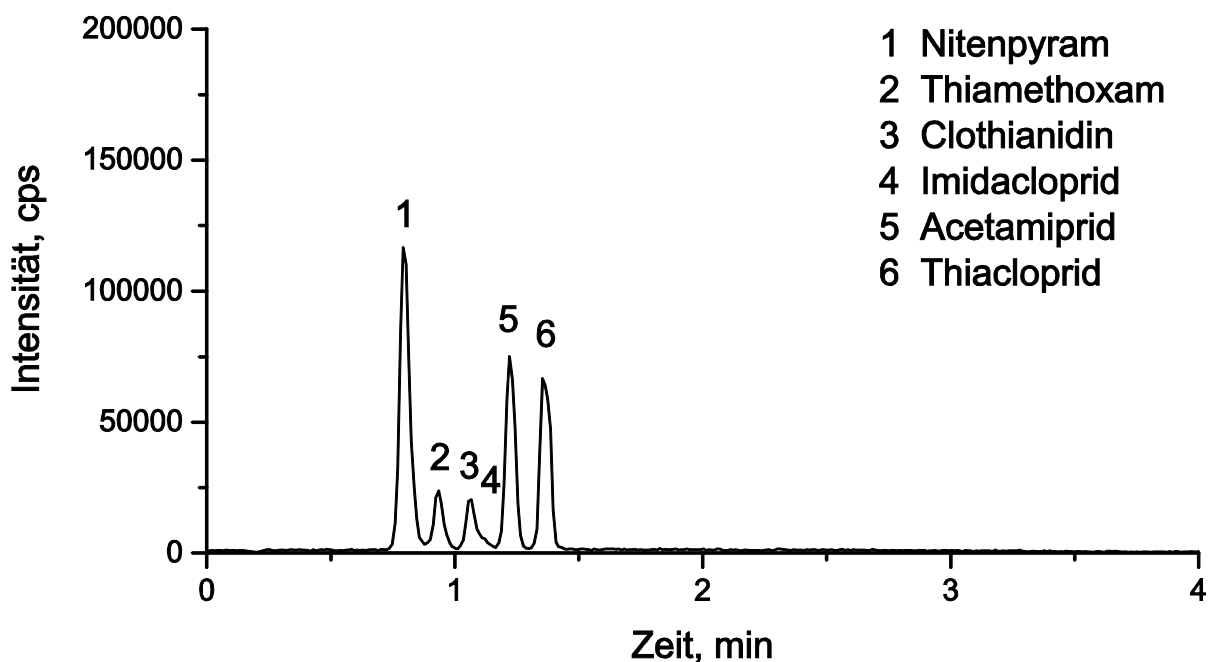


Abbildung 2-17: Anreicherung von sechs Neonicotinoiden mittels Online SPE mit C-18 Festphasenmaterial, Konzentration $\beta = 0,5 \text{ ng mL}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Methanol mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 100 % B mit $13,6 \text{ % B min}^{-1}$; Temperatur: $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Injektionsvolumen: $1000 \text{ }\mu\text{L}$.

Das in Abbildung 2-17 aufgeführte Chromatogramm zeigt, dass die Online Anreicherung für die sechs Neonicotinoide gut umsetzbar ist. Die Empfindlichkeit entspricht dem LC Modus, wenn die gleiche Stoffmenge in das System eingegeben wird.

Anhand der Bestimmungsgrenze wurde die Nachweisstärke ohne und mit Integration der automatisierten SPE Einheit verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-5 gegenübergestellt.

Tabelle 2-5: Bestimmungsgrenzen (BG) von sechs Neonicotinoiden im LC Modus und im XLC Modus mit integrierter Online SPE.

Analyt	Bestimmungsgrenze, ng L^{-1}	
	LC Modus	XLC Modus
Acetamiprid	290	5,0
Thiacloprid	150	9,4
Nitenpyram	230	5,1
Thiamethoxam	380	10,2
Imidacloprid	1.200	14,5
Clothianidin	940	9,9

Ein Vergleich der Bestimmungsgrenzen von LC Modus und XLC Modus in Tabelle 2-5 zeigt, dass die Online SPE geeignet ist, die Nachweisstärke der Messmethode deutlich zu verbessern. Für Imidacloprid kann die Bestimmungsgrenze um den Faktor 82 von 1.200 auf

14,5 ng L⁻¹ verbessert werden, für Acetamidrid wird eine Verbesserung der Bestimmungsgrenze von 290 auf 5,0 ng L⁻¹ erreicht.

Neben den Bestimmungsgrenzen ist für eine vollständige Validierung die Wiederholbarkeit in Mehrfachmessungen relevant. Dafür wurde sechsmal hintereinander ein Standard mit der Konzentration von 80 ng L⁻¹ mittels XLC Modus analysiert. Dabei wurden drei C-18 Kartuschen verwendet. Die Standardabweichung lag bei 8,5 % für Imidacloprid und für die übrigen Neonicotinoide unterhalb von 5,5 %.

Um die Anwendbarkeit für Realproben zu prüfen, wurde eine Leitungswasserprobe mit 80 ng L⁻¹ der sechs Neonicotinoide versetzt und über die Online SPE analysiert. Die Wiederfindungsraten der Substanzen lagen in einem Bereich von 83 % bis 104 %. Demnach hat die Matrix von Leitungswasser keinen störenden Einfluss auf die Analyse mittels automatisierter Festphasenanreicherung.

2.2.6.4 Fazit

Die automatisierte Probenvorbereitung mittels Online SPE bietet die Möglichkeit, sechs Neonicotinoide in Wasserproben im unteren ng L⁻¹ Bereich zu untersuchen. Damit erfasst die Methode den Bereich, in dem Neonicotinoide auch im Gewässer bereits nachweisbar waren [29]. Die Aufreinigung über eine C-18 Kartusche bewirkt zudem, dass störende Matrixbestandteile entfernt werden können und die Methode somit das Potential hat, unterschiedliche Gewässertypen mit gleichbleibender Robustheit zu untersuchen.

Eine Weiterentwicklung der Methode hinsichtlich größerer Anreicherungsfaktoren wäre an dieser Stelle denkbar, da das System im XLC Modus auch noch höhere Anreicherungsfaktoren erlaubt. Auf diese Weise könnten einerseits auch schwach belastete Gewässer überwacht werden oder alternative Detektionsverfahren wie die Raman-Detektion eingesetzt werden, die bislang noch nicht die Nachweisstärke klassischer Massenspektrometer erreichen, dafür aber andere Anwendungsvorteile bieten.

2.2.7 Injektion großer Probenvolumina und Anreicherung mittels XLC Modus

Die in den Kapiteln 2.2.4 bis 2.2.6 vorgestellten Anwendungsbeispiele zeigen die Umsetzung von Methoden auf die automatisierte Festphasenextraktion für ein maximales Probenvolumen von 1 mL. Das Symbiosis™ Pico System erlaubt prinzipiell aber auch die Injektion größerer Injektionsvolumina, um höhere Anreicherungsfaktoren zu erzielen.

Eine Beispielapplikation mit erhöhtem Injektionsvolumen wurde für die Arzneimittelwirkstoffe Ciprofloxacin und Ofloxacin aus der Gruppe der Fluorquinolone aufgebaut. Die beiden Analyten aus der Stoffgruppe der Antibiotika sind häufig in Abwasser und Kläranlagenabläufen nachweisbar. Auch aus früheren Studien ist das Vorkommen der Substanzen im ng L⁻¹ Be-

reich bekannt [30,31]. Die etablierte Methode basiert auf einer Offline SPE Anreicherung auf einer C-18 Kartusche von 1 L Probenvolumen. Hierzu sollte nun untersucht werden, ob die Offline SPE vollständig durch die Online SPE ersetzt werden kann. Als Anreicherungs-volumen für die Online SPE wurden 10 mL gewählt, was einem Anreicherungs-faktor von 1.000 entspricht, verglichen mit einem Injektionsvolumen von 10 μL nach Offline SPE. Ein Chromatogramm dieser Messung ist in Abbildung 2-18 dargestellt. Hierbei ergibt sich für Ofloxacin bei einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 187 eine Nachweisgrenze (NWG) von 16 pg L^{-1} . Für Ciprofloxacin wird eine NWG von 136 pg L^{-1} erreicht. Trotz des hohen Anreicherungs-volumens werden die Analyten am Säulenkopf fokussiert und eluieren mit symmetrischer Peakform etwa 0,5 min nach der Totzeit. So können Gewässer ohne manuelle Probenvorbe-reitung im pg L^{-1} Bereich auf die ausgewählten Antibiotika untersucht werden.

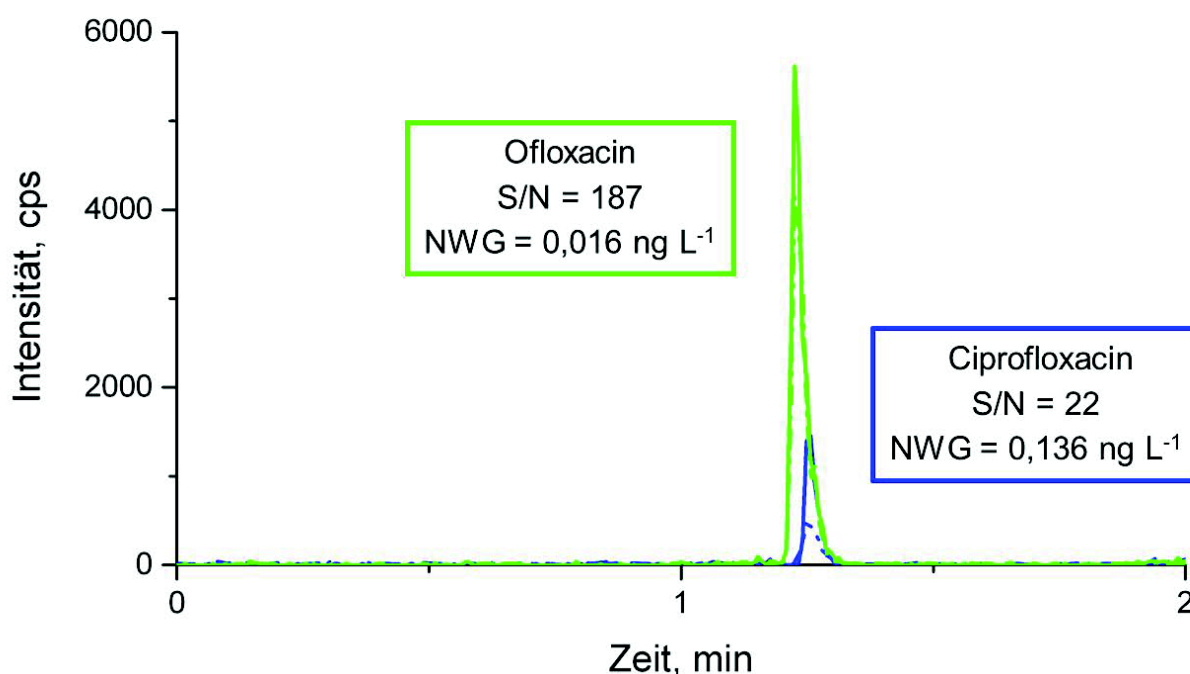


Abbildung 2-18: Chromatogramm der Fluorquinolone Ofloxacin (grün) und Ciprofloxacin (blau) im XLC Modus mit Gradientenelution. Online SPE über HySphere C-18, Konzentration $\beta = 1 \text{ ng L}^{-1}$. S/N = Signal-zu-Rausch-Verhältnis. NWG = Nachweisgrenze. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min^{-1} ; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 50 % B mit 4,5 % B min^{-1} ; Temperatur: 50 $^{\circ}\text{C}$; Injektionsvolumen: 10 μL .

Neben den Fluorquinolonen sollte zudem geprüft werden, ob die Anreicherung großer Probenvolumina für eine anschließende chromatografische Trennung geeignet ist. Dazu wurden vier Arzneimittel aus unterschiedlichen Polaritätsbereichen ausgewählt. Atenolol repräsentiert die polare Fraktion, Metoprolol und Bisoprolol die mittelpolare Fraktion und Carbamazepin die unpolare Fraktion. Ein Probenvolumen von 10 mL wurde injiziert und auf einer HySphere C18 Kartusche angereichert. Die Elution erfolgte im XLC Modus. Das resultierende Chromatogramm ist in Abbildung 2-19 aufgeführt.

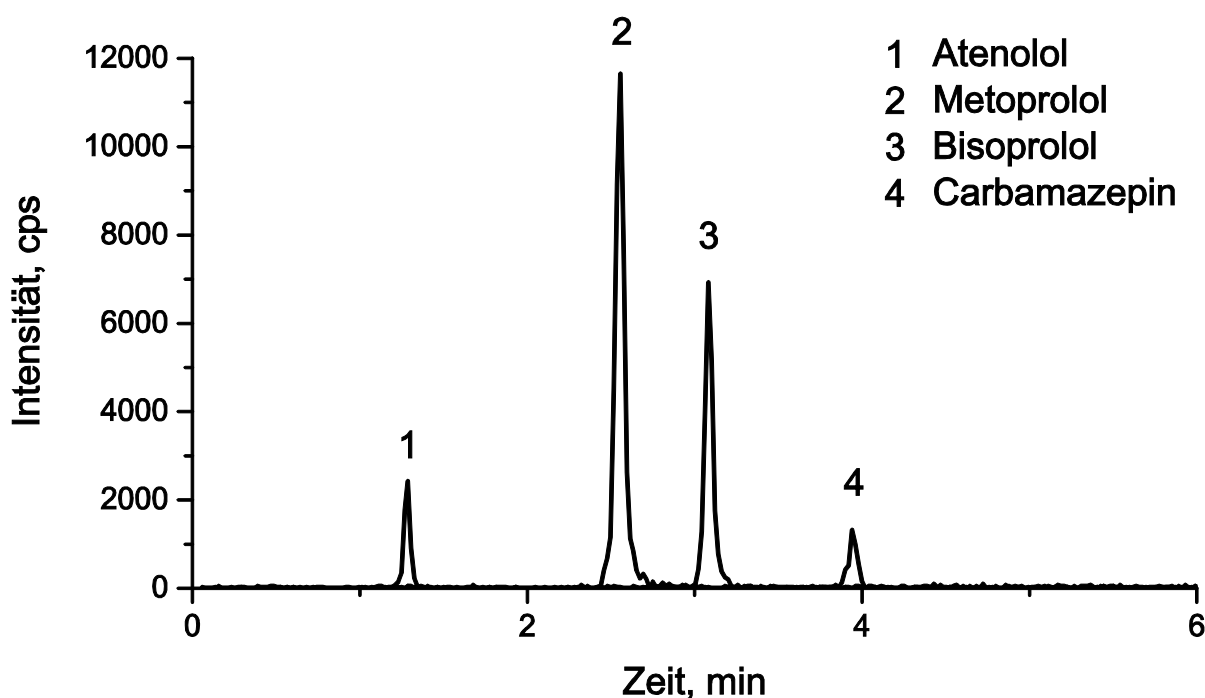


Abbildung 2-19: Chromatografische Trennung von vier Arzneimitteln unterschiedlicher Polaritätsbereiche und Online SPE Anreicherung auf einer HySphere C-18 Kartusche. Konzentration $\beta = 1 \text{ ng L}^{-1}$. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Kinetex C-18 (50 x 2,1 mm, 2,6 μm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,5 mL min^{-1} ; Lösungsmittelgradient: 5 % B auf 99 % B mit 9,8 % B min^{-1} ; Temperatur: 50 °C; Injektionsvolumen: 10 mL.

Die Anreicherung der Arzneimittel Atenolol, Metoprolol, Bisoprolol und Carbamazepin auf einer HySphere C-18 Kartusche zeigt, dass auch ein Probenvolumen von 10 mL keinen negativen Einfluss auf die Fokussierung und damit auf die chromatografische Trennung hat. Alle vier Peaks aus den unterschiedlichen Polaritätsbereichen sind gut voneinander getrennt und eluieren als symmetrische Banden. Mit dieser Methode werden Nachweisgrenzen im pg L^{-1} Bereich erzielt. Für Atenolol und Carbamazepin ergeben sich NWG von 100 pg L^{-1} , die NWG von Metoprolol liegt bei 30 pg L^{-1} und die von Bisoprolol bei 20 pg L^{-1} ohne zusätzliche manuelle Probenvorbereitung. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage, die Methode in einem nächsten Schritt für die Anwendung bei Realproben unterschiedlicher Gewässertypen zu nutzen.

2.2.8 Möglichkeiten der Kopplung von Online SPE und Raman Detektion

Die Anwendungsbeispiele der Multimethode für Arzneimittel, der Hormone und der Neonico-tinoide zeigen, dass die Online SPE alternativ zur händischen SPE in Methoden zur Analyse von Spurenstoffen integriert werden kann.

Spezielle Tools wie das Methodenentwicklungskit ermöglichen auch eine Automatisierung bei der Entwicklung neuer Methoden und können so den Kosten- und Personalaufwand reduzieren.

Das Ansetzen von Qualitätskontrollen für die Laborwiederfindung der händischen SPE entfällt, weil die Kalibrationsreihe ohne zusätzlichen Aufwand mit der gleichen Analysenmethode wie die Proben gemessen wird. Damit sind die Wiederfindungsraten der SPE direkt in der Kalibration berücksichtigt, so dass auf Korrekturfaktoren für Proben mit geringer WFR verzichtet werden kann.

Die automatisierte Festphasenextraktion reduziert das benötigte Volumen zur Anreicherung und Analyse, weil die Probe vollständig auf die chromatografische Säule übertragen wird. Verdünnungseffekte durch die Injektion aus einem größeren Volumen entfallen. So können mit einem reduzierten Volumen vergleichbare Anreicherungsfaktoren wie bei der Offline SPE erreicht werden. Um beispielsweise einen Anreicherungsfaktor von 1.000 zu erzielen, wird in der Offline SPE üblicherweise 1 L auf 1 mL angereichert, davon werden 10 µL injiziert. Bei der Online SPE werden 10 mL injiziert und vollständig auf die chromatografische Säule übertragen, so dass der effektive Anreicherungsfaktor trotz des unterschiedlichen Probenvolumens gleich bleibt.

Nicht nur die Anreicherung ist eine Stärke der Online SPE, sie kann gleichzeitig auch zur Aufreinigung genutzt werden, um störende Matrixbestandteilen aus der Probe zu eliminieren. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, das selektive Massenspektrometer durch andere, kostengünstige Systeme wie z. B. Raman Detektorsysteme zu ersetzen oder zum Zwecke der Strukturaufklärung zu ergänzen.

Die Anwendungsbeispiele mit großem Injektionsvolumen in Abschnitt 2.2.7 zeigen, dass mit der Online SPE auch große Anreicherungsfaktoren erreicht werden können. Für die Auswahl des angeschlossenen Detektors ist damit die Sensitivität nicht mehr das Hauptauswahlkriterium. Zudem eröffnet diese Art der automatisierten Probenvorbereitung auch die Analyse nicht ionisierbarer Substanzen, die für eine massenspektrometrische Detektion ungeeignet sind.

2.3 Entwicklung und Anpassung der chromatografischen Methoden

Die Entwicklung chromatografischer Methoden zur Trennung unterschiedlicher Analyten bzw. Stoffgruppen und anschließender Detektion mittels Raman-Spektroskopie stellt eine besondere Herausforderung dar. Durch den Raman-Detektor werden eine Vielzahl chromatografischer Parameter im Vorfeld der Analytik definiert. Diese Parameter können im Rahmen der Methodenentwicklung nicht zur Lösung eines Trennproblems variiert bzw. optimiert werden. Zusätzlich verursachen organische Lösungsmittel wie beispielsweise Acetonitril (ACN), welche gewöhnlich in der Umkehrphasen-Chromatografie eingesetzt werden, mitunter sehr starke Raman-Signale. Aufgrund dieser Untergrundsignale wird die Datenauswertung erschwert bzw. ist in vielen Fällen nicht möglich. Zur Reduzierung des durch organische Lösungsmittel bedingten Untergrundrauschens kann eine wässrige mobile Phase verwendet werden. Dies ist jedoch meist nur für einfache Gemische (≤ 10 Analyten), welche polare Analyten enthalten, eine Alternative. Komplexe Substanzgemische, welche auch unpolare Analyten beinhalten, können in der Regel nur über eine Umkehrphase getrennt bzw. eluiert werden, wenn organische Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol (MeOH) verwendet werden. Durch die im Vorfeld der Antragstellung des Forschungsvorhabens durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass Acetonitril bis zu einem Volumenanteil von 25 % in der mobilen Phase genutzt werden kann, ohne dass es zu starken Beeinflussungen der Raman-Spektroskopie gekommen ist. Wird im Vergleich dazu Methanol der mobilen Phase zugesetzt, ist sogar ein Volumenanteil von 50 % für die Raman-Spektroskopie unproblematisch. Um die Elutionsstärke der mobilen Phase weiter zu erhöhen, kann die Raman-Spektroskopie mit der Hochtemperatur-Flüssigkeitschromatografie kombiniert werden. Infolgedessen besteht die Möglichkeit, Lösungsmittelgradienten durch Temperaturgradienten zu ersetzen [32-34]. Durch die Kombination beider Techniken kann nicht nur der organische Anteil in der mobilen Phase individuell angepasst, sondern auch die Elutionsstärke der mobilen Phase bei definierter Zusammensetzung deutlich erhöht werden. Dadurch können auch unpolare Analyten wie beispielsweise Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) über eine Umkehrphase eluiert werden.

Eine weitere Besonderheit in Bezug auf die chromatografische Methodenentwicklung stellt die Anwendung der oberflächenverstärkten Ramanstreuung (SERS - Surface Enhanced Raman Scattering) dar. Mit dieser Technik kann durch den Einsatz von Metall-Kolloiden eine Verstärkung des Raman-Signals um den Faktor 1×10^{10} bis 1×10^{11} erreicht werden [35-37]. In Bezug auf die Entwicklung chromatografischer Methoden sind hierbei besonders der pH-Wert der mobilen Phasen als auch der Zusatz von Additiven wie beispielsweise Salzen von entscheidender Bedeutung. Eine geringfügige Veränderung dieser Parameter hat direkten Einfluss auf das Zetapotential und definiert somit die Stabilität der kolloidalen Lösungen [38]. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Entwicklung und Anpassung der chroma-

tografischen Methoden von folgenden Faktoren, welche von dem Raman-Detektor definiert werden, abhängig sind:

- von der Art des organischen Lösungsmittels (z. B. protisch, aprotisch),
- von der Zusammensetzung der mobilen Phase,
- von dem pH-Wert der mobilen Phase und den Puffersubstanzen,
- von Additiven, wie z. B. Salzen, Ionen-Paar-Reagenzien,
- von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase.

Aufgrund der komplexen wechselseitigen Abhängigkeiten der einzelnen chromatografischen Parameter sollte die Methodenentwicklung im Rahmen der Kopplung von Flüssigkeitschromatografie und Raman-Spektroskopie systematisch erfolgen. Eine empirische Methodenentwicklung, basierend auf einem „trial-and-error“ Konzept, wie dies häufig in der Laborroutine durchgeführt wird, ist hier nicht praktikabel.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieses Forschungsvorhabens verschiedene kommerzielle als auch frei verfügbare akademische Methodenentwicklungstools angewendet und untersucht. Ziel dieser Versuche war die Beurteilung der Präzision von Retentionszeitvorhersagen, der Vergleich der Anzahl der erforderlichen Basisexperimente in Abhängigkeit der verwendeten Retentionsmodelle als auch die Beurteilung der Handhabung der einzelnen Softwaretools. Die eingesetzten Softwarepakete werden nachfolgend vorgestellt und beschrieben.

2.3.1 Methodenentwicklungstools

2.3.1.1 Kommerzielle Software-Pakete

2.3.1.1.1 DryLab

Die Entwicklung von DryLab geht auf das Jahr 1986 zurück. In den Bereichen der pharmazeutischen und chemischen Industrie wird DryLab zur Methodenentwicklung bereits seit ca. 30 Jahren in Laboratorien weltweit eingesetzt. Mit Hilfe von DryLab besteht die Möglichkeit, auf Grundlage von zwei Basismessungen die chromatografischen Bedingungen zu verändern, die Bedingungen zu optimieren und die Robustheit der Methode vorherzusagen. Die Anwendung von DryLab für die flüssigkeitschromatografische Methodenentwicklung wurde in zahlreichen Studien dokumentiert [39-44]. Hoang et al. konnten eindrucksvoll zeigen, dass mit nur wenigen Eingangsdatensätzen eine optimale Trennung einer Wirkstoffsubstanz und deren Metaboliten simuliert werden konnte [42]. Der Fehler der Vorhersage der Retentionszeiten belief sich im Durchschnitt auf 3,5 %, verglichen mit den experimentell bestimmten Retentionszeiten. In der Arbeit von Makarov et al. konnten die Retentionszeiten von 17- α -Ethinylestradiol und sechs weiteren strukturell ähnlichen Substanzen bis auf einen Fehler von kleiner 1 % simuliert werden [43]. Die Basis für die Software stellt dabei das von Lloyd R. Snyder et al. entwickelte linear-solvent-strength (LSS) Modell dar [45], welches die Retention in der Umkehrphasen-Chromatografie gemäß Gleichung (1) beschreibt.

$$\log k = \log k_w - S\varphi \quad (1)$$

Dabei ist k der Retentionsfaktor, k_w der extrapolierte Retentionsfaktor für Wasser als mobile Phase, S die Konstante für einen gegebenen gelösten Stoff und φ der Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase. Auf Grundlage von „resolution maps“ kann der Einfluss unterschiedlicher chromatografischer Parameter auf die kritische Auflösung beurteilt werden. Die theoretischen Grundlagen, welche der Funktion von DryLab zugrunde liegen, sind in der Literatur gut dokumentiert [39-41,45,46]. Das Programm wurde sowohl für die Entwicklung isokratischer Methoden als auch für Methoden mit einem Lösemittelgradienten entwickelt. Generell erlaubt die Software dem Anwender eine simultane Optimierung von zwei Variablen, wobei drei Kombinationsmöglichkeiten bestehen. Zum einen können die mobile Phase und die Temperatur, die mobile Phase und der pH-Wert, sowie die Temperatur und der pH-Wert zeitgleich simuliert werden, wobei sich die letzte Kombinationsmöglichkeit

als wenig zufriedenstellend herausgestellt hat [42]. Eine neue Version von DryLab, DryLab 2010 Version 4.0, ermöglicht die simultane Optimierung von drei Parametern unter Einbeziehung eines Temperaturgradienten.

2.3.1.1.2 ChromSword

Als eine Erweiterung der Vorläuferversion ChromDream, ist ChromSword seit 1990 kommerziell verfügbar und wird seit dem kontinuierlich weiterentwickelt [47]. Ähnlich wie DryLab nutzt auch ChromSword das LSS Modell (siehe Gleichung (1)) als Grundlage für die Simulation von Retentionszeiten. Zusätzlich verwendet ChromSword eine Regressionstechnik zur Erstellung von „quantitative structure-retention relationship“ (QSRR) [48], um den Zusammenhang zwischen Substanzstruktur und chromatografischem Verhalten herzustellen. Isokratische Vorhersagen mit ChromSword beruhen nicht nur auf dem LSS Modell, sondern auch auf dem „two-layer continuum model“ des chromatografischen Systems. Dieses Modell berechnet die Retentionszeiten gemäß Gleichung (2).

$$\ln k = a(V)^{\frac{2}{3}} + b(\Delta G) + c \quad (2)$$

Hier ist V das molekulare Volumen des gelösten Stoffes, ΔG die Energie der Interaktion zwischen dem Stoff und Wasser und a, b, c stellen Regressionsparameter dar, welche sich durch die Datenanpassung ergeben [39,49]. ChromSword verfügt über einen Online und einen Offline Modus. Im Online Modus erfolgt eine durch die Software voll-automatisierte Methodenentwicklung [49]. Im Offline Modus können Vorhersagen über die Retentionszeiten der Analyten mit mindestens zwei chromatografischen Basismessungen getroffen werden. Analog zu DryLab kann eine simultane Optimierung von zwei chromatografischen Parametern (Temperatur, organischer Anteil in der mobilen Phase, pH-Wert der mobilen Phase) erfolgen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das chromatografische Verhalten der Analyten auf Grundlage der chemischen Struktur vorherzusagen. Baczek et al. konnten jedoch zeigen, dass keine akzeptablen Ergebnisse für die Vorhersagen der Retentionszeiten für neutrale Substanzen erzielt werden, wenn nur die Strukturformeln gegeben sind [39]. Um eine erste Einschätzung über die chromatografischen Parameter zu treffen, ist diese Vorgehensweise in den meisten Fällen ausreichend. In der zitierten Studie [39] konnte die Präzision der Retentionszeitvorhersage der Analyten durch hinzufügen von zwei chromatografischen Eingangsdatensätzen deutlich verbessert werden. Im Jahr 2009 konnten Skalicka-Wozniak et al. zeigen, dass allein auf Grundlage der Strukturformel von Cumarin die Methodenentwicklung durchgeführt werden kann [50]. Im Vergleich zu DryLab existieren weniger wissenschaftliche Studien, welche die Anwendung von ChromSword beschreiben [50-52]. In einer Studie von Baczek et al. [39] wurden die Programme ChromSword und DryLab miteinander verglichen. Die erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass beide Software-Pakete

sehr präzise und identische Retentionszeiten für isokratische Trennungen liefern. Als Eingangsdatensätze wurden hier zwei chromatografische Läufe verwendet [39]. Skalicka-Wozniak et al. setzten für ihre Arbeit eine Kombination der beiden Software-Programme ein. Mit Hilfe von ChromSword wurden die chromatografischen Parameter zur Trennung von Cumarinen anhand ihrer Strukturformeln ermittelt, die weitere Optimierung der Trennung erfolgte mittels DryLab [50].

2.3.1.2 Akademische Software-Pakete und Tools

2.3.1.2.1 Nikitas-Tools

Das von Pappa-Louisi und Nikitas [53,54] entwickelte Programm bezieht erstmalig Temperaturgradienten in die Vorhersage von Retentionszeiten ein. Dies ermöglicht die simultane Vorhersage von Retentionszeiten bei Anwendung von Multigradienten unter Berücksichtigung des Lösungsmittels, der Temperatur und der Fließgeschwindigkeit. Im Jahr 2008 demonstrierten Nikitas et al., dass unter Verwendung von vier Temperaturgradienten und einem Lösungsmittelgradienten als Basismessungen die Retentionszeiten, verglichen mit den experimentellen Retentionszeiten, von sechs Alkylbenzenen bis auf einen Fehler von kleiner 2 % vorhergesagt werden konnten [53]. In der Studie von Pappa-Louisi et al. wurden 12 *o*-Phthalaldehyd-Derivate erfolgreich mit Hilfe von kombinierten Lösungsmittel-, Temperatur- und Flussgradienten getrennt [55]. Der Fehler der Vorhersage der Retentionszeiten, im Vergleich zu den experimentell ermittelten, lag im Durchschnitt bei 2,9 %. Zur Vorhersage der Retentionszeiten werden verschiedene Retentionsmodelle, je nach Art und Anzahl der Eingangsdatensätze, verwendet. Die in diesem Projekt angewendeten Retentionsmodelle sind in den Gleichungen (3) bis (7) aufgeführt.

$$\ln k = c_1 + c_2 \varphi \quad (3)$$

$$\ln k = c_1 + c_2 \varphi + c_3 \varphi^2 \quad (4)$$

$$\ln k = c_1 - \frac{c_2 \varphi}{1 + c_3 \varphi} \quad (5)$$

$$\ln k = c_1 + c_2 \varphi + \frac{c_3 + c_4 \varphi}{T} \quad (6)$$

$$\ln k = c_1 + \frac{c_2}{T} \quad (7)$$

Dabei sind, c_1, c_2, c_3 und c_4 durch die Mittelwert-Funktion anzupassende Parameter und werden von dem Programm berechnet. T stellt hier die Temperatur in Kelvin dar. Die theoretischen Hintergründe der einzelnen Retentionsmodelle wurden von Nikitas ausführlich be-

schrieben [56]. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe Nikitas in ihren Studien zeigen, dass durch die entwickelten numerischen Lösungsansätze die Retentionszeiten von 13 *o*-Phthalaldehyd-Derivaten präzise vorhergesagt werden [56]. Eine Besonderheit stellt die rationale Funktion aus Gleichung (5) dar, welche bereits 2004 von Pappa-Louisi et al. vorgestellt wurde [57]. Mit ihr soll es möglich sein, das Retentionsverhalten der Analyten genauer ableiten zu können und die Vorhersagen der Retentionszeiten, im Vergleich zu Gleichung (4), zu verbessern. Im Allgemeinen ergab die Literaturrecherche, dass das Software-Programm hauptsächlich in der Arbeitsgruppe um Nikitas Anwendung findet.

2.3.1.2.2 PREGA

Vor mehr als 20 Jahren wurde die Software PREGA von Rafael Cela Torrijos entwickelt und kostenlos zur Verfügung gestellt. Dementsprechend existieren eine Vielzahl von Studien, welche die Anwendung von PREGA im Zusammenhang mit analytischen Trennproblemen beschreiben, obgleich viele dieser Arbeiten auf die Arbeitsgruppe um Cela an der Universität De Santiago De Compostela zurückzuführen sind. Garcia-Lavandeira et al. konnten die optimalen Trennbedingungen von 23 aromatischen Amiden aus der Textil- und Lederproduktion durch die Anwendung von PREGA bestimmen [58]. Durch die Erfahrungen, welche die Arbeitsgruppe im Laufe der Jahre sammeln konnte, entstand eine Methodenentwicklungssoftware, mit der es möglich ist, simultan mehrere Parameter, wie die Zusammensetzung der mobilen Phase, die Temperatur, den pH-Wert der mobilen Phase, den Zusatz von Additiven als auch die Fließgeschwindigkeit mit einzubeziehen und diese zu verändern und zu optimieren (www.usc.es/gcqprega). In den Arbeiten von Cela et al. [59] und Garcia-Lavandeira et al. [60] sind die Grundlagen der chemometrischen Methode anschaulich zusammengefasst. Die rechnerunterstützte Methodenentwicklung (Computer aided method development, CAMD), welche PREGA anwendet, basiert auf einem zweistufigen Verfahren. Zunächst werden Retentionsmodelle der Analyten auf der Basis von isokratischen Datensätzen mit dem Data Manager (DM) Modul erstellt. Für die Simulation der Retentionszeiten der Analyten in Abhängigkeit des organischen Anteils in der mobilen Phase stehen ein lineares als auch ein quadratisches Modell wie in den Gleichungen (3) und (4) dargestellt zur Verfügung. Die Abhängigkeit der Retention der Analyten von der Temperatur wird ebenfalls mit Hilfe eines einfachen linearen Retentionsmodells, wie dies zum Beispiel in Gleichung (7) dargestellt ist, berechnet. Die Retentionsmodelle erlauben jedoch keine Extrapolation außerhalb des Bereichs der experimentellen Daten, deshalb werden die Modelle durch Eingabe von experimentellen Gradientendaten erweitert und rekaliert [58]. In dem zweiten in PREGA integrierten Modul, dem Optimization Module (OPT), wird das ausgewählte Retentionsmodell zur Vorhersage von Retentionszeiten und für die Optimierung der chromatografischen Trennung verwendet. Mit Hilfe von verschiedenen Zielfunktionen, welche auf einem evolutionären Algo-

rithmus basieren, kann die Optimierung unter isokratischen Bedingungen oder mit Gradienten aller Arten (linearer Gradient, konkaver bzw. konvexer Gradient, multilinearer Gradient oder Stufengradient) erfolgen. Dabei können diese Funktionen eine der sogenannten chromatografischen Antwortfunktionen (CRF, chromatographic response function) sein. Die meisten CRF wurden in den 1980er Jahren entwickelt und in zahlreichen Studien diskutiert [61-63]. PREGA ist nach Wissen des Entwicklers Cela et al. (2013) die einzige Software, welche zusätzlich zu den CRF eine Pareto-Front zur Optimierung der chromatografischen Parameter verwenden kann [59]. Eine weitere Option von PREGA ist die Berücksichtigung der Massenspektrometrie als Detektionseinheit in der Flüssigkeitschromatografie. Dazu sind spezielle Multizielefunktionen entwickelt worden, welche das Potential der spektralen Interferenzen zwischen dem Quantifizierer und Verifizierer berücksichtigen. Auch die Hochtemperatur-HPLC wird durch die neue Version von PREGA 7.0 unterstützt [60,64].

2.3.2 Chromatografische Messmodi für die HPLC-Raman-Kopplung

Da durch die Raman-Spektroskopie bereits eine Vielzahl der für die Methodenentwicklung verfügbaren chromatografischen Parameter definiert wird, stehen diese nicht mehr zur Methodenentwicklung und Optimierung zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll und notwendig, die Methodenentwicklung auf die Parameter Lösungsmittel und Temperatur zu konzentrieren, wodurch sich die in Abbildung 2-20 dargestellten chromatografischen Messmodi ergeben.

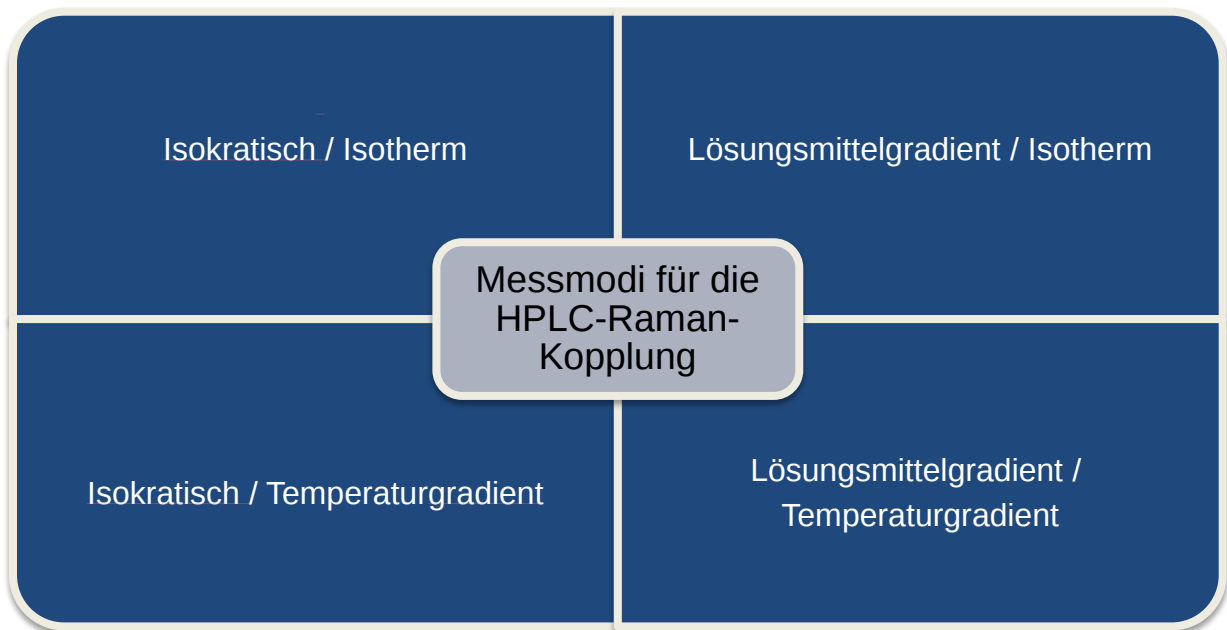


Abbildung 2-20: Übersicht der bevorzugten chromatografischen Messmodi für die HPLC-Raman-Kopplung.

Um die Leistungsfähigkeit der in Abschnitt 2.3.1 vorgestellten Methodenentwicklungstools miteinander vergleichen zu können, wurde besonderes Augenmerk auf die für die Tools erforderlichen Eingangsdatensätze gelegt. Nur durch die Verwendung der gleichen chromatografischen Daten können die Tools als auch die verwendeten Retentionsmodelle miteinander verglichen und bewertet werden. Die daraus resultierende Methodenmatrix ist in Tabelle 2-6 dargestellt. Hier kann ebenfalls abgelesen werden, welche Eingangsdatensätze die einzelnen Methodenentwicklungstools benötigen.

Tabelle 2-6: Vergleich der Software-Programme DryLab, ChromSword, Nikitas und PREGA anhand einer Methodenmatrix. Hierbei bedeuten: ✓: eine Vorhersage ist mit den Datensätzen möglich, - : eine Vorhersage ist nicht möglich, (✓): eine Vorhersage ist mit der neuen Version DryLab 2010 Version 4.0 möglich, ✓*: Vorhersage ist möglich, es werden zusätzliche Gradientendaten benötigt.

Softwaretool	Chromatografischer Messmodus (Anzahl der verwendeten Basismessungen)						
	Isokratisch (2)	Isokratisch (3)	Isokratisch (4)	Isotherm (2)	Lösungsmittel- gradient/Isotherm (4)	Isokratisch/Temperatur- gradient (variabel)	Lösungsmittel- gradient/Temperatur- gradient (variabel)
DryLab	✓	✓	✓	✓	✓	(✓)	-
ChromSword	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
Nikitas	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓
PREGA	✓*	✓*	✓*	✓*	✓*	✓*	✓*

2.3.3 Generierung der erforderlichen Eingangsdatensätze (Basisdaten)

2.3.3.1 Verwendete Trennsäulen

Zur Aufnahme der erforderlichen chromatografischen Eingangsdatensätze wurden zwei hochtemperaturstabile C-18 Umkehrphasen auf Basis von Hybrid-Silika-Partikeln verwendet. Vorteil dieses Phasenmaterials ist, dass Temperaturen bis 150 °C angewendet werden können, ohne dass es zu einem Abbau des Phasenmaterials kommt [65]. Dadurch ist sichergestellt, dass die Präzision der Vorhersage der Retentionszeiten durch die Softwaretools nicht durch einen Abbau des Trennsäulenmaterials beeinflusst bzw. verfälscht wird. Die Dimensionen der im Rahmen dieses Forschungsvorhabens eingesetzten Trennsäulen sind in Tabelle 2-7 zusammengefasst.

Tabelle 2-7: Verwendete Trennsäulen zur Aufnahme der erforderlichen Basisdaten.

Trennsäule	Länge in mm	Durchmesser in mm	Partikelgröße in µm	Porengröße in Å
Waters Acquity C-18	50	2,1	1,7	135
Waters XBridge C-18	50	2,1	2,5	135

2.3.3.2 Ausgewählte Analytgemische

Im Rahmen der Evaluierung der Methodenentwicklungstools sollten unterschiedliche Polaritätsbereiche der Analyten als auch unterschiedliche Wechselwirkungsmechanismen berücksichtigt werden, so dass zwei unterschiedliche Analytgemische verwendet wurden. Für die Untersuchung von polaren Komponenten wurde ein Mix bestehend aus acht Sulfonamiden und Trimethoprim genutzt. Bei diesem Analytgemisch spielt der pH-Wert der mobilen Phase eine entscheidende Rolle und hat direkt Einfluss auf die Retention. Weiterhin sind zur Elution dieser polaren Analyten lediglich ein sehr geringer organischer Anteil in der mobilen Phase ($\leq 10\%$) sowie relativ geringe Temperaturen (ca. 40 °C bis 100 °C) erforderlich. Im Vergleich dazu wurde für die Untersuchung von unpolaren Komponenten ein Gemisch bestehend aus vier PAKs herangezogen. Der pH-Wert der mobilen Phase hat bei diesen Analyten keinen Einfluss auf die Retention, da diese ausschließlich auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert. Zur Elution dieser Analyten sind ein höherer organischer Anteil in der mobilen Phase ($\geq 20\%$) als auch höhere Temperaturen ($\geq 100\text{ °C}$) erforderlich. Die exakte Zusammensetzung beider Testgemische ist in Tabelle 2-8 zusammengefasst.

Tabelle 2-8: Auflistung der Substanzen der verwendeten Testgemische.

Test-Mix	Substanz	Summenformel	CAS-Nummer
Sulfonamide	N-Acetylsulfadiazin	$C_{12}H_{12}N_4O_3S$	127-74-2
	N-Acetylsulfamerazin	$C_{13}H_{14}N_4O_3S$	127-73-1
	N-Acetylsulfamethazin	$C_{14}H_{16}N_4O_3S$	100-90-3
	Sulfadiazin	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	22199-08-2
	Sulfamerazin	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$	127-79-7
	Sulfamethazin	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	57-68-1
	Sulfamethoxazol	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	723-46-6
	Sulfathiazol	$C_9H_9N_3O_2S_2$	72-14-0
PAKs	Trimethoprim	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	738-70-5
	Naphthalin	$C_{10}H_8$	91-20-3
	Pyren	$C_{16}H_{10}$	129-00-0
	Chrysen	$C_{18}H_{12}$	218-01-9
	Dibenzo(a,h)anthracen	$C_{22}H_{14}$	53-70-3

2.3.3.3 Isokratische / Isotherme Basismessungen

Für die Generierung der isokratischen / isothermen Basisdaten der Sulfonamide wurde ein Temperaturbereich von 10 °C bis 100 °C gewählt. Die Temperatur wurde in einem Intervall von 10 °C variiert. Die mobile Phase bestand aus Wasser/Acetonitril, wobei der Acetonitrilanteil von 0 % auf 50 % (v/v) in einem Intervall von 5 % erhöht wurde.

Im Vergleich dazu wurde ein Temperaturbereich von 10 °C bis 150 °C für die Basismessungen des PAK-Testgemisches betrachtet. Von 10 °C bis 40 °C wurde die Temperatur in einem Intervall von 10 °C erhöht. Zusätzlich sind Messungen bei Temperaturen von 80 °C, 120 °C und 150 °C durchgeführt worden. Auch hier wurde eine mobile Phase bestehend aus Wasser/Acetonitril verwendet. Der Acetonitrilanteil wurde in einem Bereich von 20 % bis 90 % in einem Intervall von 5 % variiert. Jedoch konnten nicht für alle Analyten bei jeder Temperatur und Zusammensetzung der mobilen Phase Retentionsdaten erhoben werden. Experimente wurden nur durchgeführt, wenn abgeschätzt werden konnte, dass die Analysendauer ≤ 60 Minuten war.

2.3.3.4 Lösungsmittelgradientenmessungen unter isothermen Bedingungen

Die isothermen Messungen mit Lösungsmittelgradienten der Sulfonamide wurden bei Temperaturen von 10 °C, 40 °C, 70 °C und 100 °C durchgeführt. Bei diesen Temperaturen sind jeweils Lösungsmittelgradienten von 2 % Acetonitril auf 50 % Acetonitril in 10 min, 20 min und 30 min angewendet worden.

Für die isothermen Messungen mit Lösungsmittelgradienten der PAKs wurde ein Temperaturbereich von 10 °C bis 150 °C ausgewählt. In dem Bereich von 10 °C bis 40 °C wurde die Temperatur in einem Intervall von 10 °C variiert. Zusätzlich wurden Messungen bei 80 °C, 120 °C und 150 °C durchgeführt. Analog zu den Messungen der Sulfonamide wurde hier eine mobile Phase aus Wasser/Acetonitril genutzt und Lösungsmittelgradienten von 20 % Acetonitril auf 95 % Acetonitril untersucht.

2.3.3.5 Kombinierte Lösungsmittel- und Temperaturgradientenmessungen

Die Anwendung simultaner Lösungsmittel- und Temperaturgradienten wurde lediglich für die stark unpolaren PAK untersucht. Messungen mit dem Sulfonamid-Mix waren nicht sinnvoll, da der Einfluss des Temperaturgradienten auf die Retention für diese stark polaren Analyten unter den gewählten chromatografischen Bedingungen nicht abgebildet werden kann. Die Retention dieser Analyten war auf der ausgewählten Trennsäule, bedingt durch die Anwendung von Temperaturgradienten, zu gering. Die beobachteten Fehler lagen hier im Bereich der Messunsicherheit des chromatografischen Systems.

Für die stark unpolaren Komponenten des PAK-Testgemisches wurde analog zu den vorigen Versuchen eine mobile Phase aus Wasser/Acetonitril verwendet. Lösungsmittelgradienten von 20 % Acetonitril auf 95 % Acetonitril in 10 min, 20 min und 30 min wurden angewendet und mit Temperaturgradienten von 10 °C auf 150 °C in 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min und 30 min überlagert.

2.3.4 Vergleich und Bewertung der Methodenentwicklungstools

2.3.4.1 Isokratische / Isotherme Retentionszeitvorhersagen

In einem ersten Schritt erfolgte der Vergleich der durch die Softwaretools vorhergesagten Retentionszeiten in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Anzahl an Basisdaten. Wie Tabelle 2-6 verdeutlicht, sind alle Programme mit Ausnahme von PREGA in der Lage, isotherme / isokratische Retentionszeitvorhersagen auf Grundlage von zwei oder mehr isokratischen Messpunkten durchzuführen. Auch die Software PREGA ermöglicht diese Art der Retentionszeitvorhersagen, jedoch sind zusätzlich zu den isokratischen / isothermen Basisdaten mindestens zwei Gradientenmessungen erforderlich, um das verwendete Retentionsmodell zu rekalisieren (siehe 2.3.1.2.2). Vor diesem Hintergrund wird PREGA bei diesem Vergleich nicht berücksichtigt. Weiterhin unterscheiden sich die Softwaretools dahingehend, dass ChromSword keine Extrapolation über den Bereich der experimentellen Daten hinaus zulässt. Alle anderen Tools unterstützen eine Extrapolation über den Bereich der experimentellen Daten hinaus.

2.3.4.1.1 Retentionszeitvorhersagen auf Grundlage von zwei Messungen in Abhängigkeit des organischen Anteils in der mobilen Phase

Zunächst sollen die Ergebnisse für die Vorhersagen der Retentionszeiten, welche mit zwei chromatografischen Datensätzen und auf Anwendung des linearen Retentionsmodells (siehe Gleichungen (1) und (3)) beruhen, diskutiert werden. Dazu ist in Abbildung 2-21 ein Vergleich der durch die Programme vorhergesagten mit den experimentell ermittelten Retentionszeiten dargestellt. Die in Abbildung 2-21 vorhergesagten Retentionszeiten basieren auf chromatografischen Daten bei Temperaturen von 40 °C und 50 °C und einem Acetonitrilanteil von 5 % und 15 % in der mobilen Phase. Vorhergesagt wurden die Retentionszeiten der Sulfonamide für 40 °C und 10 % ACN (Abbildung 2-21 a), 40 °C und 20 % ACN (Abbildung 2-21 b) als auch für 50 °C und 10 % ACN (Abbildung 2-21 c), 50 °C und 20 % ACN (Abbildung 2-21 d). Bei einer exakten Übereinstimmung der vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten liegen alle Datenpunkte auf der Winkelhalbierenden ($y = x$). Abbildung 2-21 verdeutlicht, dass nahezu identische Retentionszeiten bei Verwendung des gleichen Retentionsmodells durch die Programme vorhergesagt werden. Für den Fall, dass die Retentionszeiten durch Interpolation ermittelt wurden, wie dies der Fall für Abbildung 2-21 a und c bei 10 % ACN ist, liefert die Vorhersage längere Retentionszeiten im Vergleich zu den experimentellen Retentionszeiten. Die Datenpunkte liegen hier oberhalb der Winkelhalbierenden. Im Vergleich dazu werden für vorhergesagte Retentionszeiten, welche auf einer Extrapolation der Basisdaten beruhen (Abbildung 2-21 b und d) stets kürzere Retenti-

onszeiten im Vergleich zu den experimentellen Retentionszeiten erhalten. Die Datenpunkte liegen hier unterhalb der Winkelhalbierenden. Die relativen Fehler liegen in einem Bereich von 7,9 % bis 24 % für Retentionszeitvorhersagen basierend auf der Interpolation der Eingangsdaten. Der relative Fehler steigt, wenn die Vorhersage der Retentionszeiten auf einer Extrapolation beruht. Hier werden relative Fehler von 12 % bis 42 % beobachtet. Dabei gilt zu beachten, dass alle untersuchten Programme Fehler in dieser Größenordnung generieren, was zu erwarten war, da alle Programme das gleiche Retentionsmodell verwenden.

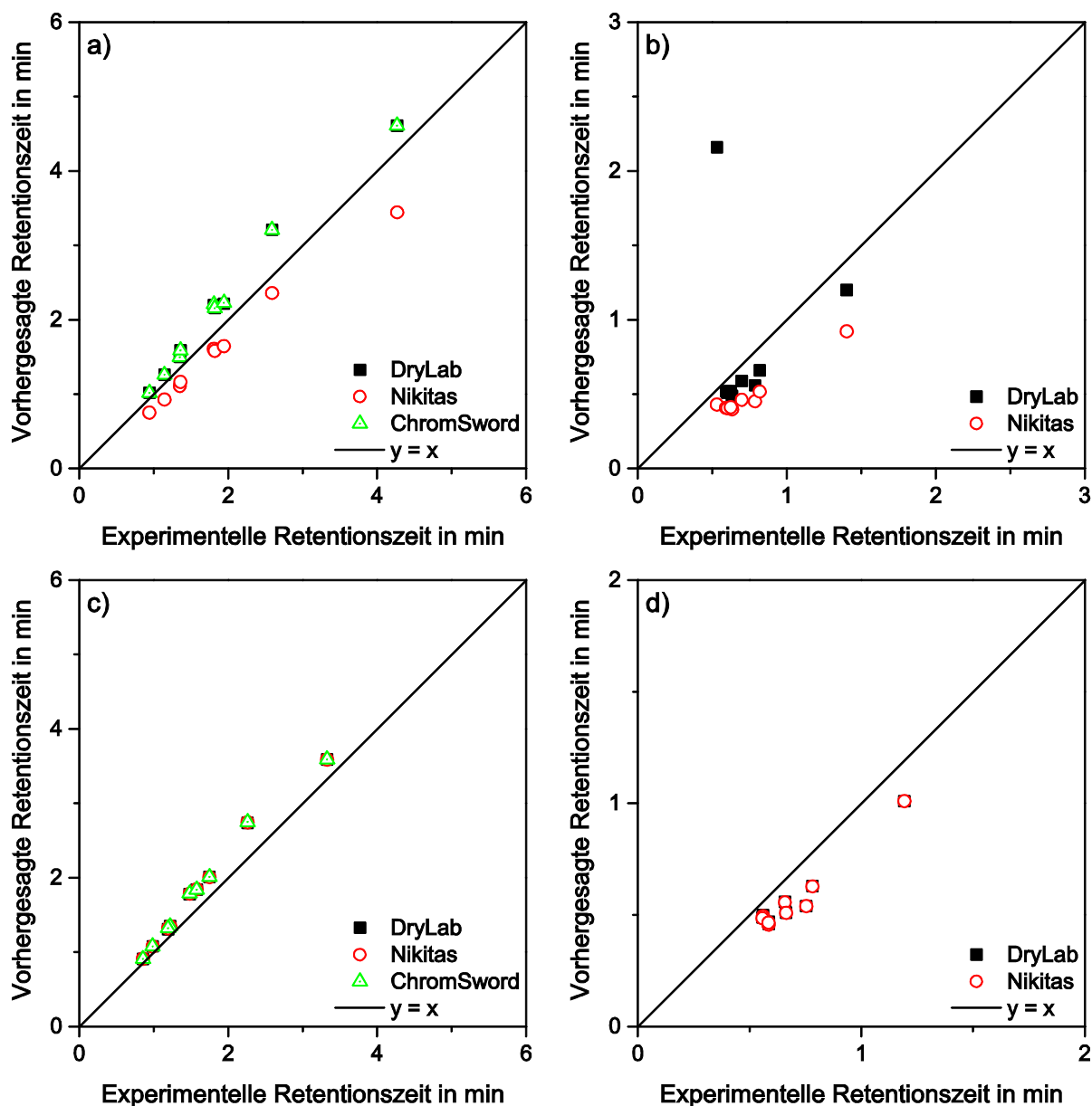


Abbildung 2-21: Vergleich der durch die Softwarepakete vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Sulfonamide für a) 40 °C und 90/10 (v/v), b) 40 °C und 80/20 (v/v), c) 50 °C 90/10 (v/v), d) 50 °C und 80/20 (v/v). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters Acquity C-18 (50 × 2,1 mm; 1,7 µm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril mit jeweils 0,1 % Ameisensäure, a, c) 90/10 (v/v), b, d) 80/20 (v/v). Temperatur: a, c) 40 °C, b, d) 50 °C. Basismessungen für die Retentionsvorhersage: a, b) 95/5 (v/v), 85/15 (v/v) bei 40 °C und c, d) bei 50 °C.

Eine detaillierte Übersicht der relativen Fehler der Retentionszeitvorhersage der Sulfonamide ist im Anhang in Tabelle 5-3 dargestellt.

2.3.4.1.2 Retentionszeitvorhersagen auf Grundlage von drei oder mehr Messungen in Abhängigkeit des organischen Anteils in der mobilen Phase

Anwendung des quadratischen Retentionsmodells (Gleichung (4))

Im nächsten Schritt wurde evaluiert, in wieweit die Präzision der Retentionszeitvorhersage verbessert werden kann, wenn mehr als zwei Eingangsdatensätze für die Simulation verwendet werden. Dazu wurde das in Gleichung (4) dargestellte quadratische Retentionsmodell bei allen Softwaretools herangezogen, welches mindestens drei Basisdatensätze für die Simulation der Retentionszeiten der Sulfonamide erfordert. Abbildung 2-22 zeigt den Vergleich der durch die Programme vorhergesagten und der experimentell ermittelten Retentionszeiten. Die Berechnung der Retentionszeiten der Sulfonamide basiert auf Eingangsdaten bei Temperaturen von 40 °C und 70 °C. Dabei wurden Messungen mit organischen Anteilen in der mobilen Phase von 5 % ACN, 15 % ACN und 25 % ACN berücksichtigt. Vorhergesagt wurden Retentionszeiten der Sulfonamide bei einem Acetonitrilanteil von 10 % in der mobilen Phase bei Temperaturen von 40 °C (Abbildung 2-22 a) und 70 °C (Abbildung 2-22 b). Die Berechnungen beruhen hierbei auf einer Interpolation der Eingangsdatensätze.

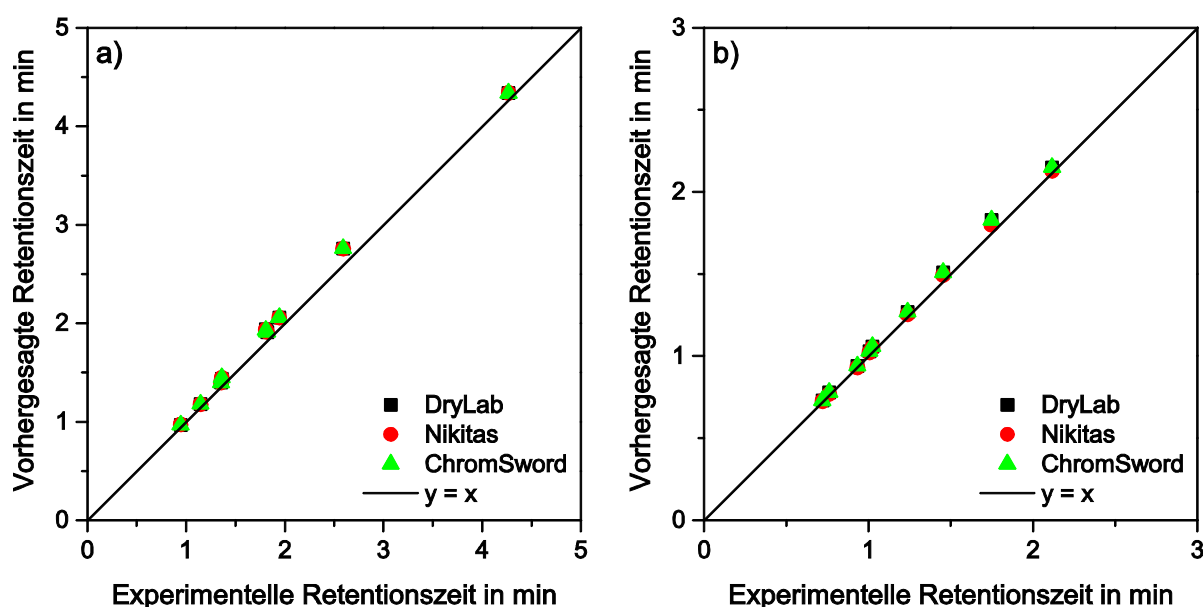


Abbildung 2-22: Vergleich der durch die Softwarepakete vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der Sulfonamide für a) 40 °C und 90/10 (v/v), b) 70 °C und 90/10 (v/v). Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters Acquity C-18 (50 × 2,1 mm; 1,7 µm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril mit jeweils 0,1 % Ameisensäure. Basismessungen für die Retentionsvorhersage: 95/5 (v/v) ACN, 85/15 (v/v) ACN, 75/25 (v/v) ACN bei a) 40 °C und b) 70 °C.

Die Auftragung verdeutlicht, dass nahezu alle Messpunkte auf den entsprechenden Winkelhalbierenden liegen und belegt, dass die durch die Software-Programme vorhergesagten Retentionszeiten sehr gut mit den experimentell ermittelten Retentionszeiten übereinstimmen. Alle Programme berechnen nahezu identische Retentionszeiten. Im Vergleich zur Anwendung eines einfachen linearen Retentionsmodells (siehe 2.3.4.1.1) kann die Präzision der Retentionszeitvorhersage bei Anwendung des quadratischen Modelles deutlich verbessert werden. Die relativen Fehler für die vorhergesagten Retentionszeiten liegen für alle Programme in einem Bereich von 1,1 % bis 7,5 % und somit um einen Faktor 6 bis 11 niedriger als bei Verwendung eines einfachen linearen Retentionsmodells, welches für die Interpolation einen relativen Fehler zwischen 7,9 % und 24 % generiert. Eine detaillierte Übersicht der relativen Fehler der Vorhersage der Retentionszeiten der Sulfonamide ist im Anhang in Tabelle 5-4 dargestellt. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Schneider [66], welcher bestätigen konnte, dass sich die Vorhersagen der Retentionszeiten unter Anwendung des quadratischen Retentionsmodells deutlich verbessern. Darüber hinaus wurde im Rahmen der Evaluierung des quadratischen Retentionsmodells (Gleichung (4)) festgestellt, dass die Verwendung von mehr als drei Basismessungen zur Regression des Modells nicht zu einer Verbesserung der Präzision der Vorhersage der Retentionszeiten führt. Dadurch wird lediglich der experimentelle Aufwand im Vorfeld der Methodenentwicklung erhöht. Ein weiteres Problem bei der Anwendung des quadratischen Retentionsmodelles ergibt sich für die Vorhersage von Retentionszeiten bei steigendem organischem Anteil in der mobilen Phase. Diese Problematik wird ausführlich im nachfolgenden Abschnitt diskutiert.

Anwendung eines rationalen Retentionsmodells (Gleichung (5))

Das in Gleichung (5) dargestellte Retentionsmodell wurde von Pappa-Louisi und Nikitas [57] entwickelt, um physikalisch nicht sinnvolle Lösungen bei Anwendung des quadratischen Ansatzes zu eliminieren. Um diesen Sachverhalt besser erläutern zu können, sind in Abbildung 2-23 die entsprechenden Mittelwertkurven gemäß Gleichung (4) und (5) für N-Acetylsulfamethazin dargestellt. Dabei ist gut zu erkennen, dass das quadratische Modell ein lokales Minimum besitzt, wodurch es zu starken Abweichungen bei der Vorhersage von Retentionszeiten bei einem hohen organischen Anteil in der mobilen Phase kommt. Als Beispiel sei hier die Vorhersage der Retentionszeit bei einem Acetonitrilanteil von 40 % in der mobilen Phase genannt. Wird hier eine Simulation auf Grundlage des quadratischen Modells durchgeführt, ergeben sich ähnliche Retentionsfaktoren wie für einen Acetonitrilanteil von 15 % in der mobilen Phase (siehe Abbildung 2-23). Dies ist für das hier vorliegende Phasensystem nicht möglich, da bei der Umkehrphasen-Chromatografie der Retentionsfaktor mit steigendem organischem Anteil in der mobilen Phase stets kleiner wird. Im Vergleich zu dem

quadratischen Retentionsmodell (Gleichung (4)) besitzt die von Nikitas und Pappa-Louisi entwickelte mathematische Beziehung kein Minimum (Gleichung (5)). Der physikalische Verlauf des Retentionsfaktors der Analyten wird, in Abhängigkeit des organischen Anteils in der mobilen Phase, korrekt wiedergegeben.

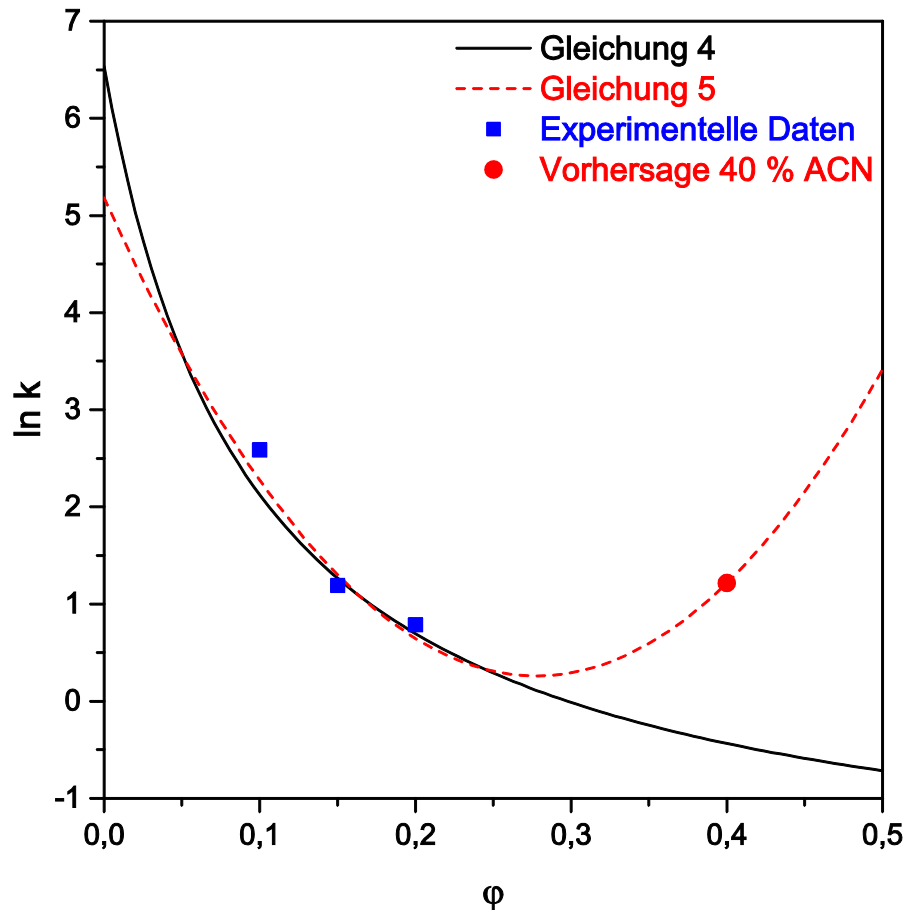


Abbildung 2-23: Verlauf des logarithmischen Retentionsfaktors von N-Acetylsulfamethazin in Abhängigkeit des Acetonitrilanteils in der mobilen Phase. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters Acquity BEH C-18 (50 × 2,1 mm; 1,7 μ m); mobile Phase: Wasser/Acetonitril mit jeweils 0,1 % Ameisensäure; Temperatur: 40 °C.

Im Rahmen der Evaluierung der einzelnen Retentionsmodelle wurde weiterhin festgestellt, dass das von Nikitas und Papa-Louisi vorgestellte Modell (Gleichung (5)) ähnlich wie der quadratische Ansatz (Gleichung (4)) stets präzisere Retentionszeitvorhersagen der Analyten ermöglicht als ein einfaches lineares Modell (Gleichung (3)).

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, wie viele Basismessungen erforderlich sind, um mit dem von Papa-Louisi vorgestellten Modell (Gleichung (5)) bessere Retentionszeitvorhersagen im Vergleich zum quadratischen Modell (Gleichung (4)) zu erzielen. Dazu wurde für die Simulation die Anzahl der verwendeten Eingangsdatensätze um jeweils einen Datensatz erhöht. Erst bei Eingabe von sechs chromatografischen Läufen in das von Nikitas entwickelte Programm konnten bessere Vorhersagen im Vergleich zu dem quadratischen Retentionsmodell erzielt werden. Der relative Fehler lag hier zwischen 2,1 % und 5,3 %.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen für das von Pappa-Louisi entwickelte Retentionsmodell, jedoch müssen für eine präzisere Vorhersage der Retentionszeiten gegenüber dem quadratischen Retentionsmodell sechs chromatografische Eingangsdatensätze verwendet werden. Auch ist die Gleichung von Pappa-Louisi numerisch schwerer zu lösen, wodurch eher Fehler beim Lösen der Gleichung entstehen können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Vorhersagen in ihrer Präzision im Vergleich zu dem quadratischen Retentionsmodell nicht signifikant verbessern. In den Studien der Arbeitsgruppe der Entwickler konnten keine vergleichbaren Ergebnisse abgeleitet werden. Darin wird nicht beschrieben, wie viele Eingangsdaten notwendig sind, sondern nur, dass präzisere Vorhersagen im Vergleich zu dem quadratischen Retentionsmodell möglich sind [56,57].

2.3.4.2 Retentionszeitvorhersagen in Abhängigkeit von Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen

Im Folgenden wird die Vorhersage der Retentionszeiten der PAKs in Abhängigkeit von Lösungsmittelgradienten und der Temperatur (isotherm) betrachtet. Weiterführende Informationen zu den Komponenten des PAK-Testgemischs sind in Tabelle 2-8 zusammengefasst. Die Berechnung der Retentionszeiten der Analyten erfolgt in diesem Abschnitt auf Grundlage von Lösungsmittelgradientendaten und nicht, wie in den Abschnitten 2.3.4.1.1 sowie 2.3.4.1.2 beschrieben, auf Grundlage von isothermen / isokratischen Messungen. Wie in Tabelle 2-6 aufgeführt, unterstützen alle im Rahmen dieses Forschungsvorhabens evaluierten Softwaretools die Simulation von Retentionszeiten in Abhängigkeit eines Lösungsmittelgradienten und der Temperatur. Dabei gilt jedoch zu berücksichtigen, dass das Nikitas-Tool nicht in diesen Vergleich miteinbezogen werden konnte, da auf Grundlage der hier verwendeten Basisdaten die numerische Bestimmung der Parameter der Retentionsmodelle mit Hilfe der Software nicht gelang. Hintergrund ist, dass die zur Datenanpassung verwendeten Lösungsmittelgradienten stets die gleiche Anfangs- und Endkonzentration des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase besitzen und sich lediglich in der Steigung des Lösungsmittelgradienten unterscheiden. Für das Nikitas-Tool scheint es für die numerische Lösung von Vorteil zu sein, wenn sich die Anfangs- und Endkonzentration des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase bei den einzelnen Basisgradienten, zusätzlich zur Gradientensteigung, unterscheiden. Ist dies nicht der Fall, versagt der Lösungsalgorithmus der Software und gibt keine bzw. falsch bestimmte Funktionsparameter aus.

Weiterhin gilt zu beachten, dass die PREGA Software nur bedingt mit den Softwarepaketen DryLab und ChromSword verglichen werden kann, da PREGA zusätzlich isotherme / isokratische Basisdaten zur Rekalibration benötigt. Die Vorhersage der Retentionszeiten bei DryLab und ChromSword beruht ausschließlich auf Gradientendaten. Für den Vergleich der Präzision der Vorhersage der Retentionszeiten der PAKs wurden vier Lösungsmittelgradienten herangezogen. Hierbei wurden Gradienten von 20 % Acetonitril auf 95 % Acetonitril in 10 min und 30 min bei Temperaturen von 40 °C und 120 °C angewendet. Zusätzlich wurden für PREGA isotherme Messungen mit einem Acetonitrilanteil von 45 % und 65 % in der mobilen Phase bei 40 °C und 120 °C in das Retentionsmodell einbezogen. Vorhergesagt wurden Lösungsmittelgradienten von 20 % Acetonitril auf 95 % Acetonitril in 20 min bei Temperaturen von 40 °C und 80 °C.

Abbildung 2-24 zeigt den Vergleich der durch die Programme vorhergesagten mit den experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK. Hier wird deutlich, dass alle Softwareprogramme die Retentionszeiten der PAK mit einer vergleichbaren Präzision vorhersagen. Dies wird auch bei Betrachtung des relativen Fehlers der Retentionszeitvorhersage deutlich. Die geringste Abweichung zwischen Simulation und Experiment wird bei PREGA mit einem rela-

tiven Fehler zwischen 0,7 % und 4 % beobachtet. Bei DryLab beträgt der relative Fehler 0,4 % bis 6,3 %, die Retentionszeitvorhersagen auf Grundlage von ChromSword sind mit einem relativen Fehler zwischen 0,7 % und 7,5 % behaftet. Bei diesem Vergleich muss berücksichtigt werden, dass die Retentionszeitvorhersagen von PREGA auch auf zusätzlichen isothermen / isokratischen Basisdaten beruhen und somit eine höhere Präzision in Bezug auf die Vorhersage der Retentionszeiten zu erwarten war.

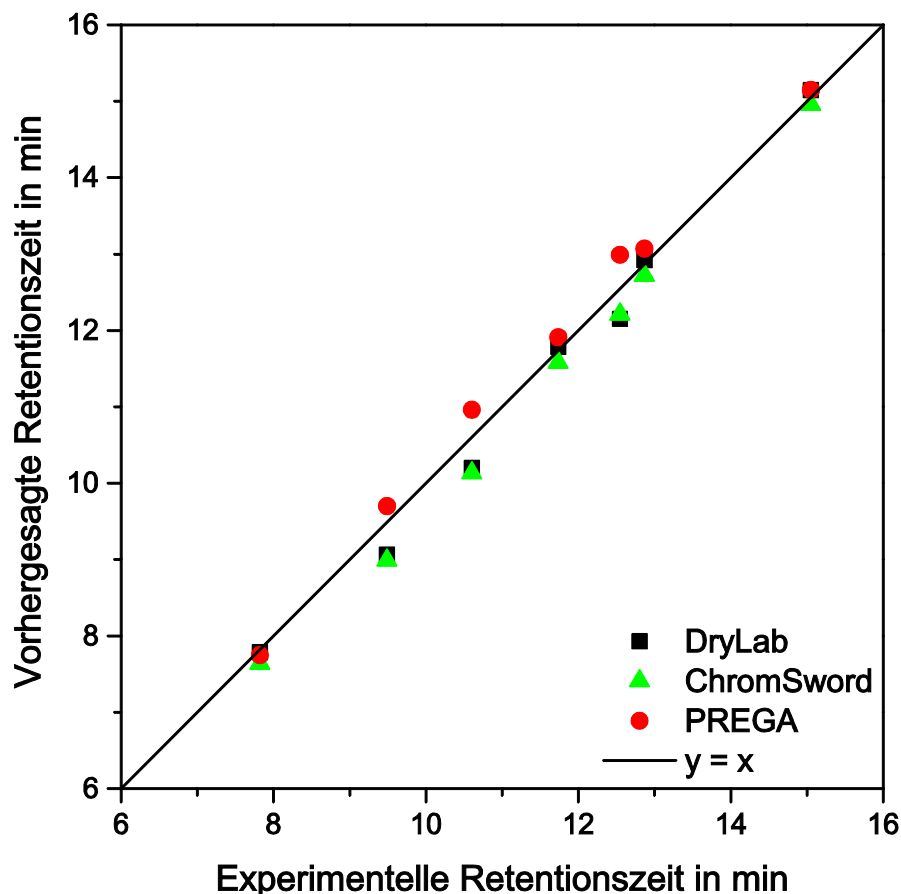


Abbildung 2-24: Vergleich der durch die Softwaretools DryLab, ChromSword und PREGA vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK in Abhängigkeit eines Lösungsmittelgradienten bei 40 °C und 80 °C. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C-18 (50 × 2,1 mm; 2,5 µm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril.

Abschließend ist festzuhalten, dass DryLab, ChromSword als auch PREGA sehr gut geeignet sind, um Retentionszeiten der Analyten in Abhängigkeit von Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen vorherzusagen. In Bezug auf das Nikitas-Tool sollten Basisgradienten verwendet werden, welche sich zusätzlich zur Gradientensteigung in der Anfangs- und Endkonzentration des organischen Modifiers voneinander unterscheiden. Dies bedeutet auch, dass das Nikitas-Tool unter Umständen eine andere Art von Basisdaten benötigt als beispielweise DryLab.

2.3.4.3 Retentionszeitvorhersagen in Abhängigkeit von Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen

Die Berechnung der Retentionszeiten der PAK in Abhängigkeit von Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen wurde für die Tools PREGA und DryLab evaluiert. Hierbei gilt zu beachten, dass DryLab als Eingangsdatensätze zwei Temperaturgradientenmessungen bei einer konstanten Zusammensetzung der mobilen Phase für die Vorhersage der Retentionszeiten nutzt. Im Vergleich dazu sind für PREGA Temperaturgradienten als auch isokratische Eingangsdatensätze bei unterschiedlichen Zusammensetzungen der mobilen Phase erforderlich, so dass die Ergebnisse der Retentionszeitsimulation lediglich bedingt miteinander verglichen werden können. Zur Vorhersage der Retentionszeiten der PAK wurden für DryLab Temperaturgradienten von 10 °C auf 150 °C in 10 min und 30 min genutzt. Für PREGA waren zusätzlich isokratische / isotherme Messungen bei 10 °C und 150 °C erforderlich. Der Acetonitrilanteil in der mobilen Phase wurde dabei zwischen 25 % und 65 % in einem Intervall von 10 % variiert. Mit beiden Programmen wurden anschließend die Retentionszeiten der PAK für Temperaturgradienten von 10 °C auf 150 °C in 15 min, 20 min und 25 min bei einer Zusammensetzung der mobilen Phase von 45/55 (v/v) Wasser/Acetonitril simuliert. In Abbildung 2-25 ist der Vergleich der vorhergesagten mit den experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK für DryLab als auch PREGA dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass beide Programme sehr gut in der Lage sind, die Retentionszeiten der PAKs in Abhängigkeit von Temperaturgradienten vorherzusagen. Der relative Fehler der Retentionszeitvorhersage liegt zwischen 0,2 % und 2,4 % für DryLab und zwischen 0,1 % und 1,5 % für PREGA. Ein Vorteil von PREGA, bedingt durch die erforderliche Eingabe zusätzlicher isothermer / isokratischer Eingangsdatensätze ist, dass die Vorhersage der Retentionszeiten ebenfalls in Abhängigkeit der Zusammensetzung der mobilen Phase möglich ist. Bei DryLab muss der Anwender diese Berechnungen eigenhändig durchführen.

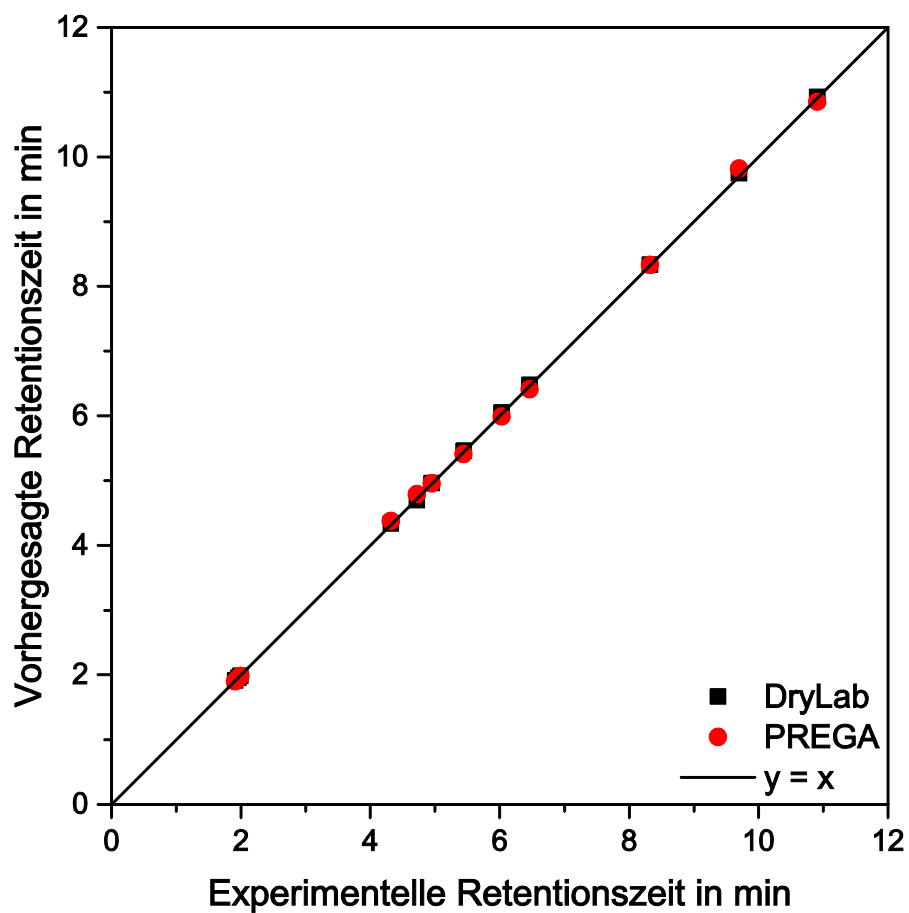


Abbildung 2-25: Vergleich der durch DryLab und PREGA vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK in Abhängigkeit von Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C-18 (50 × 2,1 mm; 2,5 µm); mobile Phase: 45/55 (v/v) Wasser/Acetonitril. Vorhergesagt wurden Temperaturgradienten von 10 °C auf 150 °C in 15 min, 20 min und 25 min.

2.3.4.4 Retentionszeitvorhersagen in Abhängigkeit kombinierter Lösungsmittel- und Temperaturgradienten

Die Vorhersage von Retentionszeiten in Abhängigkeit simultaner Lösungsmittel- und Temperaturgradienten wird ausschließlich von den akademischen Programmen PREGA und dem Nikitas-Tool unterstützt (siehe Tabelle 2-6). In Bezug auf das Nikitas-Tool konnte die Vorhersage von Retentionszeiten in Abhängigkeit simultaner Lösungsmittel- und Temperaturgradienten leider nicht evaluiert werden. Wie bereits in Abschnitt 2.3.4.2 ausgeführt, haben Diskussionen mit der Arbeitsgruppe Nikitas gezeigt, dass die in diesem Projekt generierten Basisdatensätze nicht als Eingangsdatensätze für die Nikitas-Software geeignet sind, wenn Retentionszeiten zu kombinierten Lösungsmittel- und Temperaturgradienten vorhergesagt werden sollen. Die erforderlichen Funktionsparameter des entsprechenden Retentionsmodells konnten numerisch nicht bestimmt werden, so dass lediglich die Software PREGA zur Simulation von Retentionszeiten in Abhängigkeit kombinierter Lösungsmittel- und Temperaturgradienten evaluiert wurde. Als Testgemisch wurde hier der in Tabelle 2-8 angegebene PAK-Mix verwendet. Zur Simulation der Retentionszeiten benötigt PREGA eine Reihe von isokratischen / isothermen Basismessungen als auch verschiedene Lösungsmittelgradientendaten. Die isokratischen Daten umfassen Messungen bei Temperaturen von 40 °C, 80 °C und 150 °C. Bei diesen Temperaturen wurde der Acetonitrilanteil in der mobilen Phase in einem Bereich von 20 % bis 70 % in einem Intervall von 10 % variiert. Zur Rekalibrierung des Retentionsmodells benötigt PREGA darüber hinaus verschiedene Lösungsmittelgradientendaten bei unterschiedlichen Temperaturen. Hier wurden Gradienten von 20 % auf 95 % Acetonitril in 10 min und 30 min bei Temperaturen von 10 °C und 150 °C herangezogen. Auf Grundlage der oben beschriebenen Daten erfolge die Simulation der Retentionszeiten der PAK für kombinierte Lösungsmittel- und Temperaturgradienten. In Abbildung 2-26 werden die simulierten mit den experimentell ermittelten Retentionszeiten verglichen. Dabei wird deutlich, dass die vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten sehr gut übereinstimmen. Die einzelnen Datenpunkte in Abbildung 2-26 liegen nahezu alle auf der Winkelhalbierenden. Die sehr gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Experiment wird auch bei Betrachtung des relativen Fehlers deutlich. Dieser liegt in einem Bereich von 0,1 % bis 3,4 %. An dieser Stelle muss jedoch die Anzahl der erforderlichen Basismessungen berücksichtigt werden. In diesem Beispiel sind 21 isotherme / isokratische Basismessungen sowie vier Gradientenmessungen in die Modellbildung eingeflossen. Ob dieser experimentelle Aufwand notwendig ist, muss im Vorfeld der Methodenentwicklung genau abgewogen werden. In den zuvor beschriebenen Beispielen sind stets weniger Basismessungen in die Modellbildung eingeflossen. Aufgrund der hohen Anzahl an Eingangsdatensätzen ist es nicht nur möglich, Retentionszeiten bei Anwendung simultaner Lösungsmittel- und Tem-

peraturgradienten, sondern alle in den Abschnitten 2.3.4.1 bis 2.3.4.4 beschriebenen Messmodi zu berücksichtigen.

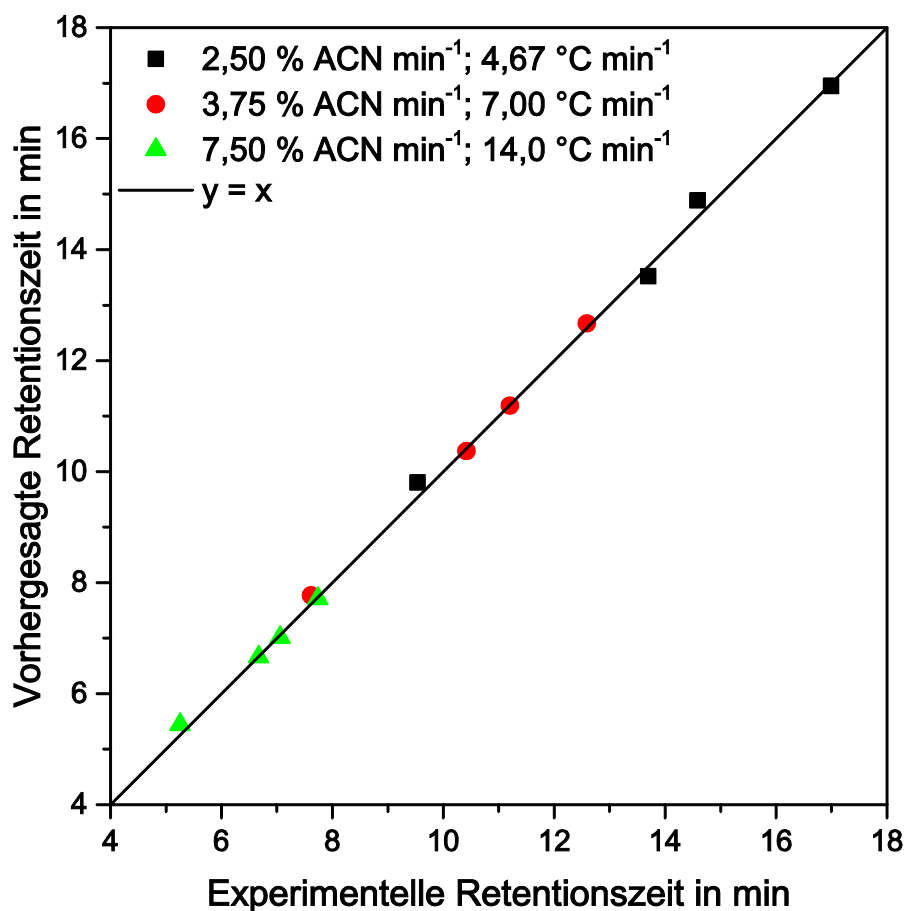


Abbildung 2-26: Vergleich der durch PREGA vorhergesagten und experimentell ermittelten Retentionszeiten der PAK in Abhängigkeit simultaner Lösungsmittel- und Temperaturgradienten. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Waters XBridge C-18 (50 × 2,1 mm; 2,5 µm); mobile Phase: Wasser/Acetonitril.

2.3.5 Handhabung der Methodenentwicklungstools

Der in diesem Abschnitt dargestellte Vergleich der Handhabung der Methodenentwicklungsoftware-Pakete basiert auf der subjektiven Einschätzung des Anwenders bezüglich der Verständlichkeit, der Einarbeitungszeit und der Dauer für die erforderlichen Berechnungen bis zur Datenausgabe. DryLab ist mit seiner Anwenderoberfläche leicht zu verstehen und selbst erklärend. Darüber hinaus ist eine schnelle und verständliche Ausgabe der Daten gewährleistet. Die Software ChromSword ist wie DryLab durch die Anwenderoberfläche leicht zu verstehen und benötigt nur eine geringe Einarbeitungszeit, die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt schnell und ist verständlich. Im Vergleich zu DryLab und ChromSword benötigt PREGA eine längere Einarbeitungsphase, da es aus zwei Modulen besteht. In dem ersten Modul werden anhand der Eingangsdaten Retentionsmodelle erstellt, welche als Grundlage für die Berechnungen in dem zweiten Modul dienen. Wurden die Retentionsmodelle erstellt und gespeichert, kann auf diese nicht mehr zurückgegriffen werden, um z. B. die Eingangsdaten einsehen und evtl. verändern zu können. Auch kann es in manchen Fällen einige Minuten dauern, bis ein Ergebnis ausgegeben wird. Das von Nikitas entwickelte Tool besitzt im Gegensatz zu den anderen drei Software-Programmen keine Anwenderoberfläche, sondern besteht aus exe-Dateien. Hierdurch ist nur schwer nachzuvollziehen, wie und an welcher Stelle die Eingangsdaten einzufügen sind, so dass eine lange Einarbeitungszeit notwendig ist. Danach ist eine schnelle Berechnung der Ergebnisse möglich, jedoch kann es vorkommen, dass keine Ergebnisse geliefert werden, da der Algorithmus und das Fitten der Daten nicht funktioniert. Leider gibt es keine Rückmeldung durch das Programm, welcher Fehler aufgetreten ist und wie dieser behoben werden kann. Im Vergleich dazu sind die kommerziell verfügbaren Software-Tools DryLab und ChromSword sehr anwenderorientiert und für den routinemäßigen Einsatz angepasst. Um PREGA und das Nikitas-Tool routinemäßig einzusetzen bedarf es viel Erfahrung des Anwenders. Jedoch können mit diesen Tools simultane Temperatur- und Lösemittelgradienten simuliert werden, was mit den kommerziellen Tools nicht möglich ist. In diesem Zusammenhang muss aber auch berücksichtigt werden, dass sowohl PREGA als auch das Nikitas-Tool kostenlos auf Anfrage zur Verfügung stehen, jedoch keine technische Unterstützung bieten wie dies bei kommerziellen Software-Tools in der Regel gegeben ist.

2.3.6 Hinweise zur Methodenentwicklung im Kontext der HPLC-Raman-Kopplung

2.3.6.1 Allgemeine Hinweise zur Anwendung von Methodenentwicklungs-Software

Die im Rahmen dieses Projektes angewendeten und untersuchten Methodenentwicklungstools beinhalten eine Vielzahl unterschiedlicher Retentionsmodelle zur Simulation der Retentionszeiten der Analyten in Abhängigkeit verschiedener chromatografischer Parameter. Dabei unterstützen nicht alle Programme diese Simulationen in Abhängigkeit aller möglichen Parameter. Weiterhin ist die Präzision der Retentionszeitvorhersagen stark von der Fähigkeit des angewendeten Retentionsmodells abhängig, das reale Elutionsverhalten der Analyten abzubilden. Je komplexer das Retentionsmodell, desto mehr experimentelle Eingangsdatensätze sind zur Datenanpassung erforderlich. Weiterhin sollte die Art der verwendeten Eingangsdatensätze dem Ziel der Methodenentwicklung entsprechen. Mit anderen Worten, ist eine isokratische / isotherme Trennung gewünscht, ist es sinnvoll, auch isokratische / isotherme Basisdaten im Rahmen der Methodenentwicklung zu nutzen. Weiterhin soll darauf hingewiesen werden, dass alle Tools, mit Ausnahme von DryLab, die Eingabe und Berücksichtigung aller verfügbaren Eingangsdatensätze unterstützen, um die Präzision der Retentionszeitvorhersage zu verbessern. DryLab gestattet hingegen nur die Eingabe weniger zusätzlicher Daten, welche zwingend den Vorgaben des Programms entsprechen müssen.

2.3.6.2 Isokratische / Isotherme Simulationen

In Bezug auf die Berechnung von Retentionszeiten in Abhängigkeit der isokratischen Zusammensetzung der mobilen Phase unter isothermen Bedingungen ist festzuhalten, dass alle in diesem Projekt angewendeten Softwareprogramme Simulationen dieser Art unterstützen. Darüber hinaus sind die Vorhersagen der Retentionszeiten mit einem Fehler in der gleichen Größenordnung behaftet. Dies gilt sowohl für die Anwendung eines linearen als auch quadratischen Retentionsmodells. Ist es erforderlich, Retentionszeiten über den durch die Basisdaten abgedeckten Bereich hinaus zu berechnen, ist die Anwendung des Nikitas-Tools (siehe Gleichung (5)) zu empfehlen.

2.3.6.3 Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen.

Soll das Retentionsverhalten der Analyten in Abhängigkeit eines Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen abgebildet werden, sind die Simulationen der Retentionszeit mit PREGA am genauesten, gefolgt von DryLab und ChromSword.

2.3.6.4 Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen

Die Berechnung der Retentionszeiten der Analyten in Abhängigkeit eines Temperaturgradienten unter isokratischen Bedingungen wird lediglich von den akademischen Tools und DryLab unterstützt. Beim Vergleich der Präzision der simulierten Retentionszeiten sind die relativen Fehler bei PREGA und DryLab sehr ähnlich und unterscheiden sich kaum voneinander. Bei einfachen Trennproblemen, bei denen beispielsweise die Verwendung einer wässrigen mobilen Phase zwingend erforderlich ist, bietet DryLab den Vorteil, dass lediglich Temperaturgradienten als Basisdaten für die Berechnungen erforderlich sind. Im Vergleich dazu sind Simulationen mittels PREGA nur möglich, wenn zusätzlich isokratische / isotherme Basisdaten generiert werden. Bei komplexeren Trennproblemen, bei denen nicht nur der Temperaturgradient optimiert werden soll, sondern auch die Zusammensetzung der mobilen Phase, bietet PREGA Vorteile. Bedingt durch die erforderlichen isokratischen / isothermen Basisdaten sind Berechnungen der Retentionszeit in Abhängigkeit beider Parameter direkt möglich. Ist geplant, die gleichen Berechnungen mit Hilfe von DryLab durchzuführen, muss der Anwender selbst die Retentionszeiten in Abhängigkeit der Zusammensetzung der mobilen Phase berechnen, was bisweilen sehr komplex ist.

2.3.6.5 Kombinierte Lösungsmittel- und Temperaturgradienten

Die Simulation von Retentionszeiten in Abhängigkeit simultaner Lösungsmittel- und Temperaturgradienten wird ausschließlich durch die akademischen Softwarepakete PREGA und Nikitas unterstützt, obgleich im Rahmen dieses Forschungsvorhabens lediglich PREGA evaluiert werden konnte. In weiteren Studien sollte daher untersucht werden, inwieweit das Nikitas-Tool für diese Art der Vorhersagen geeignet ist. Anschließend sollten die erforderlichen Basisdatensätze beider Programme miteinander verglichen werden.

2.4 Herstellung von Metall-Kolloid-Lösungen

Im Rahmen der Forschungsarbeiten wurden Metall-Kolloide nach unterschiedlichen Methoden hergestellt bzw. synthetisiert. Zum einen wurden kommerziell verfügbare Metall-Kolloid-Lösungen von der Firma Particular GmbH (Hannover) bezogen, die nach dem Verfahren der Laserablation hergestellt worden sind [67]. Zum anderen erfolgte die Synthese von Silber-Kolloiden in eigener Herstellung an der HHU. Als Basis dienten Synthesevorschriften nach Lee-Meisel, Leopold-Lendl und Zou-Dong [68-70]. Die Optimierung der Kolloide hinsichtlich des SERS-Effektes erfolgte mittels iterativer Variation der Reaktionsparameter [71,72]. Untersucht wurden die Einflüsse von Temperatur, Konzentration, Reaktionsdauer, die Geschwindigkeit der Eduktzusammenführung sowie der Einfluss organischer Lösungsmittel. Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), UV/VIS-Spektroskopie und anhand des SERS-Effektes selbst (siehe Kapitel 2.6).

2.4.1 Herstellung von Metall-Kolloiden mittels Laserablation

Im Laufe der Projektarbeiten wurden mehrfach Metall-Kolloide von der Firma Particular GmbH bezogen. Vorteile dieser Methode sind eine reproduzierbare und schmale Größenverteilung, sowie ein hoher Reinheitsgrad (keine Reaktionsedukte). Zudem lassen sich mit Hilfe der Laserablation auch Kolloide aus Metall-Legierungen herstellen. Die von Particular gelieferten Metall-Kolloide sind in der Tabelle 2-9 zusammengefasst.

Tabelle 2-9: Metall-Kolloide, die mittels Laserablation hergestellt wurden.

Metall-Kolloid	Lösungsmittel	Konzentration (mg L ⁻¹)	Stabilisator (0,01 mM Natriumcitrat)	Partikelgröße laut Hersteller- angabe (nm)
Silber	Wasser	100	Ja	10 - 15
Silber	Wasser	100	Ja	50 - 70
Gold	Wasser	100	Ja	10 - 15
Gold	Wasser		Ja	50 - 70
Silber / Gold (50:50)	Wasser	100	Ja	10 - 15
Silber / Gold (50:50)	Wasser	100	Ja	50 - 70
Silber / Gold (50:50)	Wasser	56	Nein	< 20
Silber / Gold (70:30)	Wasser	100	Ja	< 20
Silber / Gold (70:30)	Wasser	100	Nein	< 20
Nickel	Wasser	15	Ja	< 20
Kobalt	Wasser	100	Ja	< 20
Nickel / Kupfer (70:30)	Wasser	18	Ja	< 20

2.4.2 Synthese von Silber-Kolloiden in Wasser

Erste Kolloid-Synthesen erfolgten nach Vorschriften von Lee-Meisel, Leopold-Lendl und Zou-Dong [68-70] mit reinem Wasser als Lösungsmittel. Durch die Variation der Reaktionsparameter konnte eine optimale SERS-Aktivität der Kolloide erreicht werden [71,72]. Im Folgenden werden nur die Parameter genannt, deren Änderungen im Vergleich zur ursprünglichen Synthesevorschrift eine Verbesserung der SERS-Aktivität bewirkten. Nicht aufgeführte Parameter entsprechen den Werten der Originalsynthesen.

Bei der Synthese nach Lee-Meisel wurde die Konzentration der Silbernitratlösung von 1 auf 2 mM verdoppelt. Für Kolloide nach Leopold-Lendl ergab sich die höchste SERS-Aktivität bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C und einer Zusammenführung der Edukte mit konstanter Flussrate über 10 Minuten. Die Synthesevorschrift nach Zou-Dong wurde dahingehend optimiert, dass die Vorstufenreaktion zur Bildung von Wachstumskeimen nicht durchgeführt wurde. Die optimale Konzentration an Silbernitrat lag zwischen 0,45 und 0,60 mM. Unter diesen Vorgaben lassen sich mit allen drei Synthesewegen Silber-Kolloide mit ähnlich hohen SERS-Aktivitäten herstellen, die die SERS-Aktivitäten der mittels Laserablation hergestellten Kolloide deutlich übersteigen. Die entsprechenden Versuchsvorschriften zur Synthese der Silber-Kolloide, mit denen die besten SERS-Ergebnisse erzielt wurden, befinden sich im Anhang in Kapitel 5.6. In Tabelle 2-10 sind die Partikelgrößen und Absorptionsmaxima der erfolgreich eingesetzten Silber-Kolloide dargestellt.

Tabelle 2-10: Synthetisierte Silber-Kolloide in Wasser, die eine besonders hohe SERS-Aktivität zeigen.

Projektinterne Bezeichnung	Synthesevorschrift	Durchschnittliche Partikelgröße (z- Average) (nm)	Absorptionsmaximum (nm)
LM-185	Lee-Meisel, Kapitel 5.6.1	52	415
LL-80	Leopold-Lendl, Kapitel 5.6.2	59	430
ZD-60	Zou-Dong, Kapitel 5.6.3	65	450

2.4.3 Synthese von Silber-Kolloiden in organischen Lösungsmitteln

Hinsichtlich der Fragestellung, ob auch organische Lösungsmittel in der mobilen Phase der HPLC verwendet werden können (siehe Kapitel 2.7), wurden die Silber-Kolloide in rein organischen Lösungsmitteln und in 50/50 (v/v) Wasser/Lösungsmittel-Gemischen synthetisiert [71,72]. Dazu wurden die nach Kapitel 2.4.2 modifizierten Versuchsvorschriften auf Basis von Lee-Meisel, Leopold-Lendl und Zou-Dong verwendet. Als Lösungsmittel wurden Methanol und Acetonitril eingesetzt. Die so hergestellten Kolloide konnten allerdings nicht weiter verwendet werden, da eine SERS-Aktivität nur sehr schwach beobachtet werden konnte. Zudem zeigten die Kolloid-Lösungen eine geringe Stabilität und die Silber-Kolloide fielen in einem Zeitraum von wenigen Stunden bis etwa zwei Tagen vollständig aus.

In weiteren Versuchsreihen wurden die Kolloid-Synthesen wieder in reinem Wasser durchgeführt, allerdings mit doppelten Eduktkonzentrationen. Nach erfolgreicher Synthese wurden die Kolloid-Lösungen mit Methanol bzw. Acetonitril auf ein 50/50 (v/v) Wasser/Lösungsmittel-Gemisch verdünnt. Die so hergestellten Silber-Kolloide zeigten sowohl eine hohe SERS-Aktivität als auch eine gute Langzeitstabilität in Lösung. Die besten SERS-Ergebnisse konnten mit den Ansätzen nach Lee-Meisel erzielt werden. Die Synthesevorschrift ist im Anhang in Kapitel 5.6.4 hinterlegt. Tabelle 2-11 zeigt die entsprechenden Messwerte zu Partikelgröße und Absorptionsmaximum.

Tabelle 2-11: Synthetisierte Silber-Kolloide in 50/50 (v/v) Wasser/Lösungsmittel-Gemischen mit hoher SERS-Aktivität.

Projektin- terne Be- zeichnung	Synthesevor- schrift	Anteiliges organisches Lösungsmittel (50%)	Durchschnittliche Partikel- größe (z- Average) (nm)	Absorptionsmaxi- mum (nm)
LM-189	Lee-Meisel, Kapitel 5.6.4	Methanol	49,5	425
LM-191	Lee-Meisel, Kapitel 5.6.4	Acetonitril	45,6	416

2.5 Modifikation des bestehenden Raman-Detektors für das SERS-Experiment

Zur Durchführung der Projektarbeiten wurde der in Abbildung 2-27 dargestellte Eigenbau eines Raman-Spektrometers verwendet [73]. Hierbei handelt es sich um eine leicht modifizierte Version des im Vorläufervorhaben (IGF-Forschungsvorhaben-Nr. 16120 N) entwickelten Spektrometer-Aufbaus. Die Kernkomponenten bilden weiterhin ein Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm von Newport / Spectra Physics (Millennia Pro 2s), ein Monochromator von Kaiser Optical Systems (HoloSpec f/1.8i) und eine CCD-Kamera von Andor Technology (Newton DU920P-BV). Der Anregungslaser (grüne Linie) wird über einen dichroitischen Strahlteiler in Richtung Mikroskopobjektiv gelenkt und auf die Probe fokussiert. Das Raman-Streulicht (rote Linie) wird vom Mikroskopobjektiv gesammelt und mittels Kollimator und Lichtwellenleiter zum Monochromator geführt. Nach spektraler Zerlegung wird das Raman-Streulicht von der CCD-Kamera detektiert.

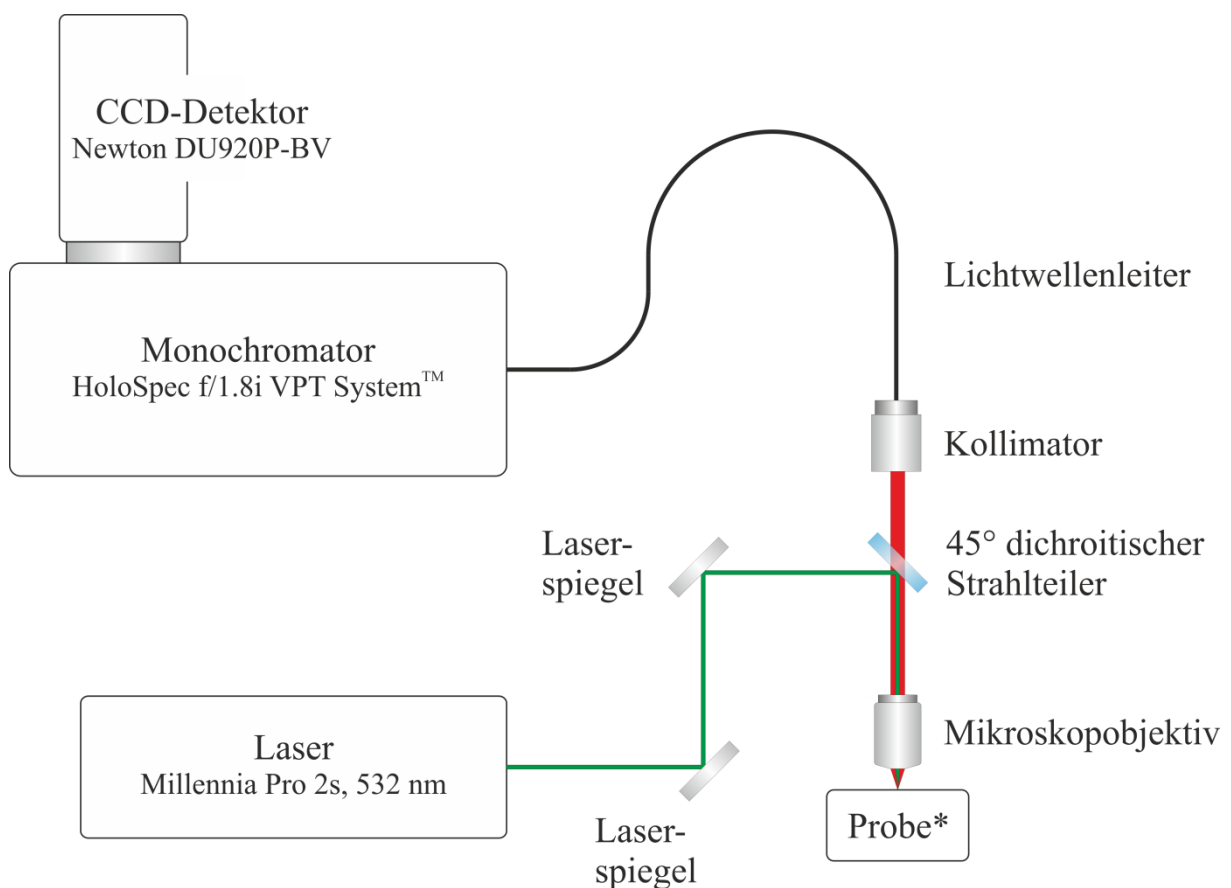


Abbildung 2-27: Schematische Darstellung des verwendeten Raman-Spektrometers [73]. * Zur Messung der Probe kann eine Quarzglasküvette, eine Edelstahlplatte mit Probenmulde oder eine Lichtkopeloptik mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter adaptiert werden.

Je nach Anwendungsfall können Proben auf unterschiedliche Arten gemessen werden. Grundsätzlich muss dabei zwischen statischen Messungen in einer isolierten Probenkammer und dynamischen Messungen im Durchfluss unterschieden werden.

2.5.1 Statische SERS-Messungen in einer Probenkammer

Bei den statischen SERS-Messungen wurde eine Probenkammer mittels x,y,z-Verschiebetisch in den Laserfokus justiert. Dieser Aufbau wurde zur einfachen Charakterisierung verschiedener Metall-Kolloide und Analyten hinsichtlich ihrer SERS-Aktivität verwendet. Erste Messungen erfolgten zunächst in einer Quarzglasküvette (Abbildung 2-28). Später wurde aufgrund der hohen Anzahl von Messungen die Quarzglasküvette durch eine Edelstahlplatte mit Probenmulde ersetzt (Abbildung 2-28). Nach Injektion der SERS-Probe wurde die Mulde mit einem Einwegdeckglas verschlossen. Die Edelstahlplatte bietet den Vorteil, dass die Reinigung bei Probenwechsel wesentlich schneller durchgeführt werden kann.

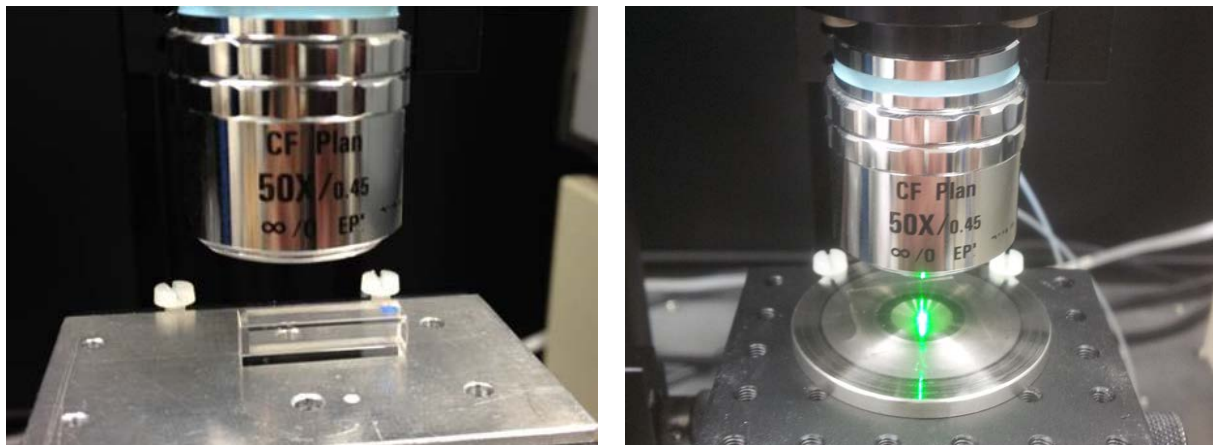


Abbildung 2-28: links: Raman-Messung in einer Quarzglasküvette, rechts: Raman-Messung auf Edelstahlplatte mit Probenmulde [74].

2.5.2 Dynamische SERS-Messungen im Durchfluss - Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt

Hinsichtlich der Kopplung mit der HPLC wurden die statischen SERS-Experimente in den Durchfluss übertragen (siehe Abbildung 2-29). Dazu wurde eine speziell entwickelte Lichtkoppeloptik (siehe Kapitel 2.8.1) in den Laserfokus justiert. Die Kapillar-Durchflussszelle (grün bzw. gelb dargestellt) wird direkt in die Lichtkoppeloptik adaptiert, so dass das Laserlicht axial in die Durchflussszelle eintreten kann. Unter Verwendung einer HPLC-Pumpe wurde eine konstante Flussrate zwischen 0,3 und 0,6 mL min⁻¹ eingestellt. Zwischen Pumpe und Durchflussszelle wurde ein Handinjektor integriert, mit dem vorgemischte SERS-Proben, bestehend aus Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt, injiziert wurden.

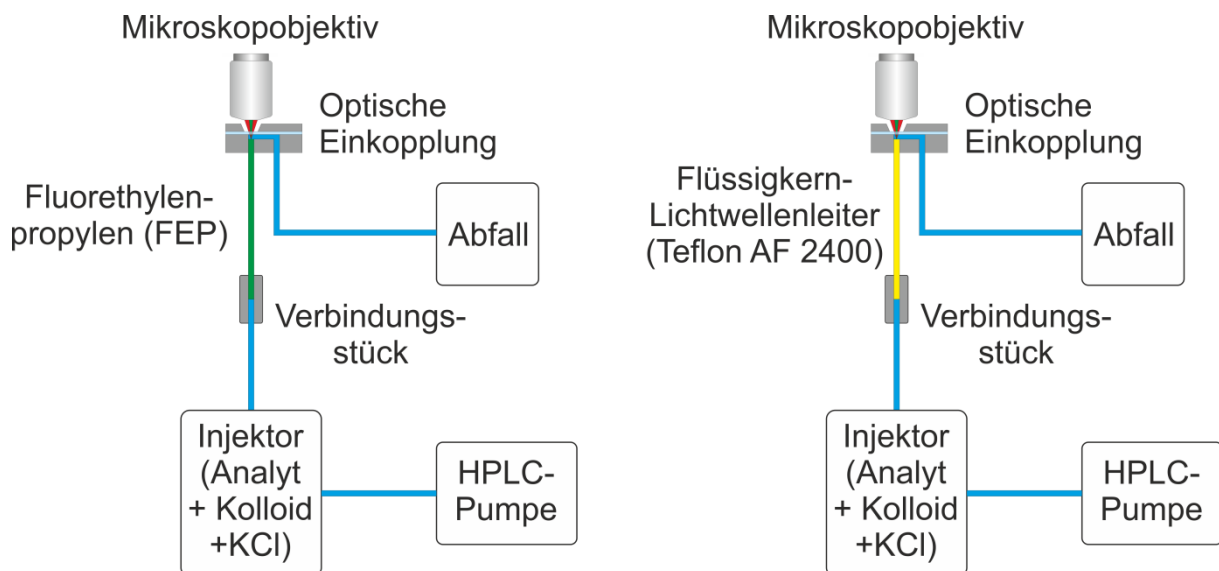
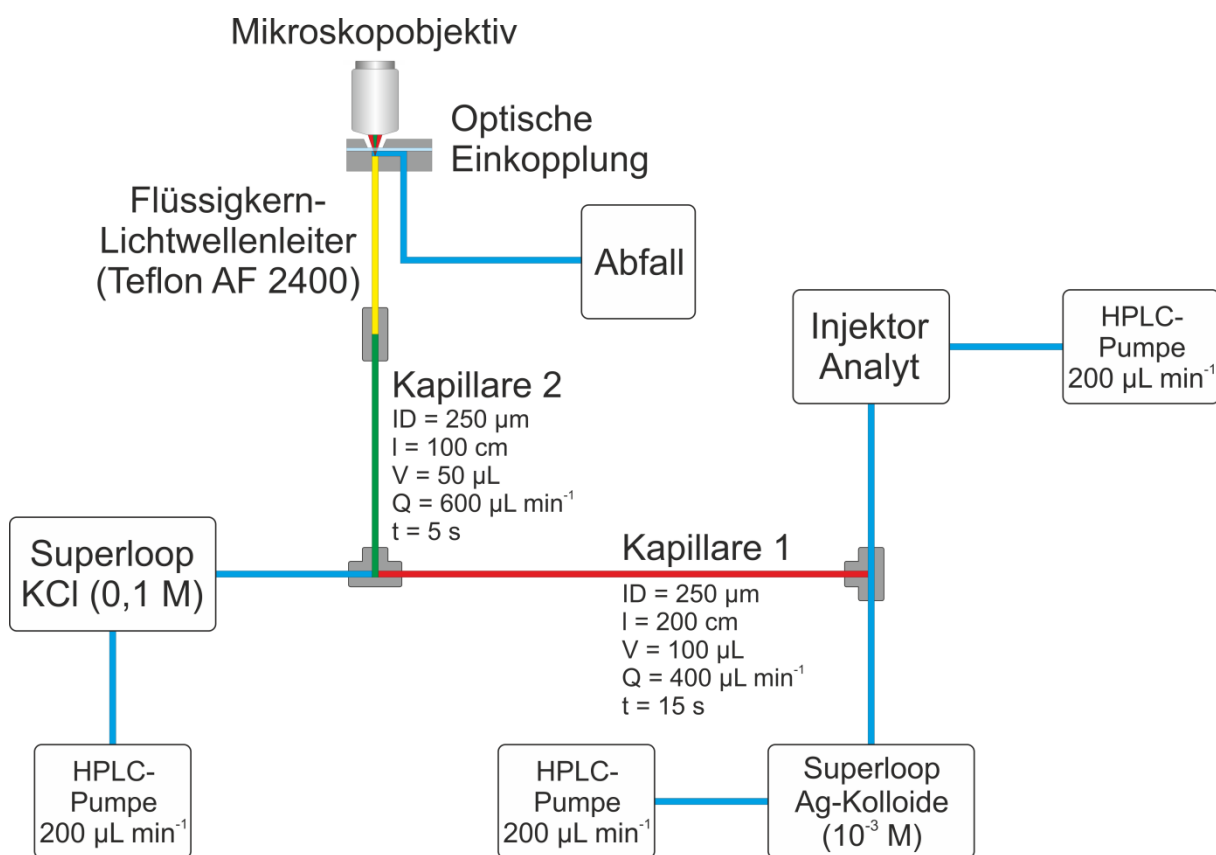


Abbildung 2-29: links: Raman-Messung im Durchfluss "ohne" Flüssigkern-Lichtwellenleiter, rechts: Raman-Messung im Durchfluss "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].

Als Durchflusszelle wurde zunächst eine Kapillare aus handelsüblichem Fluorethylenpropylen (FEP) in die Lichtkoppeloptik adaptiert (grün dargestellt). Da FEP aufgrund eines zu hohen Brechungsindex nicht als Flüssigkern-Lichtwellenleiter operiert, findet die Raman-Messung ähnlich den statischen Versuchsreihen stark orts aufgelöst und vornehmlich im Laserfokus statt. Die SERS-Probe fließt dabei mit entsprechend eingestellter Flussrate durch den Laserfokus hindurch. Die Verweilzeit eines Analytmoleküls innerhalb der Strahltaile ist daher gering. Bei Adaption des Flüssigkern-Lichtwellenleiters aus Teflon AF 2400 (gelb dargestellt) wird das Laserlicht aufgrund der Totalreflexion durch die gesamte Durchflusszellen-Kapillare geleitet. Dies führt zu einer deutlichen Erhöhung des messtechnisch ausnutzbaren Volumens, in dem das Raman-Streulicht erzeugt wird und führt zu einer Verstärkung der Raman-Intensität. Es werden zur gleichen Zeit wesentlich mehr Analytmoleküle vom Laserlicht erfasst und auch die Verweilzeit der einzelnen Moleküle im Laserlicht liegt deutlich höher.

Im direkten Vergleich, ohne bzw. mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter, kann der anteilige Verstärkungseffekt bestimmt werden, der allein durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter im SERS-Experiment beigesteuert wird (siehe Kapitel 2.9.2).

In diesem Kapitel wird der experimentelle Aufbau zur Online Zusammenführung von Metall-Kolloid, Analyt und Elektrolyt beschrieben (siehe Abbildung 2-30). Für den Aufbau wurden insgesamt drei HPLC-Pumpen benötigt, die alle auf eine Flussrate von $200 \mu\text{L min}^{-1}$ eingestellt wurden. Die erste Pumpe wurde mit einem Handinjektor verbunden, über den ein beliebiges Analytmolekül in das System injiziert werden kann. Auf diese Weise soll eine von der HPLC-Säule eluierte Substanz simuliert werden. Metall-Kolloid und Elektrolyt wurden zunächst in zwei Reservoirs (Superloops) mit einem Fassungsvermögen von je 10 mL gefüllt. Mittels zwei weiteren HPLC-Pumpen können die Substanzen ebenfalls in das System eingespeist werden. Die hier gewählte Reihenfolge der Substanzzusammenführung erklärt sich aus den in Kapitel 2.6.2.1 aufgeführten Untersuchungen.



Über ein T-Stück werden zunächst Analyt und Metall-Kolloid in die Kapillare 1 (rot dargestellt) zusammengeführt. Die Kapillare 1 besitzt ein Innenvolumen von 100 μL ($l = 200\text{ cm}$, $ID = 250\text{ }\mu\text{m}$). Dies ist nötig, um dem Analyten ausreichend Zeit für eine Adsorption auf der Kolloid-Oberfläche zu geben (siehe Kapitel 2.6.2.2). Mit einer Flussrate von $400\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ beträgt die Durchflusszeit durch die Kapillare 15 Sekunden. Über ein zweites T-Stück erfolgt

dann die Zugabe eines Elektrolyten, der zu einer Agglomeration der Metall-Kolloide führt. Um auch dem Agglomerationsprozess genügend Zeit einzuräumen (siehe Kapitel 2.6.2.3), wurde für die Kapillare 2 (grün dargestellt) ein Innenvolumen von 50 μL ($l = 100\text{ cm}$, $ID = 250\text{ }\mu\text{m}$) gewählt. Mit einer durch die drei HPLC-Pumpen vorgegebenen Gesamtflussrate von $600\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ beträgt die Durchflusszeit 5 Sekunden. Anschließend erreicht das Gemisch aus Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt den Flüssigkern-Lichtwellenleiter, in dem die Raman-spektroskopische Messung unter Ausnutzung des SERS-Effektes und der Totalreflexion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter erfolgt (siehe Kapitel 2.9.3). Die Abbildung 2-31 zeigt eine Übersicht des experimentellen Laboraufbaus.

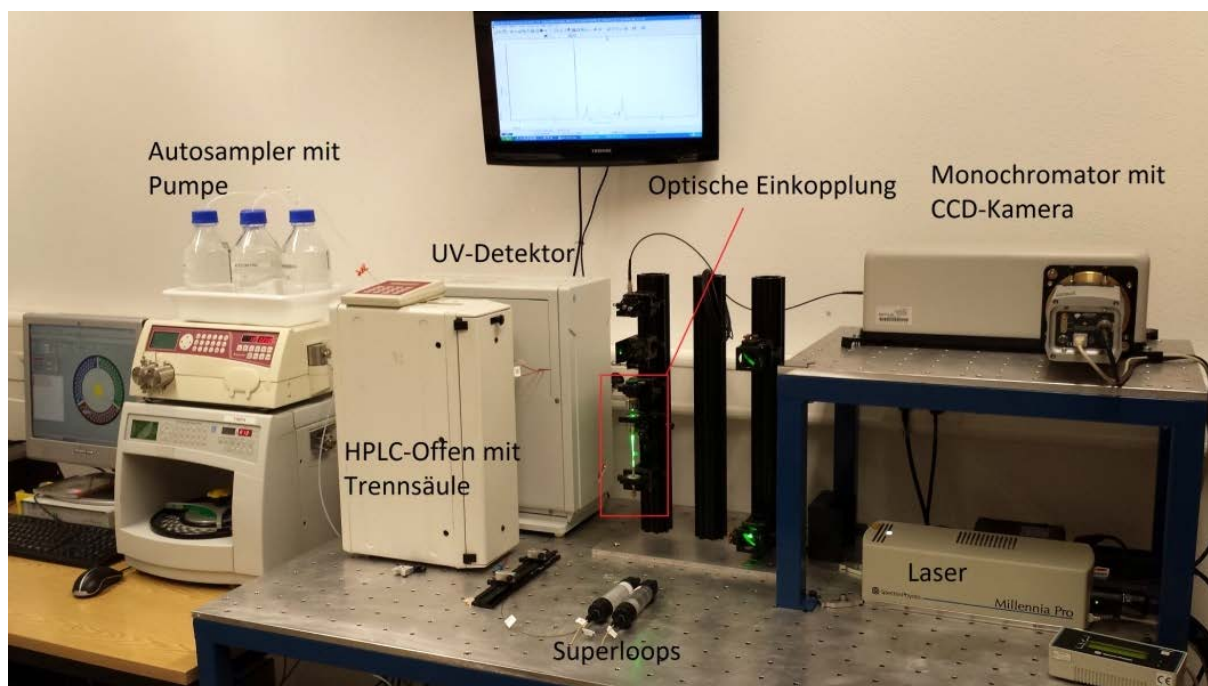


Abbildung 2-31: Online Zusammenführung von Metall-Kolloid, Analyt und Elektrolyt im Durchfluss [71].

Aufgrund der benötigten Reaktionszeiten für die Adsorption der Zielanalyten an die Metall-Kolloidoberfläche und die anschließende Agglomeration der Kolloide muss das Kapillarvolumen zwischen Chromatographiesäule und Raman-Detektor entsprechend erhöht werden, wenn auf den Einsatz einer "Stopped-Flow-Methode" verzichtet werden soll. Dies kann prinzipiell über die Länge der Kapillaren sowie den Kapillarinne Durchmesser eingestellt werden. Hieraus ergeben sich zwangsläufig zwei unerwünschte Effekte, die Erhöhung des Gegendrucks und die Peakverbreiterung.

Wird das Kapillarvolumen alleine über die Anpassung der Kapillarlänge erhöht und dabei ein HPLC-konformer Innendurchmesser von $130\text{ }\mu\text{m}$ beibehalten, so müssten Kapillarwege von etwa 12 Metern zwischen Säule und Raman-Detektor integriert werden. Dies würde bei den verwendeten Flussraten (Kapillare 1: $400\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, Kapillare 2: $600\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$) zu einem zusätzlichen Gegendruck von ca. 144 bar führen. Vor diesem Hintergrund wurde neben der

Kapillarlänge auch der Kapillarinne Durchmesser angepasst. Mit einem Innendurchmesser von 250 µm kann die Kapillarlänge auf ca. 3 Meter reduziert werden und der Gegendruck sinkt von 144 auf 2,5 bar. Leider führt die Erhöhung des Kapillarinne Durchmessers zu einer deutlichen Peakverbreiterung (siehe Kapitel 2.9.3), die eine zuvor gute chromatografische Trennung wieder zunichtemacht.

2.6 Charakterisierung der Metall-Kolloid-Lösungen

Im Rahmen der Projektarbeiten wurden die Metall-Kolloide mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), UV/VIS-Spektroskopie und anhand des SERS-Effektes selbst umfassend charakterisiert [71,72,74,75]. Die DLS-Messungen wurden mit dem Partikelmessgerät "nanopartica SZ-100" von HORIBA durchgeführt, für UV/VIS-Absorptionsmessungen stand das "EPP2000C" der Firma StellarNet mit einem nutzbaren Wellenlängenbereich von 190 bis 850 nm zur Verfügung. Die Charakterisierung der Metall-Kolloide hinsichtlich des SERS-Effektes erfolgte unter Verwendung des Raman-Spektrometers nach Kapitel 2.5 sowie den Probenfassungen nach Kapitel 2.5.1. Wichtige Kennzahlen sind die Intensität des SERS-Effektes sowie die Reproduzierbarkeit der Spektren, die Partikelgröße und Größenverteilung, die Lage der Plasmonenresonanz sowie die Stabilität der Kolloid-Lösungen. Neben den von Particular GmbH gekauften Kolloiden wurden im Laufe der Projektarbeiten mehr als 200 Kolloidlösungen hergestellt und charakterisiert. Mit den in Kapitel 2.4 dargestellten fünf Kolloid-Synthesen konnten die besten SERS-Ergebnisse erzielt werden. Die entsprechenden Partikelgrößen sowie die Lage der Plasmonenresonanz (Absorptionsmaximum) sind in Tabelle 2-10 (Kapitel 2.4.2) und Tabelle 2-11 (Kapitel 2.4.3) hinterlegt.

2.6.1 Beurteilung der verwendeten Metallart der Kolloide hinsichtlich der genutzten Anregungswellenlänge

Zu Beginn der Projektarbeiten wurde zunächst überprüft, welches Metall sich am besten für die vorhandene Anregungswellenlänge von 532 nm eignet. Dazu wurden SERS-Spektren von Nilblau mit den von Particular GmbH gelieferten Metall-Kolloiden aufgenommen. Die Messungen erfolgten in der Edelstahlplatte mit Probenmulde nach dem in Kapitel 2.5.1 dargestellten experimentellen Aufbau. Für alle Kolloide, die mit Partikelgrößen unter 20 nm gekennzeichnet waren, konnte kein SERS-Effekt beobachtet werden. Kolloide mit Partikelgrößen zwischen 50 und 70 nm zeigten hingegen einen SERS-Effekt, der stark von dem eingesetzten Metall abhängig ist. Die Abbildung 2-32 zeigt das SERS-Spektrum von Nilblau mit einer Endkonzentration von $3,3 \times 10^{-6}$ M. Dabei wurden reine Gold-Kolloide mit einer Endkonzentration von 33 mg L⁻¹ verwendet. Als Elektrolyt kam Kaliumchlorid mit einer Endkon-

zentration von 0,033 M zum Einsatz. Die Laserleistung wurde auf 25 mW eingestellt und die Ausleserate des Raman-Detektors lag bei 1 Hz.

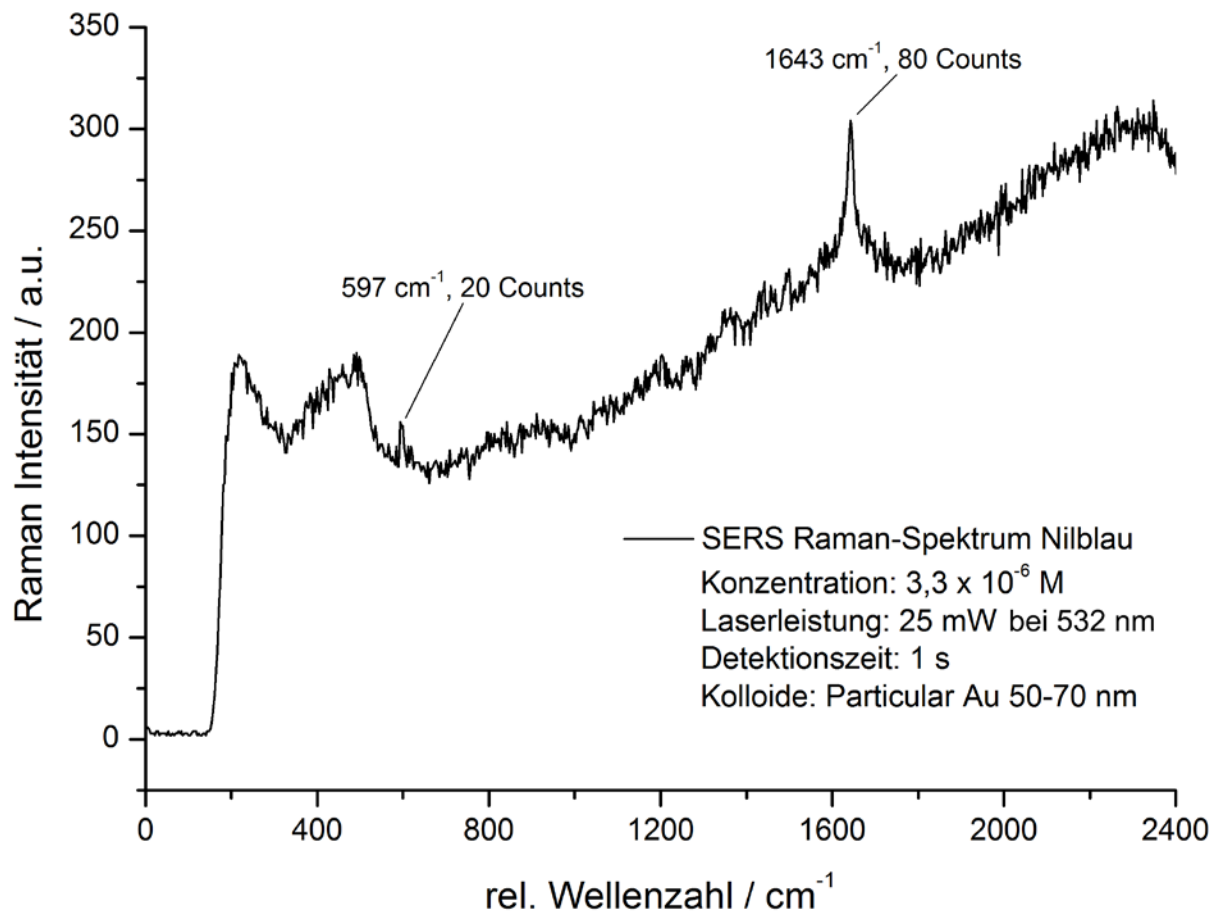


Abbildung 2-32: SERS-Spektrum von Nilblau mit Particular Gold-Kolloiden (50 bis 70 nm).

Die beiden prägnanten SERS-Signale von Nilblau liegen bei 597 und 1643 cm⁻¹ und können mit 20 bzw. 80 Counts detektiert werden. Im Vergleich zum Untergrund ist das SERS-Spektrum relativ schwach. Die Abbildung 2-33 zeigt das SERS-Spektrum von Nilblau bei Verwendung der Silber/Gold-Legierung mit 50-70 nm Partikelgrößen. Alle anderen Messeinstellungen wurden beibehalten.

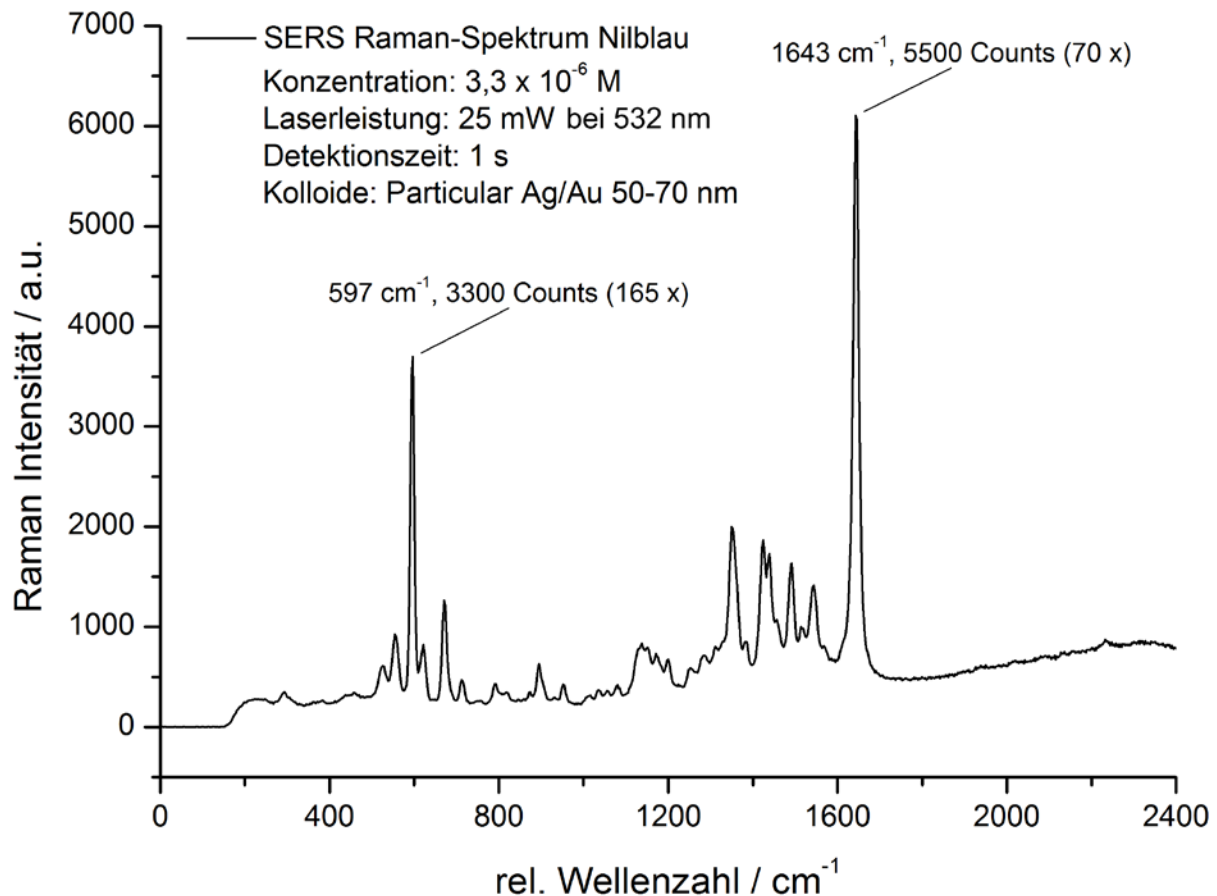


Abbildung 2-33: SERS-Spektrum von Nilblau mit Particular Silber/Gold-Kolloiden (50 bis 70 nm).

Die SERS-Signale bei 597 und 1643 cm^{-1} können jetzt mit 3300 bzw. 5500 Counts detektiert werden. Das entspricht im Vergleich zur Messung mit den reinen Gold-Kolloiden einer Verstärkung um den Faktor 165 bzw. 70. Zudem lässt sich jetzt das gesamte SERS-Spektrum von Nilblau inklusive der mittelstarken und schwachen SERS-Banden erfassen. In der Abbildung 2-34 ist das SERS-Spektrum von Nilblau unter Beimischung der reinen Silber-Kolloide dargestellt. Die Banden bei 597 und 1643 cm^{-1} können jetzt mit 39.800 bzw. 45.100 Counts detektiert werden. Im Vergleich zu den Messungen mit den Gold-Kolloiden entspricht das einer Verstärkung um das 2000- bzw. 565-fache.

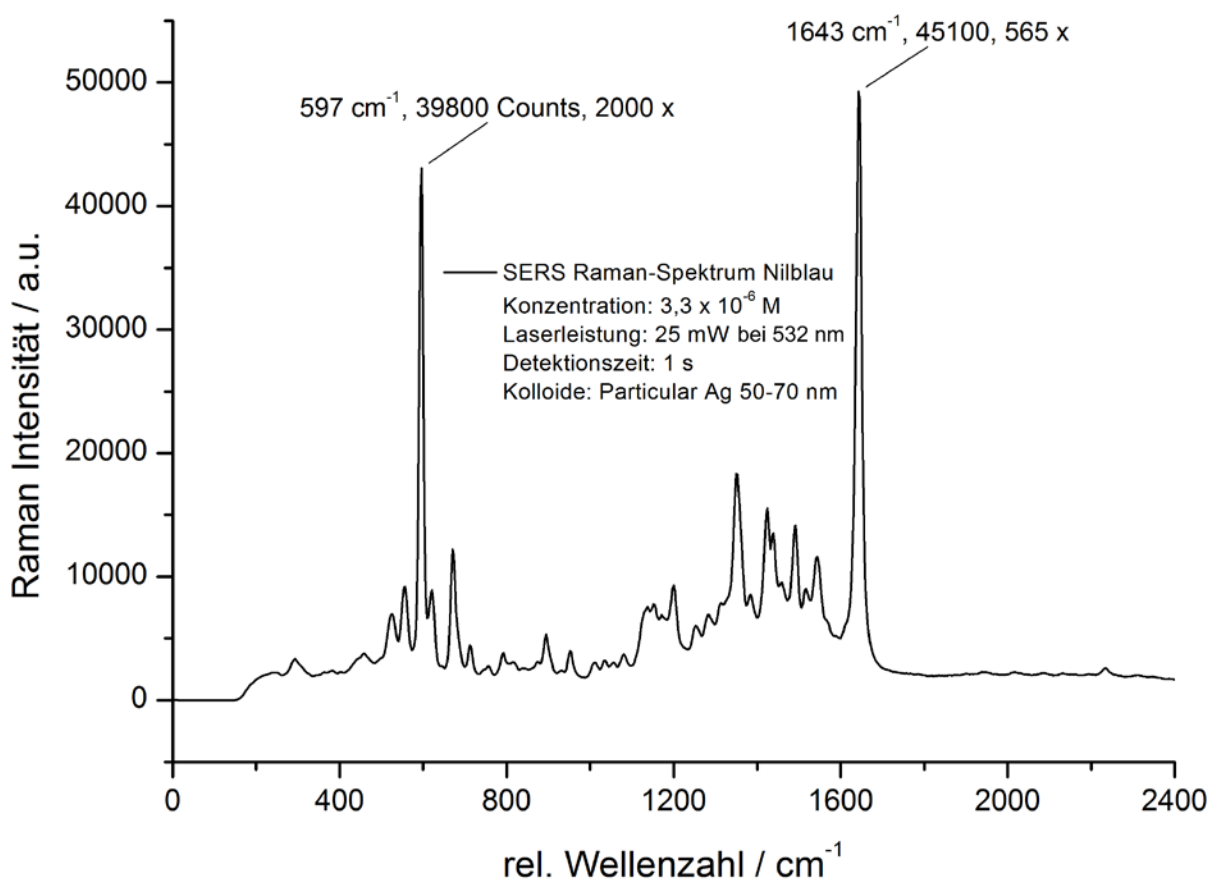


Abbildung 2-34: SERS-Spektrum von Nilblau mit Particular Silber-Kolloiden (50 bis 70 nm).

Die Versuchsreihen haben gezeigt, dass bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 532 nm die reinen Silber-Kolloide den intensivsten SERS-Effekt erzeugen. Die Ergebnisse decken sich mit der einschlägigen Literatur [76]. Daher wurde im weiteren Verlauf der Projektarbeiten nur mit reinen Silber-Kolloiden gearbeitet. Des Weiteren fällt auf, dass bei den Messungen die Lage aller SERS-Banden erhalten bleibt. Diese Beobachtung konnte auch in späteren Versuchen immer bestätigt werden und spricht für eine hohe Reproduzierbarkeit der SERS-Messungen.

2.6.2 Kinetik des SERS-Effektes (Adsorptions- und Agglomerationszeiten)

Hinsichtlich der gewünschten Online-Kopplung mit der HPLC und dem damit verbundenen Versuchsaufbau (siehe Kapitel 2.5.3) wurde untersucht, ob der SERS-Effekt von der Reihenfolge der Zusammenmischung von Zielanalyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt abhängig ist. Anschließend wurden die optimalen Reaktionszeiten bestimmt, mit denen eine maximale Verstärkung der Raman-Intensität erreicht wird.

2.6.2.1 Reihenfolge der Substanzzufuhr

In diesem Arbeitspaket wurde der Einfluss der Reihenfolge der Zugabe von Analyt, Kolloid und Elektrolyt auf die Intensität des SERS-Effektes untersucht [74]. Folgende drei Möglichkeiten der Zusammenmischung wurden betrachtet:

1. Der Analyt wird einem zuvor angesetzten Elektrolyt-Kolloid-Gemisch zugegeben.
2. Das Kolloid wird einem zuvor angesetzten Analyt-Elektrolyt-Gemisch zugegeben.
3. Der Elektrolyt wird einem zuvor angesetzten Analyt-Kolloid-Gemisch zugegeben.

Die Messergebnisse anhand des SERS-Spektrums von Koffein sind in der Abbildung 2-35 dargestellt. Die verschiedenen Reihenfolgen der Zusammenmischung wurden angelehnt an die nachfolgend erklärten Mechanismen als "Adsorption" (roter Kurvenverlauf), "Konkurrenz" (blauer Kurvenverlauf) und "Agglomeration" (schwarzer Kurvenverlauf) bezeichnet.

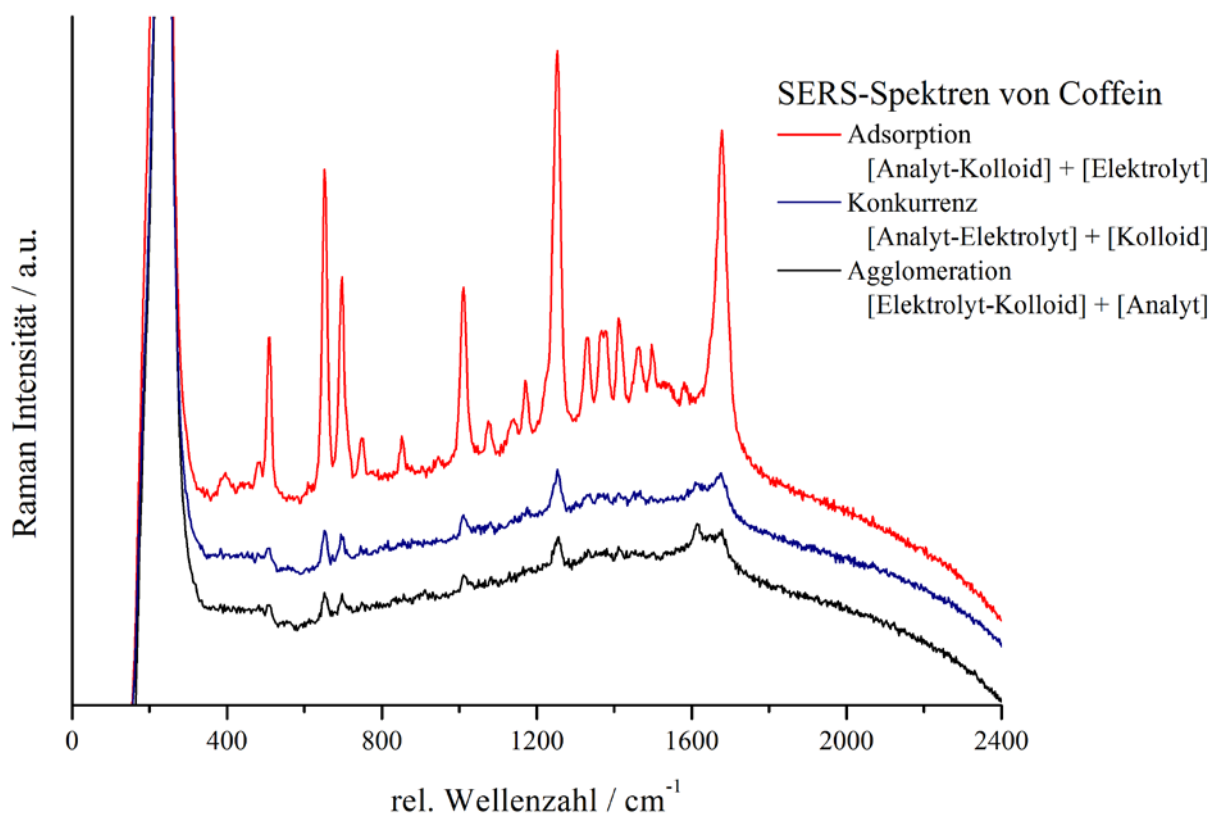


Abbildung 2-35: SERS-Spektren von Koffein bei verschiedenen Reihenfolgen der Zusammenmischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt. Messung mit Quarzglasküvette (siehe Kapitel 2.5.1) bei Endkonzentrationen von $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Mit Kolloid LL-80 bei einer Laserleistung von 70 mW und einer Ausleserate von 1 Hz [74].

2.6.2.1.1 Agglomeration

Zunächst wird die Agglomeration der Kolloide durch die Zugabe der Elektrolytlösung initiiert. Erst danach wird der Analyt dem Gemisch zugeführt, sodass dieser an bereits agglomerierten Metall-Kolloiden adsorbieren muss. Wie die geringe Signalintensität des schwarzen Kurvenverlaufs zeigt, kann nur ein schwaches SERS-Spektrum von Koffein erhalten werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass nur wenig Koffein in die Zwischenräume bereits agglomerierter Metall-Kolloide gelangt und somit die "hot spots" unbesetzt bleiben (siehe Abbildung 2-36).

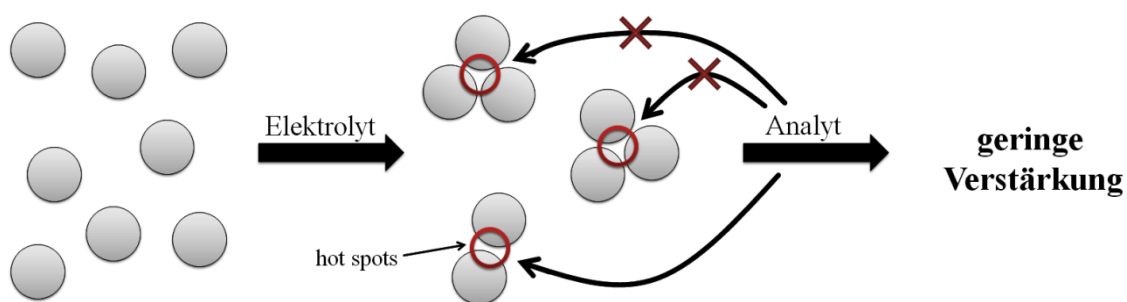


Abbildung 2-36: Reihenfolge der Substanzzusammenführung: Der Analyt wird einem zuvor angesetzten Elektrolyt-Kolloid-Gemisch zugegeben [74].

2.6.2.1.2 Konkurrenz

Wird das Kolloid in ein Gemisch aus Analyt und Elektrolyt gegeben, findet eine Konkurrenzreaktion zwischen der Adsorption des Analyten an der Kolloidoberfläche und der Agglomeration durch den Elektrolyten statt. Aufgrund der geringen Signalintensität (blauer Kurvenverlauf) wird vermutet, dass der Agglomerationsprozess deutlich schneller abläuft als die Adsorption des Analyten an der Metalloberfläche. Daher kann auch hier das Reaktionsschema nach Abbildung 2-36 angenommen werden, bei dem die "hot spots" weitgehend unbesetzt bleiben.

2.6.2.1.3 Adsorption

Wird zunächst Analyt und Metall-Kolloid zusammengeführt, kann der Analyt an der Metalloberfläche adsorbieren. Dadurch können die Analytmoleküle bei der nachgelagerten Agglomeration zwischen die Metall-Kolloide in die "hot spots" gelangen. Im Vergleich zu den anderen beiden Mischungsreihenfolgen wurde ein deutlich verstärktes SERS-Spektrum von Kof-

fein gemessen (roter Kurvenverlauf). Zum besseren Verständnis dient das Reaktionsschema nach Abbildung 2-37.

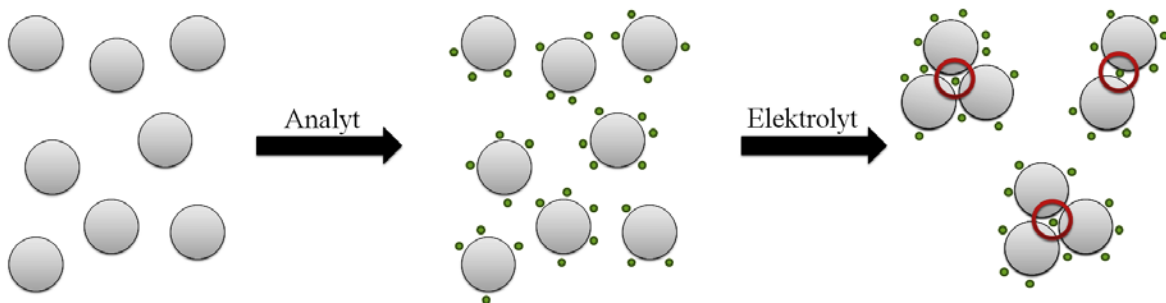


Abbildung 2-37: Reihenfolge der Substanzzusammenführung: Der Elektrolyt wird einem zuvor angesetzten Analyt-Kolloid-Gemisch zugegeben [74].

Die Ergebnisse zeigen, dass der Aufbau eines Online-Durchflussverfahrens so konzipiert werden muss, dass zunächst das Kolloid der mobilen Phase, in der sich der Analyt befindet, zugeführt werden muss. Erst nach der Adsorption des Analyten an der Kolloid-Oberfläche darf der Elektrolyt zur Initialisierung des Agglomerationsprozesses beigemischt werden.

2.6.2.2 Adsorptionszeiten des Analyten an der Kolloidoberfläche

In diesem Arbeitsschritt wurde die für einen optimalen SERS-Effekt benötigte Adsorptionszeit bestimmt [74]. Dazu werden zunächst mehrere identische Gemische aus Analyt und Kolloid vorgelegt und nach unterschiedlichen Zeitabständen der Elektrolyt zugegeben. Unmittelbar danach erfolgt die jeweilige SERS-Messung. Die erhaltenen SERS-Signalintensitäten der Koffein-Bande bei 1252 cm^{-1} sind in Abbildung 2-38 dargestellt. Die Messwerte steigen zunächst exponentiell an und laufen dann gegen eine Sättigung. Dies entspricht dem typischen Kurvenverlauf einer Adsorptionsisotherme. Qualitativ betrachtet befindet sich der optimale Zeitpunkt der Oberflächenbelegung bei etwa 45 s.

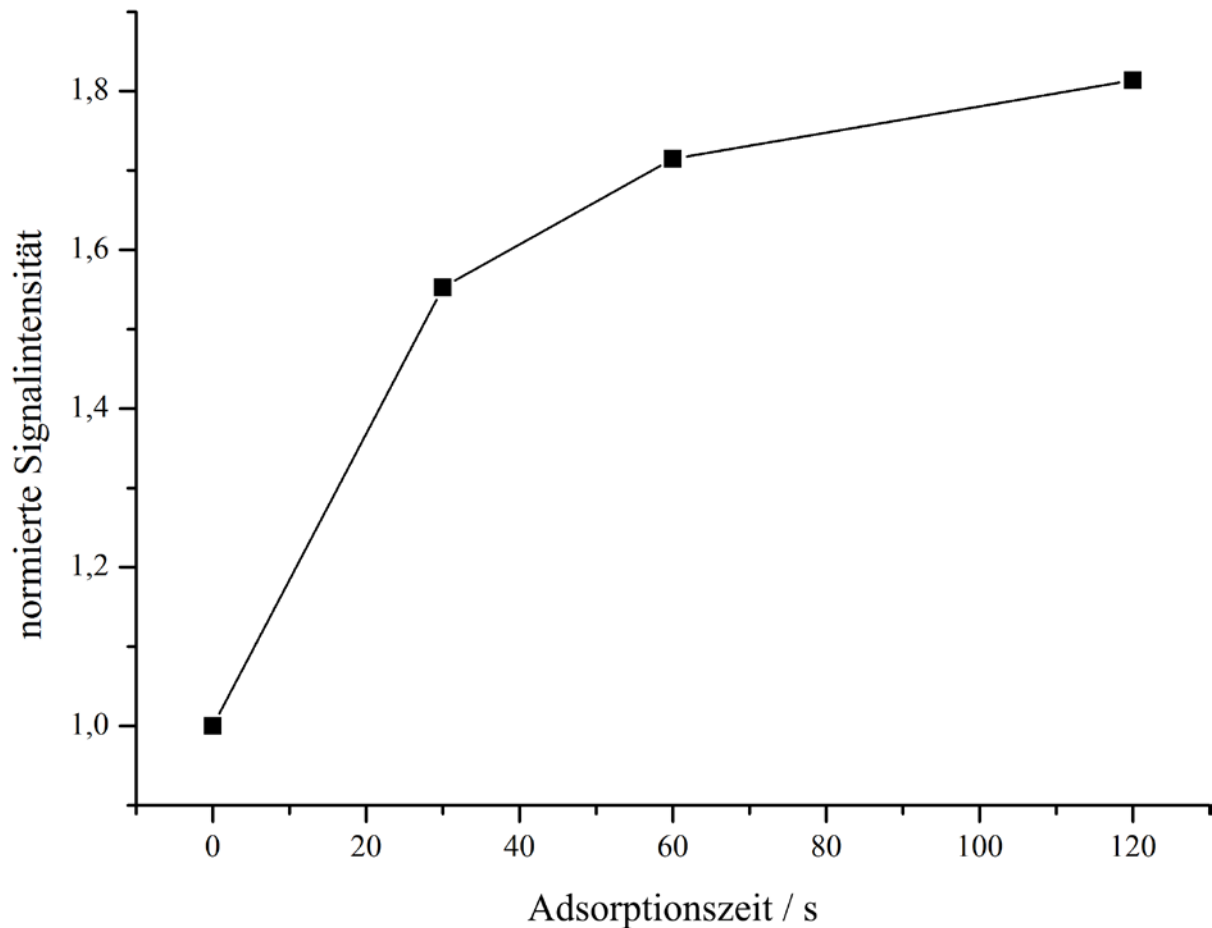


Abbildung 2-38: Auftragung der SERS-Signalintensitäten der Koffein-Bande bei 1253 cm^{-1} gegen die Adsorptionszeit. Normiert auf die Intensität der ersten Messung bei 0 Sekunden ohne Adsorptionszeit. Messung mit Edelstahlplatte bei Endkonzentrationen von $3,3 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$. Mit Kolloid LL-80 bei einer Laserleistung von 750 mW und einer Ausleserate von 1 Hz [74].

2.6.2.3 Agglomerationszeiten von Metall-Kolloiden bei Zugabe eines Elektrolyten

Die für den SERS-Effekt nötige Agglomeration der Kolloide wird kurz vor der Raman-Messung durch Zugabe eines Elektrolyten künstlich initiiert. Da für die Online Messungen nur wenig Zeit zur Verfügung steht, wurden verschiedene Salze und deren Einfluss auf die Agglomerationsgeschwindigkeit getestet und mittels DLS verfolgt [75]. Besonders schnell konnte eine Agglomeration mit KCl, HCl, CaCl_2 und KHSO_4 erreicht werden. Eine für den SERS-Effekt ausreichend starke Agglomeration wurde bereits nach ca. 5 Sekunden erreicht, optimal sind ca. 15 bis 20 Sekunden.

2.6.3 Langzeitstabilität bei Lagerung der Metall-Kolloide

Die Charakterisierung der eingesetzten Kolloide erfolgte unmittelbar nach der Synthese mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), UV/VIS-Spektroskopie und letztlich anhand der Qualität des SERS-Effektes selbst. Kolloide mit anfänglich besonders hoher SERS-Aktivität wurden zwecks Untersuchungen hinsichtlich der Langzeitstabilität ausgewählt und über mehrere Wochen in regelmäßigen Abständen gemessen [75].

Als besonders SERS-aktiv konnten Silberkolloide mit durchschnittlichen Partikelgrößen (z-Average) zwischen 40 und 70 nm identifiziert werden. Diese Kolloide zeigten im UV/VIS-Spektrum eine intensive Plasmonenresonanz zwischen 415 und 450 nm (siehe Kapitel 2.4). Lange Lagerzeiten stellen hinsichtlich der SERS-Aktivität keine Probleme dar. Viele der Kolloide können selbst nach 2 bis 3 Monaten problemlos für SERS-Messungen genutzt werden. Allerdings zeigen die Kolloidlösungen meist ab der zweiten Woche undefinierte Eigenspektren, die entweder aus Verunreinigungen der Probe, möglicherweise aber auch aus größeren Kolloid-Agglomeraten resultieren. Da diese Spektren aber nur vereinzelt und unstetig auftreten, können sie von den kontinuierlichen SERS-Spektren der Analyten leicht unterschieden werden.

2.7 Verwendung organischer Lösungsmittel als mobile Phase

Da in der HPLC standardmäßig organische Lösungsmittel als mobile Phase verwendet werden, wurde deren Einfluss auf den SERS-Effekt untersucht [74]. Typischerweise wird zur chromatografischen Trennung der Substanzen ein Lösungsmittelgradient gefahren. Es besteht allerdings die Möglichkeit, nach der Trennung einen inversen Lösungsmittelgradienten anzulegen [77], so dass während der Detektion immer eine isokratische Zusammensetzung der mobilen Phase von z. B. 50/50 (v/v) Wasser/Lösungsmittel-Gemisch vorliegt. Vor diesem Hintergrund wurden SERS-Messungen bei anteilig 50 % organischem Lösungsmittel in Wasser durchgeführt.

Die Abbildung 2-39 zeigt exemplarisch die SERS-Spektren von Koffein in reinem Wasser (schwarzer Kurvenverlauf) sowie in einem 50/50 (v/v) Wasser/Methanol-Gemisch (roter Kurvenverlauf). Die Raman-Übergänge des Methanols sind im Spektrum markiert und liegen bei 1022 und 1462 cm^{-1} . Die prägnante Bande ganz links im Spektrum bei 240 cm^{-1} resultiert aus Silberchlorid, das als Nebenprodukt bei der Agglomeration ausfällt. Alle anderen Banden zwischen 400 und 1700 cm^{-1} können dem SERS-Spektrum von Koffein zugeordnet werden. Die SERS-Signale des Koffeins bleiben nach anteiligem Methanolersatz des Wassers vollständig erhalten und die Signalintensitäten können als annähernd deckungsgleich betrachtet werden.

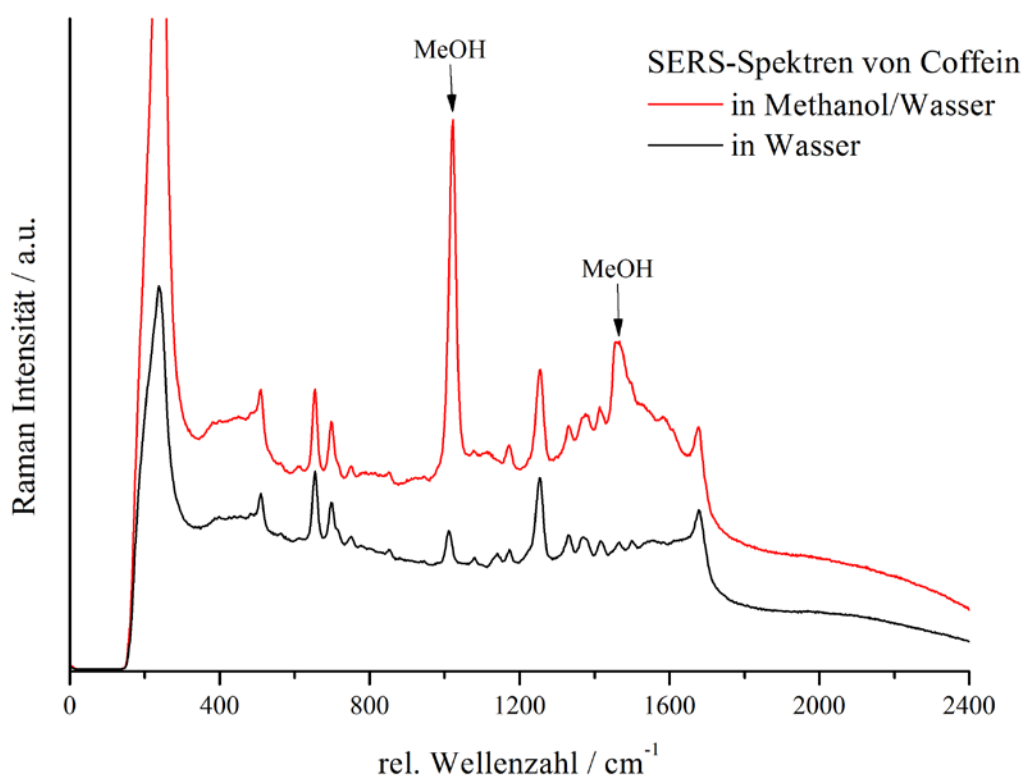


Abbildung 2-39: SERS-Spektren von Koffein in Wasser (schwarzer Kurvenverlauf) und einem 50/50 (v/v) Wasser/Methanol-Gemisch (roter Kurvenverlauf). Messung mit Edelstahlplatte bei einer Endkonzentration von $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Mit Kolloid ZD-60, bei einer Laserleistung von 750 mW und einer Aufnahmezeit von 1 Hz [74].

Die Anwesenheit von Methanol, Ethanol, Acetonitril und Aceton führte im Vergleich zu Messungen in reinem Wasser zur keiner nennenswerten Beeinträchtigung der Signalintensitäten. Eine Frequenzverschiebung der Raman-Banden konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Die genannten Lösungsmittel können daher für eine Kopplung von HPLC mit der SERS-Spektroskopie verwendet werden. Isopropanol hingegen führte zu einem starken Einbruch der SERS-Intensität.

2.8 Optimierung des Raman-Detektors

Ein Problem stellte zu Beginn der Projektarbeiten die Laserlicht-Einkopplung und Raman-Streulicht-Auskopplung in bzw. aus der Teflon-AF-Kapillare dar. Die bisher genutzte Adaption (siehe Abschlussbericht IGF Forschungsvorhaben Nr. 16120 N) wies ein Totvolumen direkt hinter dem optischen Fenster zur Lichtkopplung auf. Das Totvolumen entstand durch einen Dichtring, der zwischen dem optischen Fenster und der Edelstahlfassung eingebacht wurde. Insbesondere bei häufigem Wechsel der Metall-Kolloid- und Elektrolyt-Lösungen geriet Luft in das Kapillarsystem, die sich als Gasblase im Totvolumen sammelte. Dies führte aufgrund optischer Abbildungsfehler zu einem nahezu vollständigen Verlust des Raman-Signals. Zudem können sich dort Metall-Kolloide abscheiden, die neben Verunreinigung und geringerem Lichtdurchsatz zu unerwünschten Memory-Effekten führen.

2.8.1 Entwicklung einer Lichtkoppeloptik mit wechselbarem Inlay

Aus genannten Gründen wurde daher ein neuer, möglichst totvolumenfreier optischer Adapter konzipiert und in das HPLC-Raman-System integriert [71]. Die Abbildung 2-40 zeigt eine Explosionszeichnung der SERS-Messzelle, bestehend aus Lichtkoppeloptik und Flüssigkern-Lichtwellenleiter. Die Abbildung 2-41 zeigt ergänzend eine Schnittzeichnung von Außenfassung und Inlay. Eine technische Zeichnung mit den genauen Bemaßungen befindet sich im Anhang unter Kapitel 5.5, Abbildung 5-1.

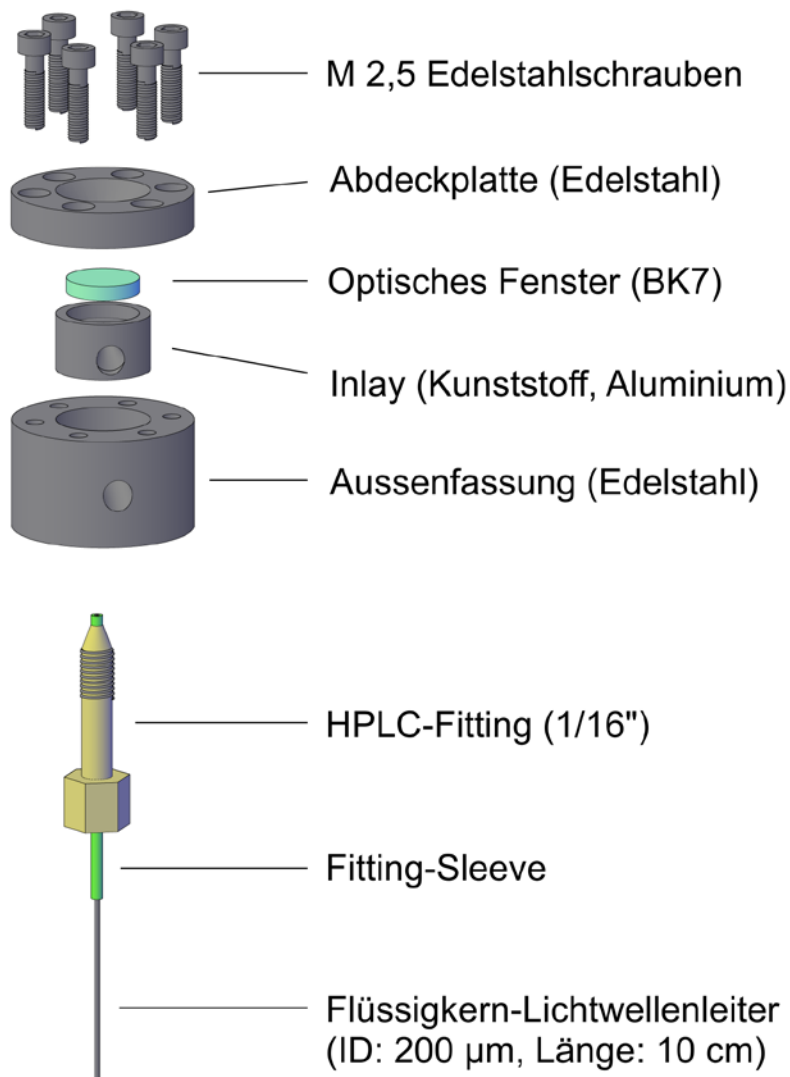


Abbildung 2-40: Explosionszeichnung der Lichtkoppeloptik mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].

Die Lichtkoppeloptik besteht im Wesentlichen aus vier Bauteilen, deren Basis die Außenfassung aus Edelstahl bildet. Diese enthält zwei Gewindebohrungen (UNF 10-32) zur Adaption des Flüssigkern-Lichtwellenleiters von unten, sowie für die flüssigkeitszuführende Kapillare von der Seite (siehe dazu auch Abbildung 2-41). In die Außenfassung lässt sich ein wechselbares Inlay aus Kunststoff pressen, in dem sich die entsprechenden Konen zur Abdichtung der HPLC-Fittings befinden, sowie zwei Bohrungen, die sich in einem Punkt genau an der Oberfläche des Inlays treffen. Das senkrechte Bohrloch wird direkt, ohne die Verwendung zusätzlicher Dichtringe oder -folien, mittels eines optischen Fensters aus BK7 abgedeckt. Um eine ausreichende Dichtung zu gewährleisten, wird das Fenster mit einer Abdeckplatte aus Edelstahl angepresst. Die M 2,5 Edelstahlschrauben werden mit einem Drehmoment von 0,8 Nm angezogen.

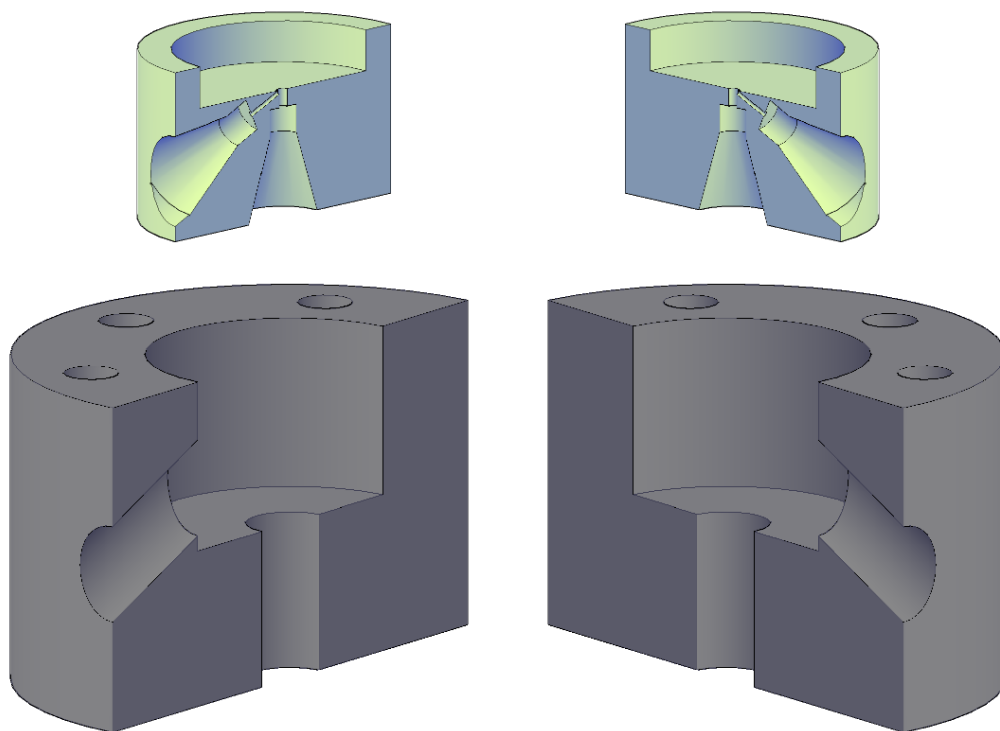


Abbildung 2-41: Schnitzzeichnung der Lichtkoppeloptik mit Inlay (oben) und Außenfassung (unten) [71].

Während der Projektarbeiten wurden verschiedene Materialien als Inlay eingesetzt und getestet. Ein Foto der verschiedenen Inlays zeigt die Abbildung 2-42. Die Untersuchungen bezogen sich vornehmlich auf Dichtigkeit, mechanische Festigkeit, chemische Beständigkeit, Untergrundfluoreszenz und Memory-Effekte.

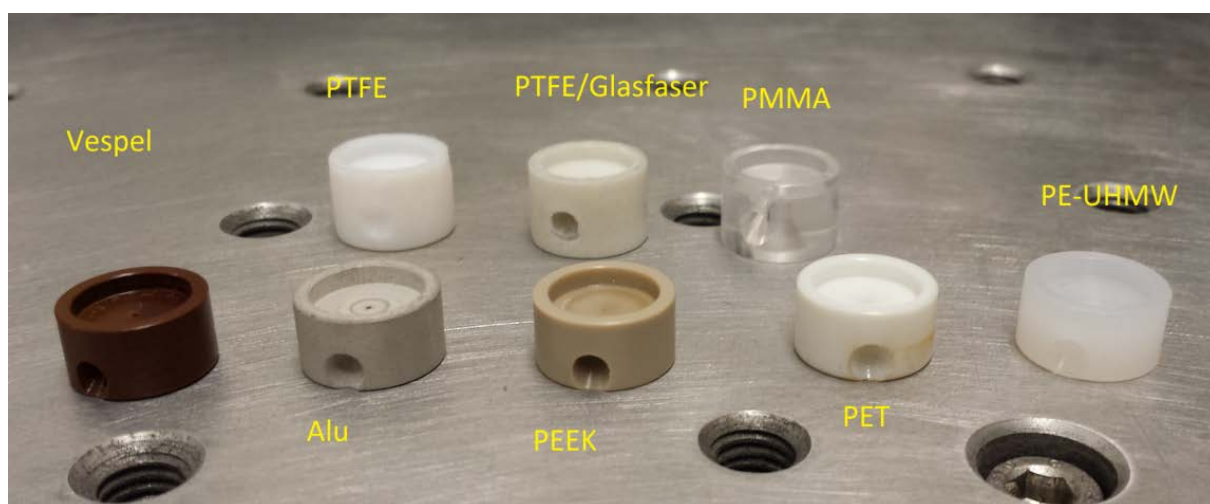


Abbildung 2-42: Verschiedene Inlay-Materialien für die Lichtkoppeloptik [71].

Die Tabelle 2-12 fasst die verschiedenen Eigenschaften der Materialien hinsichtlich der Verwendbarkeit als Inlay zusammen. Dabei sind eine chemische Unbeständigkeit gegen die verwendeten Chemikalien (z. B. Lösungsmittel der mobilen Phase), eine mögliche Untergrundfluoreszenz aus dem Material selbst heraus, sowie mögliche Memory-Effekte aufgrund

einer zu rauen Materialoberfläche als absolute Ausschlusskriterien zu betrachten. Aus diesen Gründen sind Vespel, PEEK, glasfaserverstärktes PTFE, PMMA und PE-UHMW nicht als Inlay-Material geeignet. Aluminium kann nur bei Verwendung einer Dichtfolie zwischen Metall und Glasfenster eingesetzt werden, welche allerdings ein zusätzliches Totvolumen einbringen würde. Daher wurde auch auf die Verwendung von Aluminium verzichtet. Teflon zeigte eine zu geringe mechanische Belastbarkeit, da durch den Andruck des Fensters die Bohrungen zusammengedrückt und der Fluss unterbrochen wurden. Mit PET konnte ein guter Kompromiss zwischen Dichtfähigkeit und mechanischer Belastbarkeit gefunden werden. Mit dem PET-Inlay wurde eine bis 50 bar druckstabile Lichtkoppeloptik realisiert.

Tabelle 2-12: Getestete Materialien als Inlay für die Lichtkoppeloptik.

Material	Dichtigkeit	Mechanische Festigkeit	Chemische Beständigkeit gegen die verwendeten Lösemittel	Untergrundfluoreszenz	Memory-Effekte
Vespel	nein	sehr hoch	ja	ja	nein
PEEK	nein	sehr hoch	ja	ja	nein
PTFE (Teflon)	ja	gering	ja	nein	nein
PTFE glasfaser-verstärkt	ja	mittel	ja	nein	ja
PET	ja	mittel	ja	nein	nein
PMMA	bedingt	hoch	nein *	nein	
PE-UHMW	ja	gering	ja	ja	ja
Aluminium	nein **	sehr hoch	ja	nein	nein

* nicht beständig gegen Acetonitril

** nur mit Dichtfolie, daher zusätzliches Totvolumen

2.8.2 Beschichtung des Einkoppelfensters mit Teflon AF

Im Laufe der Arbeiten stellte sich heraus, dass eine Abscheidung der Silber-Kolloide auf dem Einkoppelfenster der Durchflusszelle zu starken Intensitätsverlusten bei der Raman-Streulicht-Detektion führte [71,74]. Dies ist auf der Fotografie in Abbildung 2-43 ersichtlich. Eine Reinigung der Zelle war nur unter Verwendung von 6 M Salpetersäure möglich. Dabei wurde allerdings der Flüssigkern-Lichtwellenleiter irreparabel beschädigt. Zum Schutz vor einer Kolloid-Abscheidung wurde daher das Einkoppelfenster mit Teflon-AF beschichtet.

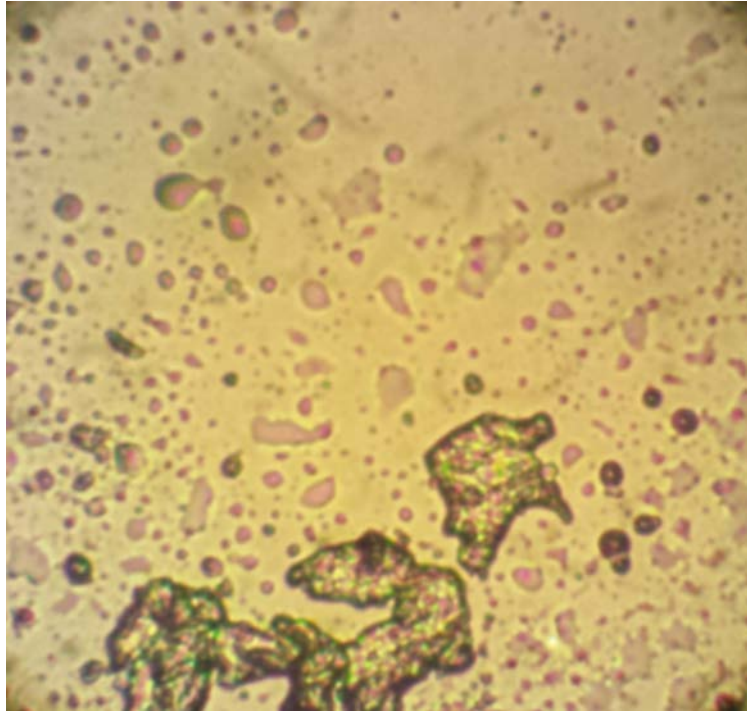


Abbildung 2-43: Partikelabscheidung auf dem Einkoppelfenster (Lichtmikroskop-Aufnahme) [71].

Mit der hydrophoben Beschichtung des Einkoppelfensters konnte die Abscheidung der Metall-Kolloide deutlich verringert werden. Dennoch konnte die Belegung nicht vollständig vermieden werden, sodass eine tägliche Reinigung erforderlich ist.

2.9 SERS-Messergebnisse

2.9.1 Überprüfung allgemeiner SERS-Aktivitäten an ausgewählten Modellsubstanzen

Alle in Tabelle 5-5 (siehe Kapitel 5.4) aufgeführten Modellsubstanzen wurden auf ihre allgemeine SERS-Aktivität hin untersucht [71,72]. Die Messungen erfolgten unter Verwendung des experimentellen Aufbaus, der in Abschnitt 2.5.1 beschrieben ist, auf der Edelstahlplatte mit Probenmulde. Je nach Löslichkeit der Proben wurden die Messungen in einem 50/50 (v/v) Wasser/Methanol- oder Wasser/Acetonitril-Gemisch durchgeführt. Tabelle 2-13 fasst nur die Analyten zusammen, an denen ein SERS-Effekt beobachtet werden konnte. Zudem wurden die SERS-Intensitäten der Substanzen miteinander verglichen und als relative SERS-Intensitäten in der Tabelle hinterlegt.

Tabelle 2-13: Substanzen, bei denen eine SERS-Aktivität beobachtet wurde und Bewertung der relativen SERS Intensitäten mit: +++ sehr stark, ++ mittel, + schwach.

Bezeichnung	CAS-Nr.	Lösungsmittel	Relative SERS-Intensität
Nilblau als SERS-Referenz	2381-85-3	Wasser	+++
Acenaphthylen	208-96-8	ACN / H ₂ O	+
Anthracen	120-12-7	ACN / H ₂ O	++
Benzo[a]pyren	50-32-8	ACN / H ₂ O	+
Benzo[b]fluoranthren	205-99-2	ACN / H ₂ O	++
Dibenzo[a,h]anthracen	53-70-3	ACN / H ₂ O	+
Indeno[1,2,3-cd]pyren	193-39-5	ACN / H ₂ O	++
Phenantren	85-01-8	ACN / H ₂ O	++
Pyren	129-00-0	ACN / H ₂ O	+
Amitriptylin	50-48-6	MeOH / H ₂ O	++
Flavon	525-82-6	MeOH / H ₂ O	+
Prokainamid	51-06-9	MeOH / H ₂ O	+
Propranolol	525-66-6	MeOH / H ₂ O	++
Sulfamethoxazol	723-46-6	MeOH / H ₂ O	+
Adenin	73-24-5	MeOH / H ₂ O	+++
Cytosin	71-30-7	MeOH / H ₂ O	+
Papaverin	58-74-2	MeOH / H ₂ O	+
Sulfamethizol	144-82-1	MeOH / H ₂ O	+
Thymin	65-71-4	MeOH / H ₂ O	+

2.9.2 SERS-Messungen im Durchfluss - Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche wurden mit dem experimentellen Aufbau nach Kapitel 2.5.2 durchgeführt. Bei diesem Aufbau werden Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt in einem Glasgefäß vorgemischt und anschließend mittels Handinjektor in den Fluss injiziert. In ersten Testläufen erfolgte ein direkter Vergleich zwischen Flüssigkern-Lichtwellenleiter und "nicht"-Flüssigkernlichtwellenleiter (Kapillare aus FEP) [71]. Mit diesen Versuchen sollte ermittelt werden, inwieweit sich der Flüssigkern-Lichtwellenleiter in Gegenwart von Metall-Kolloiden weiterhin nutzen lässt bzw. noch einen Mehrwert hinsichtlich der Erhöhung der Raman-Intensität darstellt. Die Tabelle 2-14 zeigt die dazu verwendeten Mess-einstellungen.

Tabelle 2-14: Messparameter für SERS-Messungen im Durchfluss "ohne" und "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter.

Messparameter	Einstellung
Anregungswellenlänge	532 nm
Laserleistung	20 mW (cw)
Ausleserate CCD-Detektor	2 Hz
Durchflusszelle	Material: FEP und Teflon AF 2400 Länge: 10 cm Innendurchmesser: 200 µm
Mobile Phase	50/50 (v/v) Wasser/Methanol
Flussrate	0,6 mL min ⁻¹
Testsubstanz	Adenin, CAS-Nr.: 73-24-5
Konzentration der Stammlösung	5 × 10 ⁻⁵ M bis 5 × 10 ⁻⁹ M
Injektionsvolumen	1 µL

Die Abbildung 2-44 zeigt die SERS-Spektren von Adenin im Durchfluss "ohne" die Verwendung eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters nach dem in Abbildung 2-29, linke Seite dargestellten Versuchsaufbau. Die grau hinterlegten Raman-Signale können dem Methanol aus der mobilen Phase zugeordnet werden, die übrigen Raman-Signale zeigen das SERS-Spektrum von Adenin. Die beiden stärksten SERS-Signale des Adenins liegen bei 734 und 1325 cm⁻¹. Der grün dargestellte Kurvenverlauf wurde als Detektionsgrenze ermittelt. Dabei wurde 1 µL einer 5 × 10⁻⁷ M Stammlösung von Adenin in 50/50 (v/v) Wasser/Methanol in die mobile Phase injiziert.

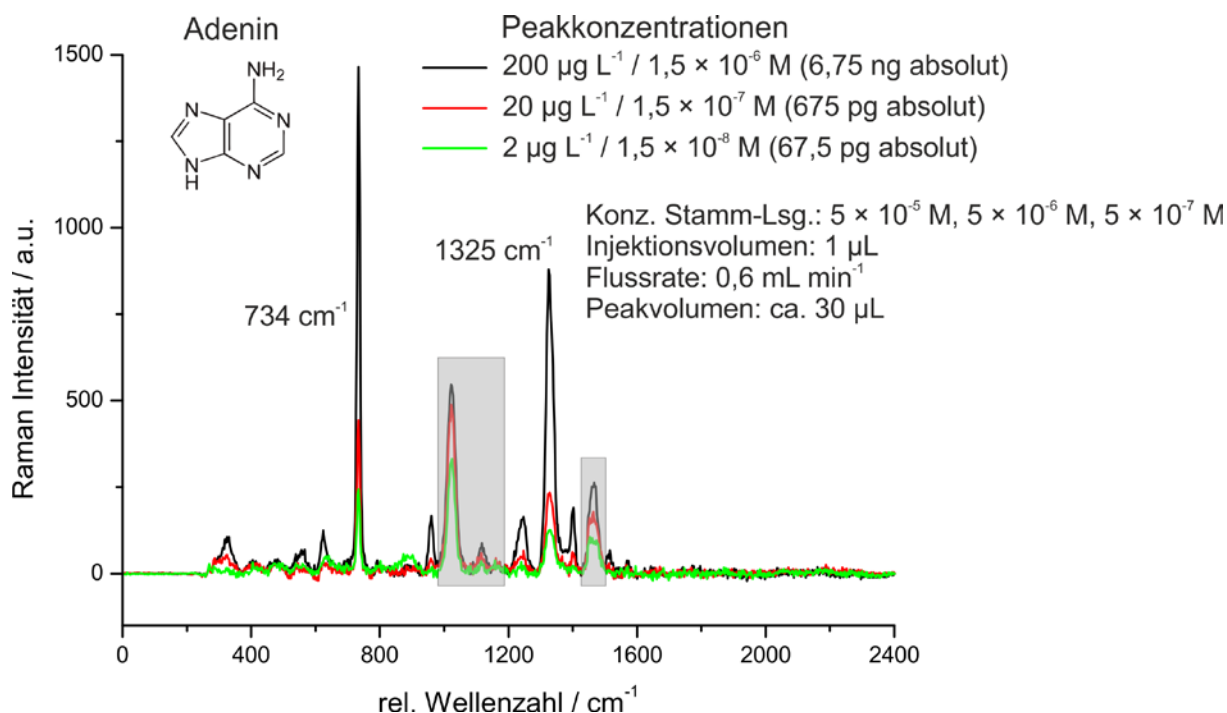


Abbildung 2-44: Konzentrationsabhängige SERS-Messungen von Adenin im Durchfluss "ohne" Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].

Die tatsächlich in der Durchflusszelle gemessene Adenin-Konzentration wird als Peakkonzentration angegeben. Dazu wurde das entsprechende Peakvolumen anhand der zeitlichen Verfolgung des prägnanten Adenin-Signals bei 734 cm^{-1} ermittelt (siehe Abbildung 2-45). Die Testsubstanz Adenin durchläuft die Raman-Messzelle innerhalb von 3 Sekunden. Bei einer Flussrate von 0,6 mL min^{-1} kann ein Peakvolumen von ca. 30 μL berechnet werden, in dem sich für den grünen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 2-44) eine Injektionsmenge von absolut 67,5 pg Adenin befindet. Die Erfassungsgrenze liegt daher bei einer Peakkonzentration von $1,5 \times 10^{-8}$ M (2 $\mu\text{g L}^{-1}$).

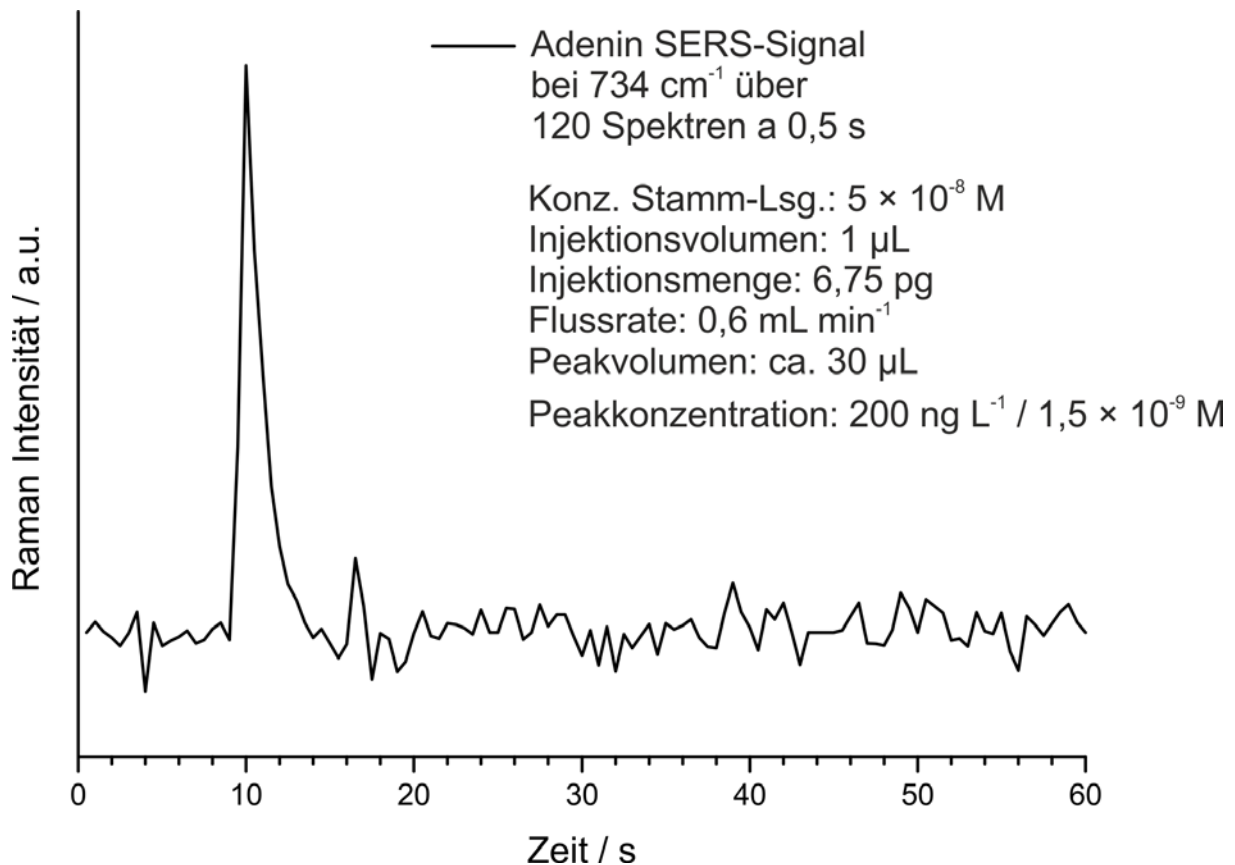


Abbildung 2-45: SERS-Chromatogramm bei Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt [71].

In den folgenden Messreihen wurde die FEP-Kapillare durch eine Kapillare aus Teflon AF 2400 ersetzt, die als Flüssigkern-Lichtwellenleiter fungiert (siehe Abbildung 2-29, rechte Seite). Bei unveränderten Messeinstellungen konnte die Erfassungsgrenze für Adenin auf eine Peakkonzentration von $1,5 \times 10^{-10}$ M (20 ng L⁻¹) gesenkt werden. Dies entspricht einer Verstärkung der SERS-Signalintensität um den Faktor 100. Das Ergebnis zeigt, dass die Raman-verstärkenden Effekte von SERS-Spektroskopie und Flüssigkern-Lichtwellenleiter miteinander kombiniert werden können.

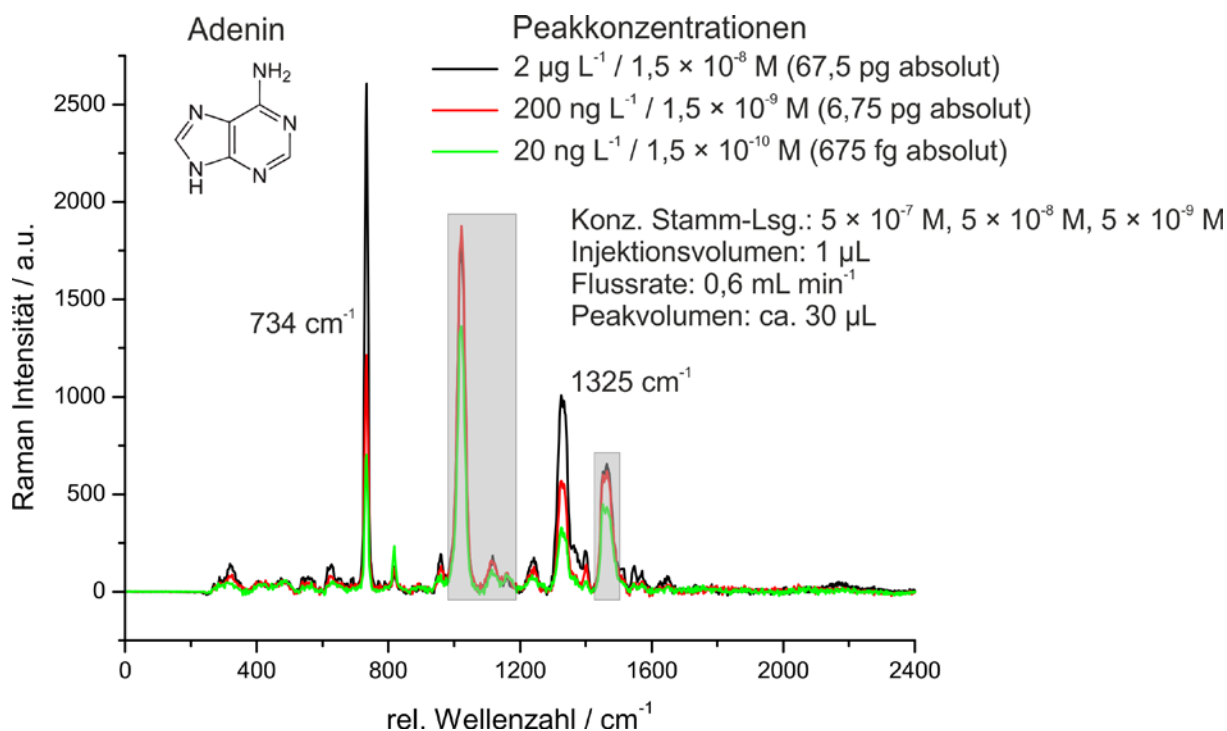


Abbildung 2-46: Konzentrationsabhängige SERS-Messungen von Adenin im Durchfluss "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71].

Auf Basis des in Abbildung 2-29 auf der rechten Seite dargestellten Versuchsaufbaus, der die SERS-Spektroskopie mit der Technologie des Flüssigkern-Lichtwellenleiters vereint, wurden alle SERS-aktiven Substanzen (siehe Tabelle 2-13) gemessen und deren Erfassungsgrenzen bestimmt. Die gerätetechnischen Messeinstellungen blieben entsprechend der Tabelle 2-14 unverändert. Die mobile Phase wurde je nach Substanz von 50/50 (v/v) Wasser/Methanol auf 50/50 (v/v) Wasser/Acetonitril gewechselt. Die Messergebnisse sind in der Tabelle 2-15 zusammengefasst.

Tabelle 2-15: Bestimmung der SERS-Erfassungsgrenze im Flüssigkern-Lichtwellenleiter [71,72].

Bezeichnung	CAS-Nr.	Mobile Phase	LOD / mol L ⁻¹
Nilblau (SERS-Referenz-Standard)	2381-85-3	Wasser	$1,0 \times 10^{-10}$
Acenaphthylen	208-96-8	ACN / H ₂ O	$3,3 \times 10^{-5}$
Anthracen	120-12-7	ACN / H ₂ O	$2,8 \times 10^{-8}$
Benzo[a]pyren	50-32-8	ACN / H ₂ O	$2,0 \times 10^{-5}$
Benzo[b]fluoranthen	205-99-2	ACN / H ₂ O	$2,0 \times 10^{-7}$
Dibenzo[a,h]anthracen	53-70-3	ACN / H ₂ O	$1,8 \times 10^{-5}$
Indeno[1,2,3-cd]pyren	193-39-5	ACN / H ₂ O	$1,8 \times 10^{-8}$
Phenantren	85-01-8	ACN / H ₂ O	$2,8 \times 10^{-8}$
Pyren	129-00-0	ACN / H ₂ O	$2,5 \times 10^{-6}$
Amitriptylin	50-48-6	MeOH / H ₂ O	$7,2 \times 10^{-8}$
Flavon	525-82-6	MeOH / H ₂ O	$1,0 \times 10^{-6}$
Prokainamid	51-06-9	MeOH / H ₂ O	$8,0 \times 10^{-5}$
Propranolol	525-66-6	MeOH / H ₂ O	$7,7 \times 10^{-7}$
Sulfamethoxazol	723-46-6	MeOH / H ₂ O	$7,9 \times 10^{-5}$
Adenin	73-24-5	MeOH / H ₂ O	$1,5 \times 10^{-10}$
Cytosin	71-30-7	MeOH / H ₂ O	$1,8 \times 10^{-6}$
Papaverin	58-74-2	MeOH / H ₂ O	$6,0 \times 10^{-5}$
Sulfamethizol	144-82-1	MeOH / H ₂ O	$7,5 \times 10^{-5}$
Thymin	65-71-4	MeOH / H ₂ O	$1,6 \times 10^{-4}$

Die Messungen zeigen, dass die SERS-Intensitäten stark von der Molekülstruktur abhängen. Die Peakkonzentrationen schwanken je nach Testsubstanz in Bereichen zwischen 10^{-4} M (Thymin) und 10^{-10} M (Nilblau und Adenin).

2.9.3 SERS-Messungen im Durchfluss - Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt

In diesem Kapitel werden die Messergebnisse zur Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt beschrieben. Der experimentelle Aufbau ist der Abbildung 2-30 (Kapitel 2.5.3) zu entnehmen. Die Abbildung 2-47 zeigt das erhaltene SERS-Spektrum von Adenin mit einer Erfassungsgrenze von $1,6 \times 10^{-8}$ M ($2 \mu\text{g L}^{-1}$).

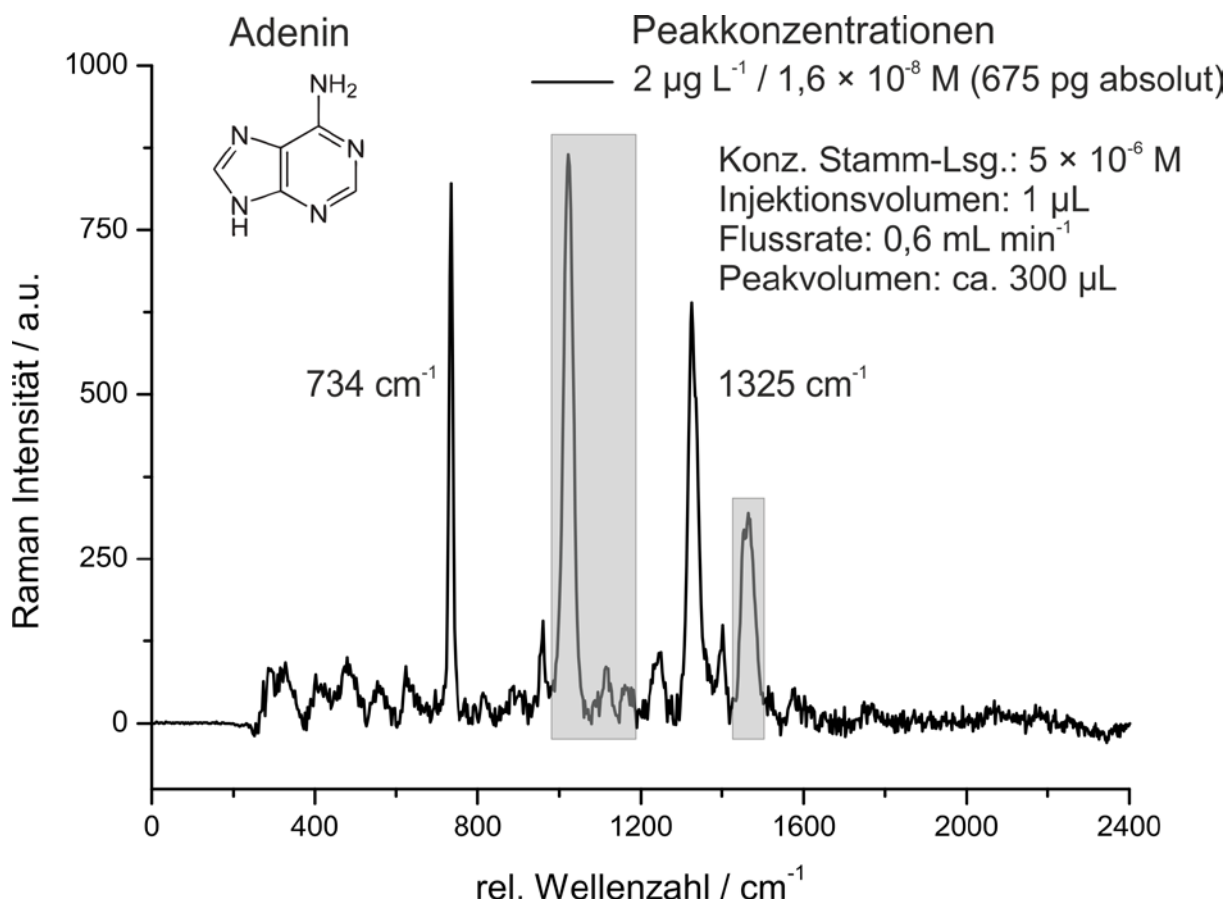


Abbildung 2-47: SERS-Messungen von Adenin im Durchfluss "mit" Flüssigkern-Lichtwellenleiter und Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt [71].

Im Vergleich zu den Messungen, bei denen eine Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt durchgeführt wurde (siehe Abbildung 2-46), liegt die Erfassungsgrenze bezogen auf die Peakkonzentration um etwa den Faktor 100 höher ($1,6 \times 10^{-8}$ M zu $1,5 \times 10^{-10}$ M). Die Konzentration der injizierten Stammlösung liegt im Vergleich sogar um den Faktor 1000 höher (5×10^{-6} M zu 5×10^{-9} M). Die Differenz um den Faktor 10 lässt sich anhand eines stark erhöhten Peakvolumens erklären. Die Abbildung 2-48 vergleicht die beiden SERS-Chromatogramme für "Vormischung" und "Online-Zusammenführung" anhand der zeitlichen Verfolgung des Raman-Signals bei 734 cm^{-1} . Besonders auffällig zeigt sich die extreme Peakverbreiterung und Ausbildung eines Doppelpeaks, die aus dem hohen Kapillarovolumen (siehe Kapitel 2.5.3) bei der Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt resultiert. Ein Großteil des Adenins durchläuft die Raman-Messzelle binnen 30 Sekunden, woraus sich ein Peakvolumen von mindestens 300 μL ergibt. Das Peakvolumen bei Online-Zusammenführung ist damit um den Faktor 10 größer als das Peakvolumen bei Vormischung (30 μL). Daraus resultiert eine um den Faktor 10 geringere Peakkonzentration, die o. g. Differenz zwischen Konzentration der Stammlösung (Faktor 1000) und Peakkonzentration (Faktor 100) erklärt.

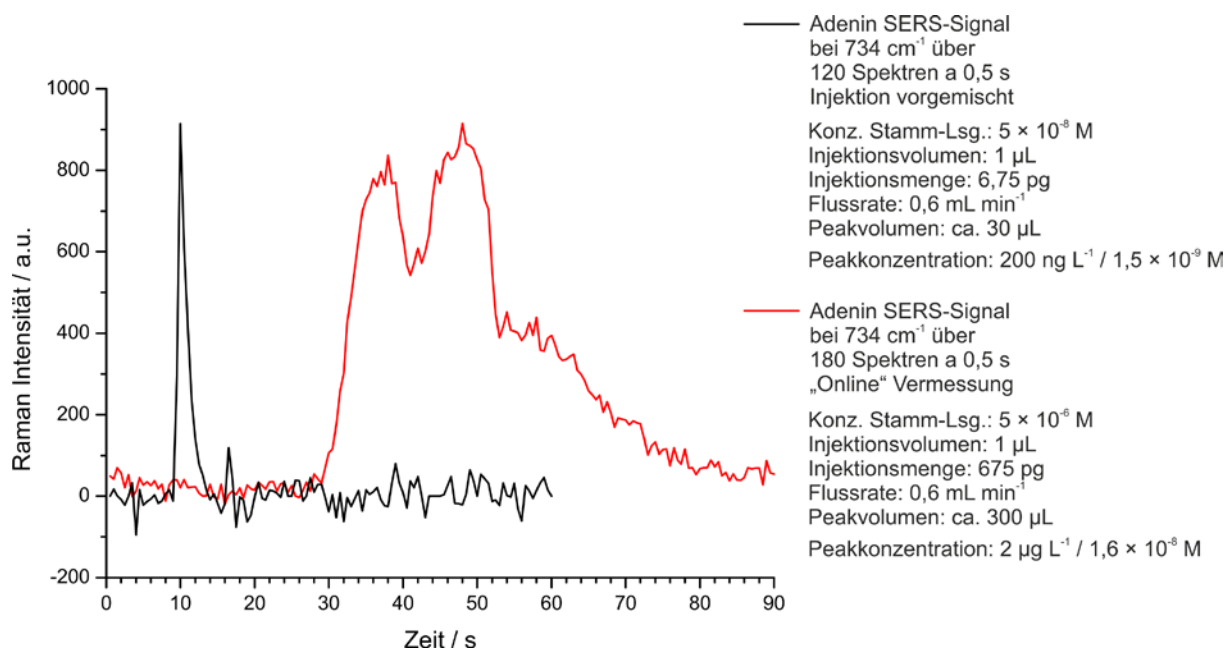


Abbildung 2-48: SERS-Chromatogramme: Vergleich Vormischung vs. Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt [71].

Dennoch bleibt trotz Berücksichtigung der Peakverbreiterung eine Erhöhung der Erfassungsgrenze um den Faktor 100 (Peakkonzentration) bestehen. Dies kann zwei Ursachen haben:

Zum einen konnte beobachtet werden, dass der permanente Durchfluss von Metall-Kolloid und Elektrolyt durch die SERS-Messzelle zu einer raschen Belegung der optischen Oberflächen durch abgeschiedene Metall-Kolloide führt. Die Abbildung 2-49 zeigt die Raman-Spektren der mobilen Phase 50/50 (v/v) Wasser/Methanol nach Einbau eines neuen Flüssigkern-Lichtwellenleiters (schwarzer Kurvenverlauf), nach 37 Einzelinjektionen einer Vormischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt mittels Handinjektor über einen gesamten Messtag (roter Kurvenverlauf), sowie nach 3 Minuten Online-Zusammenführung (blauer Kurvenverlauf). Im Vergleich zu einem neuen Flüssigkern-Lichtwellenleiter bricht das Raman-Signal nach Online-Zusammenführung um den Faktor 10 ein.

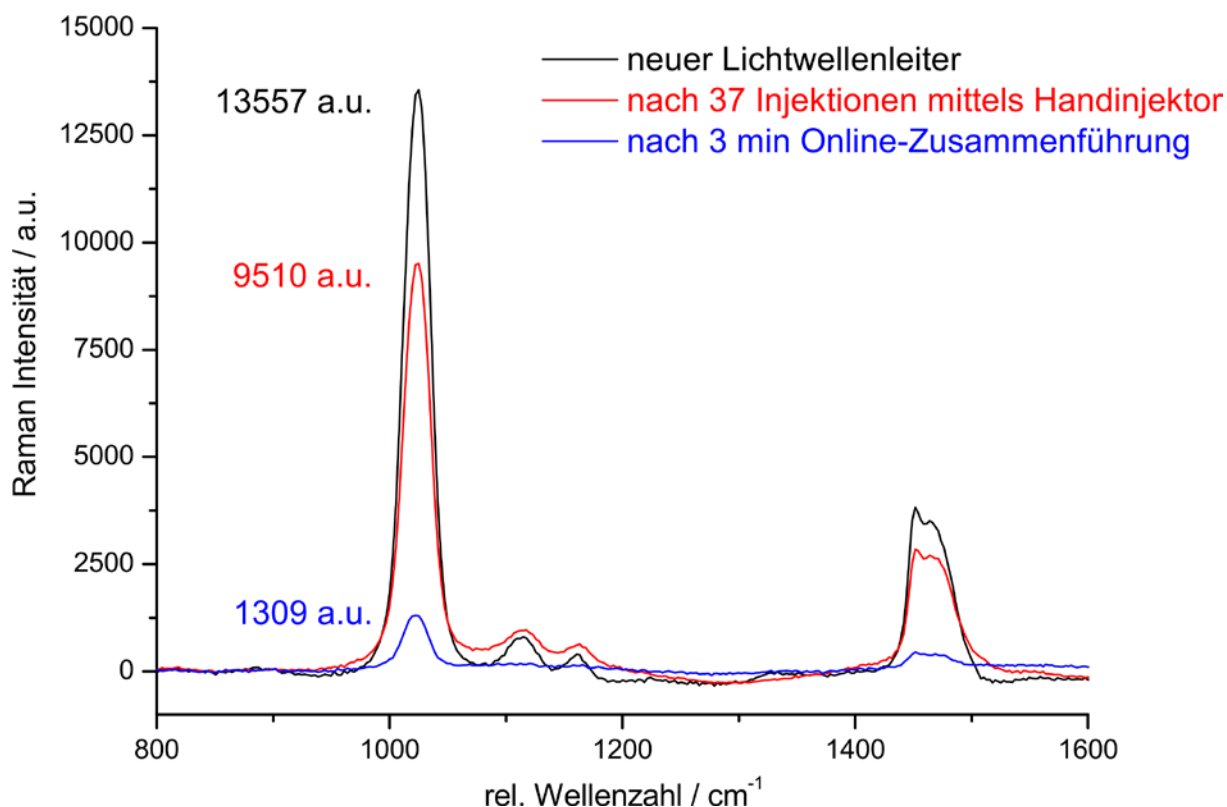


Abbildung 2-49: Darstellung der Belegung der SERS-Messzelle durch die Abscheidung von Metall-Kolloiden [71].

Zum anderen ist denkbar, dass die Online-Zusammenführung in den Kapillaren mittels normaler HPLC-T-Stücke zu keiner ausreichenden Durchmischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt führt. Speziell entwickelte T-Stücke, die zu einer turbulenten Durchmischung der zugeführten Kapillarströme führen, sind für Flussraten ab 1 mL min⁻¹ ausgelegt. Dies würde allerdings zu extrem hohen Gegendrücken aufgrund der hohen Kapillarweglängen führen. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Durchmischung zu einem hohen Anteil auf Basis reiner Diffusion erfolgt. Dies würde sich insbesondere auf eine homogene Verteilung der Metall-Kolloide negativ auswirken, die mit Diffusionskoeffizienten in Größenordnungen um 10⁻¹¹ m² s⁻¹ einen um den Faktor 100 geringeren Diffusionskoeffizienten aufweisen als die verwendeten Analyten und Elektrolyten (typischerweise um 10⁻⁹ m² s⁻¹). Eine schlechte Durchmischung der eingesetzten Substanzen würde den SERS-Effekt drastisch abschwächen und könnte einen zusätzlichen Intensitätsverlust um den Faktor 10 erklären.

Hinzu kommt die Tatsache, dass für die Adsorption eine Reaktionsdauer von 15 s und für die folgende Agglomeration 5 s zur Verfügung stehen (siehe auch Kapitel 2.5.3). In Kapitel 2.6.2 wurde allerdings festgestellt, dass die optimale Adsorptionszeit mindestens 45 Sekunden, die Agglomerationsdauer eher 15 Sekunden betragen sollte. Aufgrund der beschriebenen Probleme zum Kapillarovolumen (Peakverbreiterung und Gegendruck) können im Rahmen einer "echten" Online-Kopplung keine längeren Reaktionszeiten eingeräumt werden.

2.10 Kopplung des Raman-Detektors mit UV und MS-Detektion

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens war die simultane Multi-Detektion verschiedener Modellanalyten mit Hilfe des entwickelten Raman-Detektors, eines UV/VIS-Detektors als auch mit Hilfe eines Massenspektrometers geplant. Die Kopplung konnte allerdings aufgrund der in Kapitel 2.9.3 dargestellten Probleme bei der Online-Zusammenführung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt nicht mehr im Rahmen der Projektarbeiten realisiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass einer erfolgreichen Online-Kopplung zum jetzigen Stand der Entwicklungen vier grundsätzliche Hindernisse im Weg stehen:

1. Hohes Kapillarovolumen
2. Niedrige Adsorptions- und Agglomerationszeiten für Analyt und Metall-Kolloid
3. Belegung der Raman-Messzelle durch Metall-Kolloide
4. Inhomogene Online-Durchmischung von Analyt, Metall-Kolloid und Elektrolyt

In diesem Abschnitt soll dennoch das Potential dieser Multidetektions-Technologie aufgezeigt werden. In Abschnitt 2.3 wurde ausführlich erörtert, welche unterschiedlichen chromatografischen Messmodi im Rahmen der HPLC-Raman-Kopplung zur Verfügung stehen. Selbst wenn alle dort beschriebenen chromatografischen Parameter für die Methodenentwicklung genutzt und optimiert werden könnten, besteht die Möglichkeit, dass eine Basislinientrennung aller in einer Probe enthaltenen Analyten nicht möglich ist. Vor diesem Hintergrund soll nachfolgend am Beispiel der Trennung verschiedener Pharmaka die Leistungsfähigkeit der Raman-Spektroskopie als Detektionstechnik in der Flüssigkeitschromatografie erläutert werden. Bei dem hier verwendeten Testgemisch handelt es sich um zwölf Zytostatika, von denen sechs je drei kritische Paare bilden und bei der massenspektrometrischen Detektion eine Basislinientrennung erfordern. Ifosfamid (7) und Cyclophosphamid (8) sind Strukturisomere und weisen einen gleichen Massenübergang auf. Doxorubicin (3) und Epirubicin (4) stellen ein weiteres kritisches Paar dar. Sie sind Epimere, welche sich lediglich durch die sterische Ausrichtung einer Hydroxygruppe unterscheiden. In diesem Fall sind beide zur Qualifizierung und Quantifizierung verwendeten Massenübergänge identisch. Eine Identifizierung ohne chromatografische Trennung ist somit nicht möglich. Der dritte Spezialfall umfasst die Analyten Docetaxel (11) und Paclitaxel (12). Bei einer Co-elution dieser Substanzen wurde häufig eine Ionensuppression beobachtet, so dass diese Analyten für eine sensitive Quantifizierung ebenfalls eine Basislinientrennung erfordern. Im Fall der Co-Elution der anderen im Testgemische enthaltenen Pharmaka können diese Substanzen mit Hilfe der Massenspektrometrie unterschieden werden. Ein UV-Beispielchromatogramm der zwölf Zytostatika ist in Abbildung 2-50 dargestellt. Dabei ist die Co-Elution von fünf Peaks zwischen 3,5 und 4,5 Minuten gut zu erkennen. Diese Peakgruppe beinhaltet unter anderem die Analy-

ten Ifosfamid (7) und Cyclophosphamid (8), welche weder mittels UV/VIS-Detektor, noch mit Hilfe der Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden können.

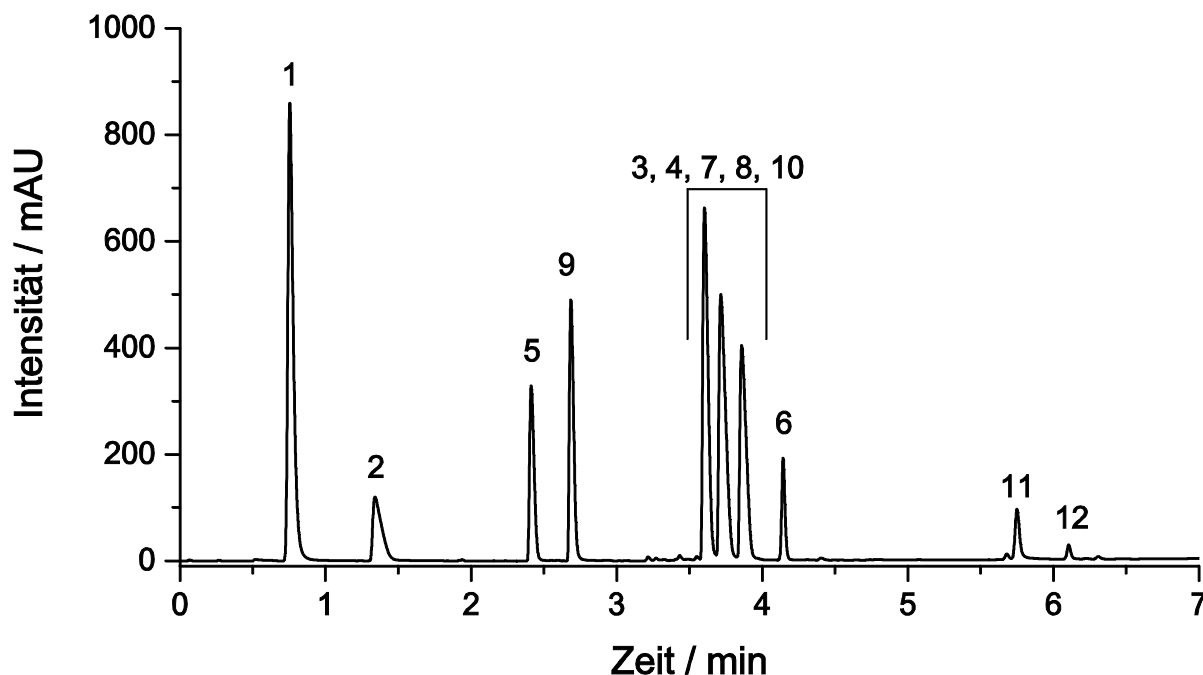


Abbildung 2-50: UV-Beispielchromatogramm für die Trennung von 12 Zytostatika. Chromatografische Bedingungen: stationäre Phase: Agilent Zorbax SB C-18 (50 × 2,1 mm, 1,8 µm); mobile Phase: A: LC-MS Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,35 mL min⁻¹; Lösungsmittelgradient: 1 % B auf 99 mit 9,8 % B min⁻¹; Temperatur: 30 °C; Injektionsvolumen: 2 µL. Analyten: 1) 5-Fluorouracil, 2) Gemcitabin, 3) Doxorubicin, 4) Epirubicin, 5) Methotrexat, 6) Etoposid, 7) Ifosphamid, 8) Cyclophosphamid, 9) Topotecan, 10) Irinotecan, 11) Docetaxel, 12) Paclitaxel.

Anhand dieses Beispiels soll gezeigt werden, dass die Raman-Spektroskopie in einigen Anwendungsfällen einen klaren Mehrwert zur reinen MS-Detektion darstellt. Ifosfamid und Cyclophosphamid weisen als Strukturisomere bei der massenspektrometrischen Detektion einen gleichen Massenübergang auf und können daher nur anhand unterschiedlicher Retentionszeiten der chromatografischen Trennung unterschieden werden. Im Falle einer Co-elution bietet sich als alternatives Detektionsverfahren die Raman-Spektroskopie an. Die Abbildung 2-51 zeigt die Raman-Spektren von Ifosfamid (schwarzer Kurvenverlauf) und Cyclophosphamid (roter Kurvenverlauf) im Vergleich.

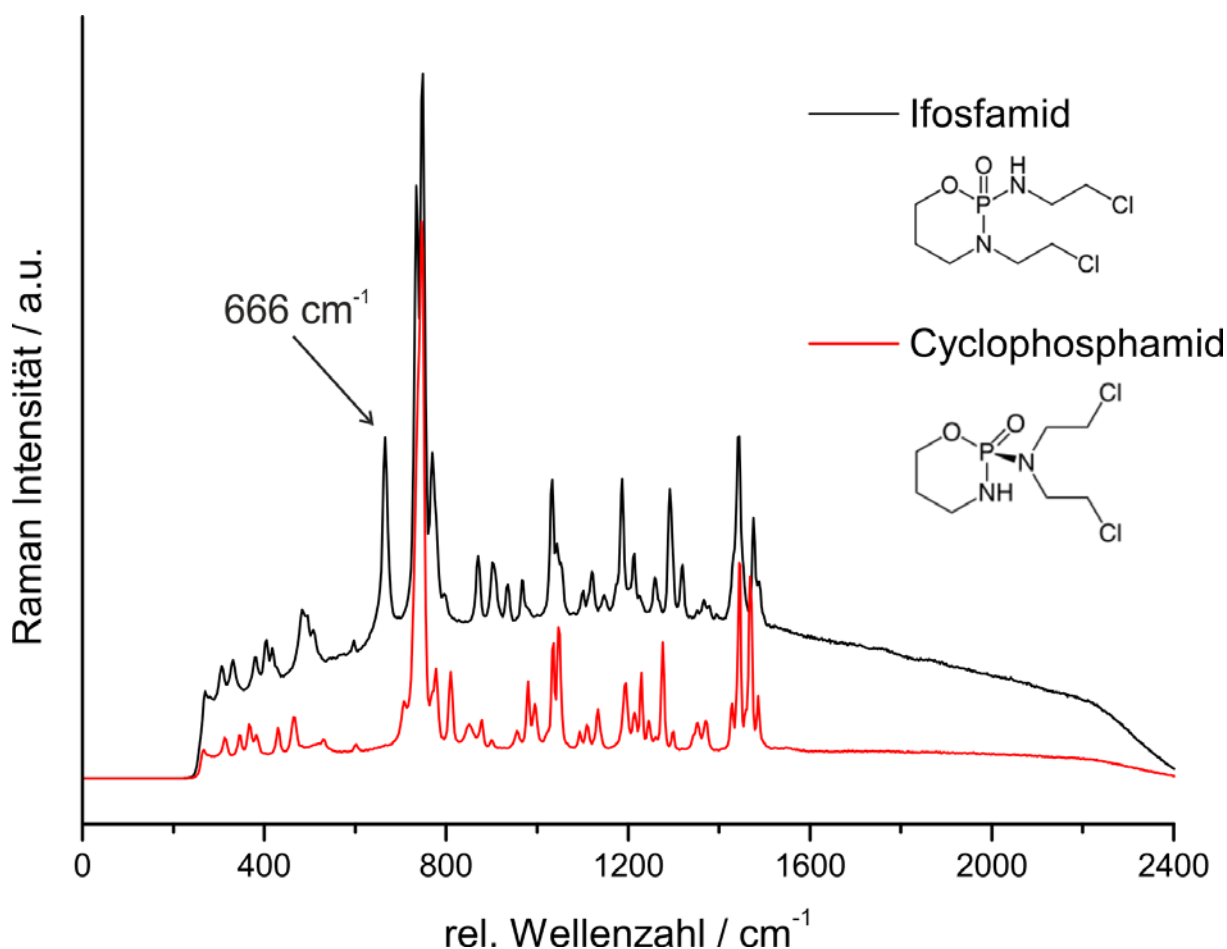


Abbildung 2-51: Raman-Spektren von Ifosfamid und Cyclophosphamid.

Die beiden Spektren zeigen auf den ersten Blick eine große Ähnlichkeit in Lage und Intensität der Raman-Übergänge. Bei genauerer Betrachtung stellt sich allerdings heraus, dass nur einige wenige Banden deckungsgleich vorliegen. Markant ist der stark ausgeprägte Raman-Übergang bei 666 cm^{-1} im Spektrum von Ifosfamid. Diese Bande kommt beim Cyclophosphamid nicht vor und eignet sich daher hervorragend als Schlüsselbande zur Unterscheidung der beiden Substanzen. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass die Raman-Spektroskopie eine ideale Ergänzung zur Massenspektrometrie darstellt.

Im Folgenden soll am Beispiel von Topotecan und Irinotecan gezeigt werden, welchen Vorteil die SERS-Spektroskopie gegenüber der klassischen Raman-Spektroskopie aufweist. Ein häufig in Erscheinung tretendes Problem der Raman-Spektroskopie sind konkurrierende Fluoreszenzprozesse, die durch die Laserstrahlung im Zielmolekül angeregt werden. Die oft um mehrere Größenordnungen intensivere Fluoreszenz überlagert die Raman-Streuung und macht eine Auswertung sehr schwierig. In vielen Fällen ist überhaupt keine Auswertung der Raman-Übergänge möglich. Die Abbildung 2-52 zeigt exemplarisch die Raman-Spektren der Zytostatika Topotecan (schwarzer Kurvenverlauf) und Irinotecan (roter Kurvenverlauf).

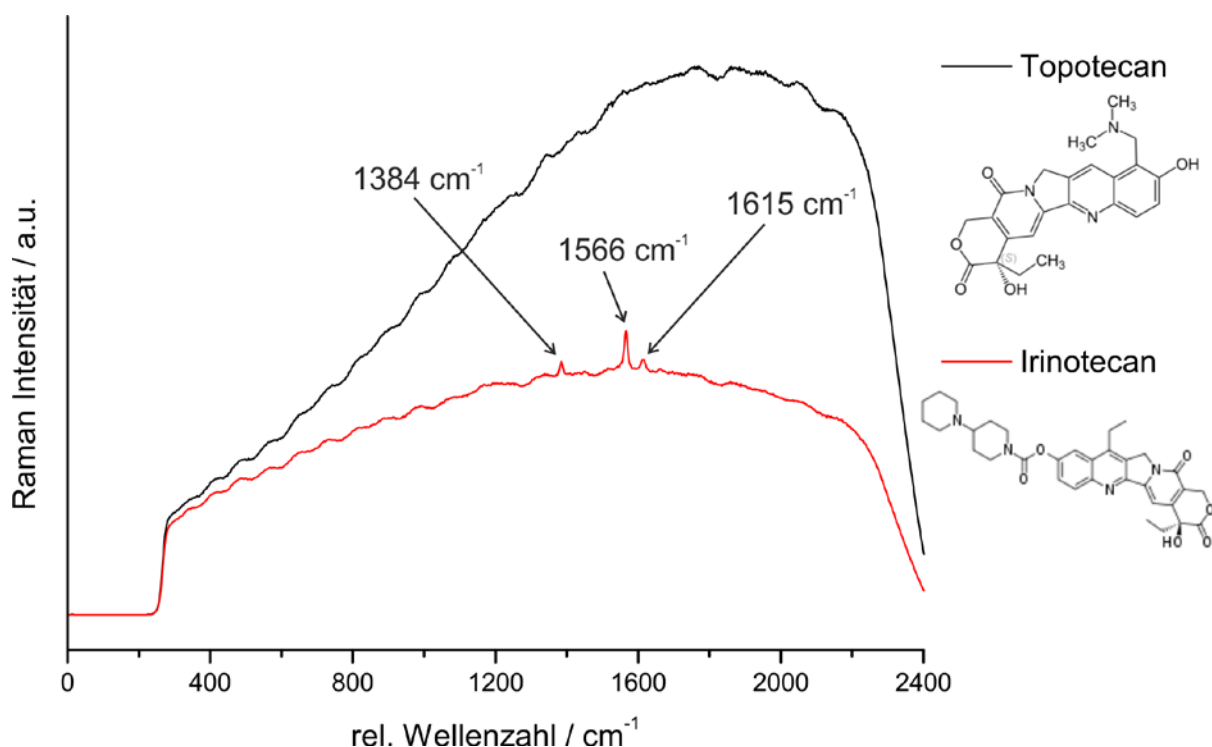


Abbildung 2-52: Raman-Spektren von Topotecan und Irinotecan.

Irinotecan zeigt eine verhältnismäßig schwache Fluoreszenz, die aber bereits ausreicht, um fast alle Raman-Signale der Substanz zu überlagern. Immerhin können drei Raman-Übergänge bei 1384 cm^{-1} , 1566 cm^{-1} und 1615 cm^{-1} erfasst werden. Dennoch wird die begrenzte Anzahl an Raman-Signalen eine eindeutige Identifizierung sowie eine Abgrenzung zu anderen Substanzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht erlauben. Topotecan hingegen zeigt eine sehr ausgeprägte Fluoreszenz, die sämtliche Raman-Übergänge überlagert. Eine Identifikation von Topotecan mittels klassischer Raman-Spektroskopie ist daher bei der eingesetzten Anregungswellenlänge von 532 nm nicht möglich.

Allerdings eignet sich für dieses Anwendungsbeispiel die SERS-Spektroskopie geradezu ideal. Neben der Verstärkung der Raman-Signale kommt ein weiterer Effekt zum Tragen, nämlich dass die Metall-Kolloide die native Eigenfluoreszenz der Zielmoleküle auslöschen (*Quenching*). Die entsprechenden SERS-Spektren von Topotecan und Irinotecan sind in der Abbildung 2-53 dargestellt.

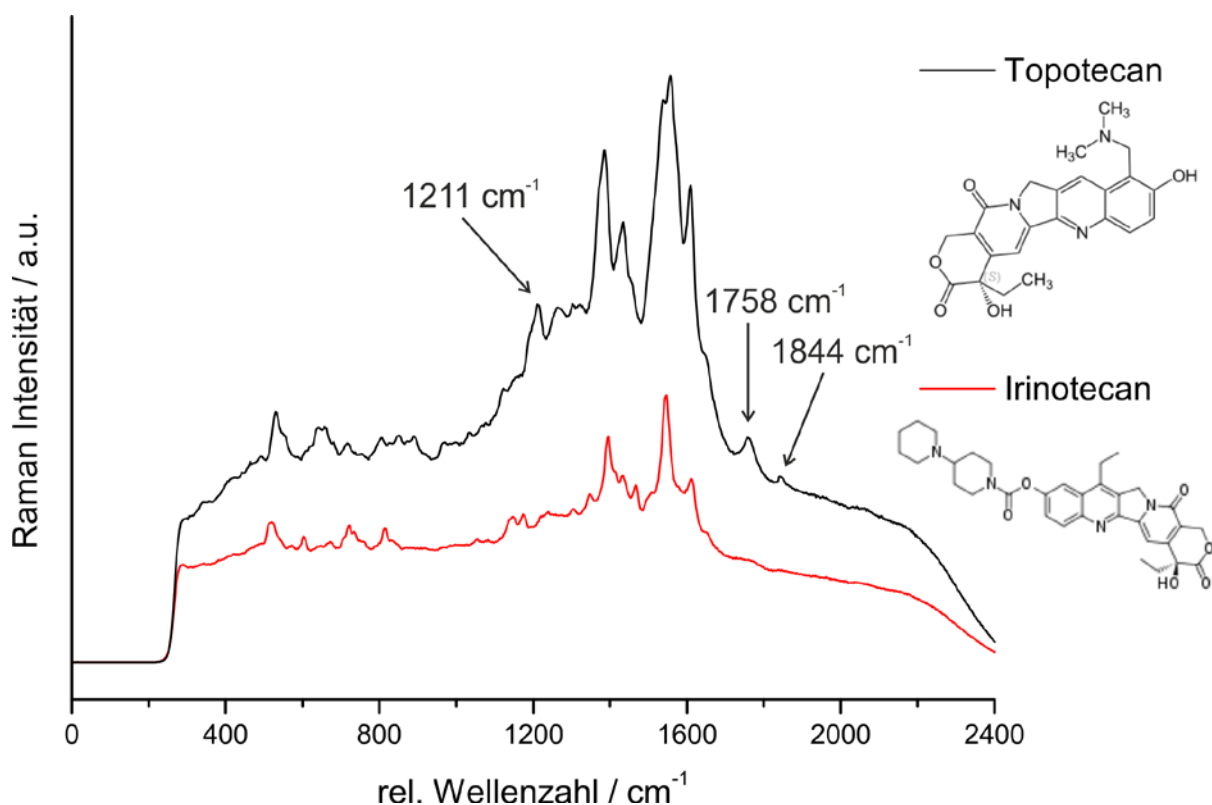


Abbildung 2-53: SERS-Spektren von Topotecan und Irinotecan.

Im Vergleich zu den normalen Raman-Spektren (siehe Abbildung 2-52) ist die Fluoreszenz jetzt vollständig unterdrückt und die SERS-Signale können problemlos erfasst werden. Der erhöhte Spektrenuntergrund resultiert aus diffusem Streulicht an den Metall-Kolloiden. Die beiden Spektren sehen zwar ähnlich aus, sind aber nicht deckungsgleich. Auffällig sind drei SERS-Übergänge des Topotecans bei 1211 cm^{-1} , 1758 cm^{-1} und 1844 cm^{-1} , die im Spektrum von Irinotecan fehlen. Unter Ausnutzung des SERS-Effektes können für beide Substanzen ausreichend viele Raman-Banden generiert werden, um eine eindeutige Identifizierung und Unterscheidung zu ermöglichen.

Anhand der genannten Beispiele konnte eindrucksvoll demonstriert werden, dass sowohl die klassische Raman-Spektroskopie als auch die SERS-Spektroskopie (ggf. auch in Kombination) zwei leistungsfähige Detektionsmethoden für die Flüssigkeitschromatografie darstellen. In Ergänzung zur konventionellen UV- und MS-Detektion leisten sie einen wichtigen Beitrag für eine eindeutige Identifizierung co-eluierender Zielsubstanzen.

3 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

3.1.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrages

Die Zielsetzungen des ursprünglichen Forschungsantrages beinhalteten drei globale Fragestellungen. Zum einen sollte im Zusammenhang mit der Probenvorbereitung evaluiert werden, ob die DPX-Technologie (Disposable Pipette Extraction) zur Anreicherung und Aufreinigung von Probengemischen eingesetzt werden kann, um die klassische Festphasenextraktionen zu unterstützen oder möglicherweise zu ersetzen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine Online Festphasenextraktion in bestehende LC-MS-Systeme integriert werden kann und welche Anreicherungsfaktoren erzielt werden können.

Die zweite Fragestellung steht im Zusammenhang mit der chromatografischen Methodentwicklung im Kontext der Raman-Spektroskopie. Hier sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob die aus dem pharmazeutischen Umfeld stammenden Proben unter den gegebenen Randbedingungen mit Hilfe der Umkehrphasen-Chromatografie eluiert werden können.

Die dritte Fragestellung betrifft die Entwicklung der Raman-Detektionseinheit und Anwendung der SERS-Technologie. Hier galt es zunächst zu evaluieren, ob unterschiedliche Metall-Kolloid-Lösungen unter der Vorgabe einer schmalen Partikelgrößenverteilung reproduzierbar und langzeitstabil hergestellt werden können. In diesem Kontext sollte auch untersucht werden, ob SERS mit organischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase kompatibel ist. Darüber hinaus wurde untersucht, welche geometrischen Abmessungen (Länge, Innen- und Außendurchmesser) für den Flüssigkern-Lichtwellenleiter geeignet sind und wie das Laserlicht möglichst verlustfrei eingekoppelt werden kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, mit welchen Flussraten die Kolloid-Lösungen durch das System gefördert werden können.

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

3.1.2 Alternative Anreicherungstechniken und Anwendung der Online Festphasenextraktion

Die DPX-Technologie kann im Rahmen von einfachen Aufreinigungsverfahren eingesetzt werden, jedoch ist die Aufgabe großer Probenvolumina nicht möglich, so dass die Anreicherung nicht in den Verfahrensschritt integriert werden konnte. Hingegen zeigte die Online SPE gute Ergebnisse hinsichtlich Aufreinigung und Anreicherung von ausgewählten Zielanalyten. Zudem konnte die Online SPE als modulares Bauteil der HPLC gut in bestehende LC-MS Systeme integriert werden. Versuche mit der Online SPE zeigten, dass vergleichbare Anreicherungsfaktoren wie mit der Offline SPE erreicht werden können. Zwar ist das Aufgabevolumen auf die Kartusche geringer als in der Offline Variante, dies wird aber durch die vollständige Übertragung der angereicherten Substanzen auf die analytische Säule kompensiert. Die Integration der Online SPE ermöglicht demzufolge die Aufreinigung als auch die Anreicherung von Zielanalyten. In Bezug auf die Nutzung der Raman-Spektroskopie als alternative oder komplementäre Detektionstechnologie zur UV- oder massenspektrometrischen Detektion kann durch den Einsatz der Online SPE sowohl die Komplexität der Trennung vermindert als auch die Nachweisstärke des Gesamtverfahrens verbessert werden. Die Online SPE gleicht somit Schwankungen in der substanzspezifischen Nachweisgrenze aus, unabhängig davon, welches Detektionsverfahren verwendet wird. Darüber hinaus entfallen fehleranfällige und zeitaufwendige Prozessschritte, wie sie bei der Offline SPE häufig vorkommen.

3.1.3 Chromatografische Methodenentwicklung

Der im Rahmen dieses Forschungsvorhabens untersuchte chromatografische Messmodus der Anwendung von simultanen Lösungsmittel- und Temperaturgradienten zeigt, dass diese Technologie im Rahmen der Kopplung von Flüssigkeitschromatografie und Raman-Spektroskopie sehr gut geeignet ist und angewendet werden kann.

Darüber hinaus hat der Anwender einen zusätzlichen chromatografischen Parameter, welcher im Rahmen der Methodenentwicklung und Optimierung zur Lösung schwieriger Trennprobleme genutzt werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass frei verfügbare Software-Tools zur Verfügung stehen, welche die Retention der Analyten in Abhängigkeit kombinierter Lösungsmittel- und Temperaturgradienten präzise vorhersagen können. Durch Anwendung dieses Tool können die Kosten für die chromatografische Methodenentwicklung und Validierung signifikant reduziert werden.

Um Lösungsmittelleffekte bei der Raman-Detektion zu minimieren, sollte nach der Trennsäule ein inverser Lösungsmittelgradient angewendet werden, um in der Detektionszelle eine isokratische Zusammensetzung der mobilen Phase zu erzielen. Solche Systeme sind bereits seit

mehreren Jahren kommerziell verfügbar. Generell ist die Verwendung organischer Lösungsmittel für die flüssigkeitschromatografische Trennung auch in Verbindung mit der Raman-Detektion möglich. Einzelne Banden, die auf das organische Lösungsmittel zurückzuführen sind, können bei der Auswertung der Raman-Spektren deshalb ausgeschlossen werden. Dies bedeutet, dass nicht notwendigerweise auf die Temperaturgradientenelution als einzigen Elutionsmodus zurückgegriffen werden muss. Insofern resultiert eine deutliche höhere Kompatibilität zu den in der Umkehrphasen-Chromatografie normalerweise angewendeten Lösungsmittelgradienten-Methoden. Dies ist ein wichtiges Resultat, das vor Beginn der Projektarbeiten nicht in vollem Umfang abgeschätzt werden konnte.

3.1.4 Raman-Spektroskopie

In dem Forschungsvorhaben sollten hinsichtlich der Raman-Detektion drei grundlegende Ziele erreicht werden. Zunächst sollte die Nachweisgrenze unter Ausnutzung des SERS-Effektes im Vergleich zu den Ergebnissen des Vorläufervorhabens (IGF Forschungsvorhaben-Nr. 16120 N) um den Faktor 10^4 gesenkt werden. Die in dem Vorgängerprojekt erreichte Peakkonzentration lag bei $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Mit dem aktuellen SERS-Detektor konnte die Nachweisgrenze auf eine Peakkonzentration von 20 pg mL^{-1} reduziert werden. Dies entspricht einer Verbesserung des LOD um den Faktor 5×10^{-4} , so dass die Zielvorgabe erreicht wurde.

Einschränkend muss allerdings gesagt werden, dass der Verstärkungsgrad sehr stark von der Molekülstruktur des Zielanalyten abhängig ist. Während z. B. für Adenin oder Nilblau Peakkonzentrationen von 20 pg mL^{-1} erreicht werden, liegt der LOD für Thymin bei $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Somit gibt es Grenzfälle, bei denen die konventionelle Raman-Spektroskopie besser geeignet ist als die SERS-Spektroskopie, zumal auch viele Substanzen untersucht wurden, die überhaupt kein SERS-Spektrum gezeigt haben. Der im Projektantrag postulierte universelle Einsatz des SERS-Detektors ist daher nicht gegeben. Es ist deshalb anzustreben, die klassische Raman- und die SERS-Spektroskopie in Kombination einzusetzen.

Ein weiteres Projektziel bestand darin, den SERS-Detektor auf die Verwendung von binären mobilen Phasen aus Wasser/Methanol und Wasser/Acetonitril anzupassen, um die Lösungsmittelgradientenelution zur Trennung komplexer Substanzgemische zu ermöglichen. Im Rahmen der Projektarbeiten konnte gezeigt werden, dass organische Lösungsmittel, insbesondere Methanol und Acetonitril, als mobile Phase eingesetzt werden können, da sie den SERS-Effekt nicht beeinträchtigen. Es empfiehlt sich allerdings aufgrund der Spektren-Reproduzierbarkeit nach der Trennsäule einen inversen Lösungsmittelgradienten anzulegen, um das Mischungsverhältnis zwischen dem organischen Lösungsmittel und Wasser konstant zu halten.

Die dritte wichtige Fragestellung war, ob sich der SERS-Effekt mit der Technologie des Flüssigkern-Lichtwellenleiters kombinieren lässt und inwieweit eine Online-Kopplung mit verschiedenen anderen Detektoren möglich ist. Die Projektergebnisse zeigen, dass der Flüssigkern-Lichtwellenleiter und die SERS-Spektroskopie miteinander kombiniert werden können und durch diese Kombination bestmögliche Raman-Empfindlichkeiten erzielt wurden. Eine Online Kopplung ist zum aktuellen Standpunkt der Entwicklungen nur eingeschränkt möglich. Ein vielversprechender Ansatz wird in einem Konzept zur "quasi" Online-Kopplung gesehen, der allerdings aus zeitlichen Gründen nicht mehr im Rahmen der Projektarbeiten realisiert werden konnte. Bei diesem Konzept wird das Eluat zunächst in einer Probenschleife geparkt (Peak-Parking). Anschließend erfolgt die Durchmischung mit Metall-Kolloid und Elektrolyt in einer speziell zu entwickelnden Mischkammer mit kleinem Volumen. Nach entsprechender Reaktionszeit wird das SERS-aktive Gemisch dann durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter des Raman-Detektors gespült. Vorteil dieser Methode wäre auch, dass das Peak-Parking erst nach der Raman-Messzelle erfolgt und das Eluat dann rückgekoppelt über eine Schleife ein zweites Mal durch die Raman-Messzelle läuft. Auf diese Weise können dann auch klassische Raman-Spektroskopie und SERS-Spektroskopie miteinander kombiniert werden, indem beim ersten Durchlauf ein normales Raman-Spektrum generiert wird und anschließend im zweiten Durchlauf das entsprechende SERS-Spektrum aufgenommen werden kann.

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

3.2.1 Alternative Anreicherungstechniken und Anwendung der Online Festphasenextraktion

Unter wirtschaftlichem Gesichtspunkt sollte das Potential der DPX-Technologie bzw. der Online SPE zur Kosteneinsparung ermittelt werden. Eine weitere Forschungsfrage war die mögliche Verschachtelung von Prozessschritten zur Reduktion von Analysezeiten und Erhöhung des Probendurchsatzes. Auf dieser Untersuchungsgrundlage sollte beurteilt werden, inwieweit die Integration des Raman-Detektors eine kostengünstige Betriebsweise analytischer Laboratorien ermöglicht. Die erfolgreiche Integration der Online SPE zeigte, dass eine Kosteneinsparung durch die Automatisierung und die damit verbundene Reduzierung manueller Arbeitsschritte möglich ist. Je nach Applikation ist zudem eine mehrmalige Verwendung der Kartuschen möglich, was mit einer Reduktion der Materialkosten einhergeht. Probenvorbereitung und Chromatografie laufen über den Modus der multidimensionalen Festphasenextraktion des Symbiosis™ Pico auch verschachtelt ab. Insbesondere bei hohen Probenvolu-

mina oder langen Laufzeiten der chromatografischen Trennung reduziert dieser Schritt die Analysenzeiten und optimiert so den Probendurchsatz.

3.2.2 Chromatografische Methodenentwicklung

Unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten ermöglicht die Anwendung kombinierter Lösungsmittel- und Temperaturgradienten dem Anwender eine weitere Variationsmöglichkeit im Rahmen der Methodenentwicklung, welche durch die Detektion mittels Raman-Spektroskopie bereits eingeschränkt wurde. Weiterhin können durch diesen chromatografischen Messmodus, im Vergleich zu klassischen Lösungsmittelgradienten unter isothermen Bedingungen, die Anschaffungs- als auch Entsorgungskosten für teure und toxische organische Lösungsmittel deutlich reduziert werden. Dies ist insgesamt ein wichtiger Beitrag zur Ressourceneffizienz und stellt zusätzlich eine Erhöhung der Arbeitssicherheit beim Umgang mit Lösungsmitteln im Labor dar. In Bezug auf eine effiziente Methodenentwicklung konnte gezeigt werden, dass frei verfügbare Software-Tools zur Verfügung stehen, welche das Retentionsverhalten der hier betrachteten Modellanalyten in Abhängigkeit kombinierter Lösungsmittel- und Temperaturgradienten präzise vorhersagen können. Durch Anwendung dieses Tools können die Kosten für die chromatografische Methodenentwicklung und Validierung im Vergleich zu einer klassischen empirischen Methodenentwicklung weiter signifikant gesenkt werden.

3.2.3 Raman-Spektroskopie

Die in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass in speziellen Anwendungsfällen nur die Kombination aus Massenspektrometrie, Raman- und SERS-Spektroskopie eine eindeutige Identifizierung strukturell ähnlicher Komponenten erlaubt. Auch wenn eine „echte“ Online-Kopplung zwischen Raman-Detektor und Massenspektrometer nicht im Rahmen der Projektarbeiten realisiert werden konnte, so liefern die Projektergebnisse wichtige Erkenntnisse, die in die Entwicklung eines Konzeptes zur „quasi“ Online-Kopplung einfließen werden. Aufgrund des analytischen Mehrwerts, der durch die Raman- und SERS-Spektroskopie generiert wird, kann im Falle einer erfolgreichen HPLC-Raman-Kopplung auf kostengünstige Single-Quadrupol-Massenspektrometer zurückgegriffen werden. In bestimmten Anwendungsfeldern kann ggf. auf die Anschaffung teurer hochauflösender Massenspektrometer verzichtet werden. Für solche Geräte (z. B. Orbitrap oder Hybrid-Flugzeit-Massenspektrometer) liegen die Anschaffungskosten typischerweise zwischen 300.000 und 750.000 €. Dazu kommen jährliche Wartungs- und Betriebskosten von ca. 50.000 bis 100.000 € pro Jahr. Die Anschaffungskosten für eine Kopplung aus Single-

Quadrupol-Massenspektrometer und Raman- / SERS-Detektor könnten demgegenüber auf etwa 100.000 bis 200.000 € beziffert werden.

Für den Raman-Detektor alleine werden Anschaffungskosten von ca. 50.000 € bis 75.000 € veranschlagt. Ein besonderer Vorteil der SERS-Spektroskopie im Vergleich zur konventionellen Raman-Spektroskopie ist, dass aufgrund der enormen Verstärkung der elektromagnetischen Feldstärke nur geringe Laserleistungen benötigt werden. Während im IGF-Forschungsvorhaben 16120 N mit einer Laserleistung von 2 Watt gearbeitet wurde, konnte in diesem Projekt die Raman-Empfindlichkeit um den Faktor 50.000 bei einer 100-mal niedrigeren Laserleistung von nur 20 mW verbessert werden. Wenn also in einigen Anwendungsfeldern ausschließlich die SERS-Spektroskopie erforderlich ist, kann sich der Anschaffungspreis des Raman-Detektors aufgrund der preiswerteren Laserkomponente um bis zu 10.000 € reduzieren.

3.3 Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

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

3.3.1 Information der Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses

Die Mehrheit der im Projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Mitglieder sind den kleinen und mittelständischen Unternehmen zuzurechnen. Während der Projektlaufzeit wurden drei Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses durchgeführt. Die erste Sitzung wurde in Duisburg, die zweite Veranstaltung in Düsseldorf und die dritte Veranstaltung in Bonn durchgeführt. Weitere Angaben zur zeitlichen Abfolge der Ausschusssitzungen können der Tabelle 3-1 entnommen werden.

3.3.2 Gezielte Ansprache potenziell interessierter Unternehmen auch außerhalb des PA

Sowohl während der Projektlaufzeit als auch nach Abschluss des Projektes wurden wichtige Fachtagungen und Messen in Deutschland dazu genutzt, weitere potenziell interessierte Unternehmen über die Projekthalte und das Projektergebnis zu informieren. In diesem Zusammenhang ist die analytica hervorzuheben, die im Abstand von zwei Jahren in München stattfindet. Die beiden am Projekt beteiligten Partner haben an dieser Messe sowohl in 2012 als auch 2014 teilgenommen und in Einzelgesprächen mit kmU über eine kommerzielle Umsetzung der erzielten Ergebnisse gesprochen. Diese Maßnahme wurde ebenfalls über zahlreiche Beratungsgespräche innerhalb der Projektlaufzeit an den beteiligten Forschungseinrichtungen fortgeführt.

3.3.3 Wissenschaftliche Publikationen wie Dissertationen und Beiträge in Fachzeitschriften

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

3.3.4 Vorstellung der Ergebnisse durch Vorträge und Posterpräsentationen

Die Vorstellung der Ergebnisse während der Projektlaufzeit erfolgte hauptsächlich in Form von Vorträgen und Postern auf Fachtagungen, Messen, Seminaren sowie bei regionalen branchenspezifischen Veranstaltungen. Informationen zur zeitlichen Abfolge dieser Transfermaßnahmen auch über die Projektlaufzeit hinaus können der in Tabelle 3-1 aufgeführten Auflistung entnommen werden.

3.3.5 Übernahme der Ergebnisse in die akademische Lehre oder berufliche Weiterbildung

Teilergebnisse des Projektes fließen direkt in die entsprechenden Lehrveranstaltungen an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf ein. Aufgrund der engen Anbindung der Forschungsstelle 1 an die Universität Duisburg-Essen und die Hochschule Niederrhein in Krefeld fließen Teilergebnisse des Projektes ebenfalls in die entsprechenden Lehrveranstaltungen zur analytischen Chemie ein.

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

3.3.6 Bau eines Demonstrators bzw. Funktionsmusters

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

3.3.7 Auflistung aller durchgeführten sowie über die Projektlaufzeit hinaus geplanten Transfermaßnahmen

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

Datum/Zeitraum	Bereits umgesetzte Maßnahmen	Erläuterung
17.04.-20.04.2012	Vortrag Analytica 2012, München Titel des Vortrags: "High-Temperature Liquid Chromatography – Advances, challenges and limitations"	Vorstellung der Projektidee im Rahmen der Analytica. Die Analytica repräsentiert die komplette Wertschöpfungskette für Labortechnik, Analytik und Qualitätskontrolle, Mess- und Prüftechnik sowie Biotechnologie, Life Sciences und Diagnostika.
18.06.-22.06.2012	Vortrag ACHEMA 2012, Frankfurt am Main Titel des Vortrags: „Development of a Raman Detector for hyphenation with high-temperature liquid chromatography and isotope ratio mass spectrometry"	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der ACHEMA. Die ACHEMA ist weltweit die einzige Gesamtschau aller Investitionsgüter für die Prozessindustrie.
05.11.-06.11.2012	Vortrag Novia HPLC-Tage 2012 Frankfurt am Main Titel des Vortrags: „Potentiale und Anwendungen der 2D-Chromatografie“.	Vorstellung der Projektidee im Rahmen der Novia HPLC-Tage 2012. Die Novia HPLC-Tage sind eine Austauschplattform zwischen Anwendern und Industrie aus dem Bereich der analytischen Trennverfahren. Es wird ein großer Schwerpunkt auf die Vermittlung von anwendungsorientiertem Wissen gelegt. Die Veranstaltung wird von einer Geräteausstellung begleitet.
08.11.2012	Posterbeiträge 20-jähriges Bestehen FAH, Bonn Titel der Posterbeiträge: „Separation of selected sulfonamides and trimethoprim by high-temperature liquid chromatography" "Entwicklung eines empfindlichen Raman-Detektors für die Hochleistungs-Flüssigchromatographie"	Vorstellung der Projektidee und der ersten erzielten Ergebnisse im Rahmen des 20-jährigen Bestehens der Forschungsvereinigung der Arzneimittelhersteller. Im Rahmen dieser wissenschaftlich orientierten Veranstaltung „Gemeinschaftliche und praxisbezogene Forschung zum Nutzen der Arzneimittel-Hersteller – Schwerpunkte aus 20 Jahren FAH-Arbeit“ wurde ein breiter Überblick über die in den letzten Jahren durchgeführten Arbeiten gegeben.
29.11.2012	Erster Projektbegleitender Ausschuss, Duisburg	Vorstellung des Projektes und Diskussion der geplanten Arbeiten.
04.03.-07.03.2013	Vortrag ANAKON 2013, Essen Titel des Vortrags: „Entwicklung eines empfindlichen Raman-Detektors für die Flüssigchromatografie"	Vorstellung von Teilergebnissen im Rahmen der Anakon. Die Anakon ist die deutschsprachige Analytik-Tagung, die u. a. dem Gebiet der analytischen Trenntechniken großen Platz einräumt und die Gelegenheit gibt, Forschungsergebnisse zu präsentieren. Darüber hinaus dient die Tagung dem Dialog von Hochschullehrern und Fachkollegen aus der Industrie.
Mai 2013	Veröffentlichung in GIT separation 1/2013, S.	Neben einer europäischen Auflage von 20.000

	8-12 Titel des Beitrags: „Do we really need chromatography? The role of chromatography and different detection techniques in the context of mass spectrometry“.	Printexemplaren, wird das E-Paper auf dem Portal des GIT Laboratory Journal (4.000 Visits pro Monat), auf separationsNOW.com (25.000 Visits pro Monat), im GIT Newsletter (11.500 Empfänger) und den HPLC- und IC-Newslettern von separationsNOW.com (15.000 Empfänger) verbreitet. Darüber hinaus erhalten die 4.000 Mitglieder der CASSS (California Separation Science Society) das E-Paper.
10.10.2013	Zweiter Projektbegleitender Ausschuss, Düsseldorf	Vorstellung der erzielten Ergebnisse und Diskussion der geplanten Arbeiten.
November 2013	Veröffentlichung in GIT Labor-Fachzeitschrift 11/2013, S. 690–695 Titel des Beitrags: „Brauchen wir die Chromatographie wirklich? Die Rolle der Chromatographie und anderer Nachweistechiken im Kontext der MS“	Die GIT Labor-Fachzeitschrift ist seit 50 Jahren Marktführer in Deutschland und berichtet über alle wichtigen Themen rund um das Labor. Sie erreicht monatlich etwa 30.000 persönliche Empfänger in der industriellen Forschung, der Entwicklung und in der Wissenschaft.
07.05.2014	Dritter Projektbegleitender Ausschuss, Bonn	Vorstellung aller erzielter Ergebnisse und Abschlussdiskussion.
Datum/Zeitraum	Maßnahmen nach Projektende	Erläuterung
Kontinuierlich und nach Projektende	Veröffentlichung in Fachzeitschriften	LABO; Die Pharmazeutische Industrie; LC-GC in deutscher Sprache; Journal of Chromatography; Journal of Separation Science; Analytical Chemistry; Journal of Applied Spectroscopy.
Nach Projektende Ab 2014	Akademische Ausbildung	Wissensvermittlung und Einbeziehung der im Rahmen des Projektes erzielten Forschungsergebnisse in das bestehende Modul „Analytische Methoden in der Chemie“ des Bachelorstudienganges der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
Kontinuierlich	Studienarbeiten zur Problematik des Forschungsvorhabens	Kennen lernen und Vermitteln von wissenschaftlichen Erkenntnissen und Methoden, Heranführen von Studierenden an selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten.
Kontinuierlich	Beratung von kmU	Information von Unternehmen auch außerhalb des PA. Diese Maßnahme wird fortlaufend über die gesamte Projektlaufzeit durchgeführt.

4 Literatur

- [1] S. Almeda, L. Arce, M. Valcarcel, Curr Anal Chem 6 (2010) 126.
- [2] L.X. Yi, R. Fang, G.H. Chen, J Chromatogr Sci 51 (2013) 608.
- [3] Gerstel, Mülheim an der Ruhr, 2009.
- [4] Axel Semrau GmbH & Co. KG,
- [5] http://www.axel-semrau.de/mmsemrau/Produkte/AUT+SPE+Online+LC+Spark+Symbiosis/Spark_Kartuschen_%C3%9Cbersicht_2012.pdf, Axel Semrau GmbH & Co. KG, 2012.
- [6] Axel Semrau GmbH & Co. KG,
- [7] Axel Semrau GmbH & Co. KG,
- [8] Thermo Scientific, Inc., <http://www.thermoscientific.de/product/vanquish-uhplc-system.html>, Zugriff: 11.08.2014
- [9] S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete, J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 482.
- [10] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, J. Chromatogr. A 1228 (2012) 57.
- [11] F. Gritti, G. Guiochon, Lc Gc N Am 30 (2012) 586.
- [12] K.P. Henschel, A. Wenzel, M. Diedrich, A. Fliedner, Regul Toxicol Pharm 25 (1997) 220.
- [13] B. Strenn, M. Clara, O. Gans, N. Kreuzinger, Water Sci Technol 50 (2004) 269.
- [14] J. Robles-Molina, F.J. Lara-Ortega, B. Gilbert-Lopez, J.F. Garcia-Reyes, A. Molina-Diaz, J Chromatogr A 1350 (2014) 30.
- [15] M. Petrovic, B. Skrbic, J. Zivancev, L. Ferrando-Clement, D. Barcelo, Sci Total Environ 468 (2014) 415.
- [16] V. Kumar, A.C. Johnson, N. Nakada, N. Yamashita, H. Tanaka, J Hazard Mater 227 (2012) 49.
- [17] L.S. Shore, M. Shemesh, Pure Appl. Chem. 75 (2003) 1859.
- [18] A.C. Belfroid, A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schafer, G.B. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino, Sci. Total Environ. 225 (1999) 101.
- [19] S. Zuehlke, U. Duennbier, T. Heberer, 28 (2005) 52.
- [20] L. Tennhardt, Institut für Abfallwirtschaft und Altlasten, Technische Universität Dresden, Dresden, 2004
- [21] K.A. Kidd, P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, R.W. Flick, 104 (2007) 8897.
- [22] S. Kohno, D.S. Bermudez, Y. Katsu, T. Iguchi, L.J. Guillette, Aquat Toxicol 88 (2008) 95.
- [23] H. Xu, J. Yang, Y.X. Wang, Q. Jiang, H. Chen, H.Y. Song, Aquat Toxicol 88 (2008) 1.
- [24] E. Commission, 2012.

- [25] G.W. Lien, C.Y. Chen, G.S. Wang, *J Chromatogr A* 1216 (2009) 956.
- [26] Y.H. Lin, C.Y. Chen, G.S. Wang, *Rapid Commun Mass Sp* 21 (2007) 1973.
- [27] D. Goulson, *J Appl Ecol* 50 (2013) 977.
- [28] J.P. van der Sluijs, N. Simon-Delso, D. Goulson, L. Maxim, J.M. Bonmatin, L.P. Belzunces, *Curr Opin Env Sust* 5 (2013) 293.
- [29] K. Starner, K.S. Goh, *B Environ Contam Tox* 88 (2012) 316.
- [30] K. Kummerer, A. al-Ahmad, V. Mersch-Sundermann, *Chemosphere* 40 (2000) 701.
- [31] A.A. Robinson, J.B. Belden, M.J. Lydy, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 423.
- [32] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6898.
- [33] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2227.
- [34] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, *J. Chromatogr. A* 1222 (2012) 71.
- [35] E.J. Blackie, E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 14466.
- [36] E.C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, P.G. Etchegoin, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 13794.
- [37] M.K. Hossain, Y. Ozaki, *Curr. Sci. India* 97 (2009) 192.
- [38] R.J. Hunter, Academic Press (1987).
- [39] T. Baczek, R. Kaliszan, H.A. Claessens, M.A. van Straten, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 304.
- [40] I. Molnar, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 175.
- [41] A.H. Schmidt, I. Molnar, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 51.
- [42] T.H. Hoang, D. Cuerrier, S. McClintock, M. Di Maso, *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 281.
- [43] A. Makarov, Z. Chen, F. Chan, R. Bhashyam, R. LoBrutto, R. Vegesna, *Am. Lab.* 42 (2010) 26.
- [44] M. Zhao, Y. Ma, L.L. Dai, D.L. Zhang, J.H. Li, W.X. Yuan, Y.L. Li, H.J. Zhou, *Food Anal. Methods* 6 (2013) 69.
- [45] L.R. Snyder, J.W. Dolan, *High-Performance Gradient Elution - The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2007.
- [46] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, Wiley, New York, 1997.
- [47] S.V. Galushko, *J. Chromatogr.* 552 (1991) 91.
- [48] S.V. Galushko, A.A. Kamenchuk, G.L. Pit, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 47.
- [49] E.F. Hewitt, P. Lukulay, S. Galushko, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 79.
- [50] K. Skalicka-Wozniak, W. Markowski, R. Swieboda, K. Glowinski, *Acta Chromatogr.* 21 (2009) 531.
- [51] J. Flieger, W. Markowski, *Chem Anal-Warsaw* 54 (2009) 187.

- [52] M.S. Shou, W.A. Galinada, Y.C. Wei, Q.L. Tang, R.J. Markovich, A.M. Rustum, J. Pharmaceut. Biomed. 50 (2009) 356.
- [53] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, K. Papachristos, C. Zisi, Anal. Chem. 80 (2008) 5508.
- [54] A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, C. Zisi, K. Papachristos, J. Sep. Sci. 31 (2008) 2953.
- [55] A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, K. Papachristos, P. Balkatzopoulou, Anal. Chem. 81 (2009) 1217.
- [56] P. Nikitas, A. Pappa-Louisi, A. Papageorgiou, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 178.
- [57] A. Pappa-Louisi, P. Nikitas, P. Balkatzopoulou, C. Malliakas, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 29.
- [58] J. Garcia-Lavandeira, C. Salgado-Petinal, E. Blanco, R. Cela, Anal Bioanal Chem 397 (2010) 751.
- [59] R. Cela, E.Y. Ordonez, J.B. Quintana, R. Rodil, J Chromatogr A 1287 (2013) 2.
- [60] J. Garcia-Lavandeira, B. Losada, J.A. Martinez-Pontevedra, M. Lores, R. Cela, J Chromatogr A 1208 (2008) 116.
- [61] R. Cela, J.A. Martinez, Quim Anal 18 (1999) 29.
- [62] P.J. Schoenmakers, Optimisation of Chromatographic Selectivity - A Guide to Method Development, Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [63] A.M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, J Chromatogr A 892 (2000) 75.
- [64] J. Garcia-Lavandeira, P. Oliveri, J.A. Martinez-Pontevedra, M.H. Bollain, M. Forina, R. Cela, Anal Bioanal Chem 399 (2011) 1951.
- [65] T. Teutenberg, S. Wiese, P. Wagner, J. Gmehling, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8470.
- [66] C. Schneider, Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, 2011
- [67] P. Wagener, S. Barcikowski, N. Bärsch, I (2011).
- [68] N. Leopold, B. Lendl, 107 (2003) 5723.
- [69] P.C. Lee, D. Meisel, 86 (1982) 3391.
- [70] X. Zou, S. Dong, 110 (2006) 21545.
- [71] C. Rumancev, Masterarbeit, Masterarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2014
- [72] T. Erk, Masterarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, wird in 2014 eingereicht
- [73] B. Fischer, Dissertation, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, wird in 2014 eingereicht
- [74] A. Becker, Masterarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2013
- [75] M. Theling, Masterarbeit, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2013

- [76] J.A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrec, (1978).
- [77] M. Lisa, F. Lynen, M. Holcapek, P. Sandra, J Chromatogr A 1176 (2007) 135.

5 Anhang

5.1 Übersicht der ausgewählten Substanzen

Tabelle 5-1: Übersicht der ausgewählten Substanzen.

Bezeichnung	CAS-Nr.	Lieferant	Reinheit
17-β-Estradiol	50-28-2	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
1-Methyl-1H-Benzotriazol	13351-73-0	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazol *H ₂ O	4184-79-6	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Allopurinol	315-30-0	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Amidotrizoesäure	117-96-4	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Amoxicillin	26787-78-0	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Atenolol	29122-68-7	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Azithromycin	83905-01-5	Sigma Aldrich	≥ 95,0%
Benzotriazol	95-14-7	Fluka	≥ 98,0%
Bezafibrat	41859-67-0	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Bisoprolol-Hemifumarat	66722-44-9	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Carbamazepin	298-46-4	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Ceftazidim-*2HCl	73547-70-3	Santa Cruz Inc.	≥ 99,0%
Citalopram-*HCl	59729-33-8	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Clarithromycin	81103-11-9	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Clindamycin-*HCl	21462-39-5	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Cyclophosphamid-*H ₂ O	50-18-0	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Diclofenac-Natrium	15307-86-5	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Docetaxel	114977-28-5	Fluka	≥ 97,0%
Erythromycin	114-07-8	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Etoposid	33419-42-0	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Fenofibrat	49562-28-9	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Gemcitabin-*HCl	95058-81-4	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Ifosfamid	3778-73-2	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Iomeprol	78649-41-9	Santa Cruz Inc.	≥ 99,0%
Melperon	3575-80-2	TRC Chemicals	≥ 99,0%
Methotrexat-*H ₂ O	59-05-2	Fluka	≥ 99,0%
Metoprolol-Tartrat	37350-58-6	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Metronidazol	443-48-1	Fluka	≥ 99,0%
N ⁴ -Acetylsulfamethoxazol	21312-10-7	Santa Cruz Inc.	≥ 99,0%
N-Acetylsulfadiazin	127-74-2	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
N-Acetylsulfamerazin	127-73-1	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
N-Acetylsulfamethazin	100-90-3	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Norfloxacin	70458-96-7	Fluka	≥ 98,0%
Ofloxacin	82419-36-1	Fluka	≥ 98,0%
Olanzapin	132539-06-1	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Paclitaxel	33069-62-4	Sigma Aldrich	≥ 95,0%
Paracetamol	103-90-2	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Phenazon	60-80-0	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Prednisolon	50-24-8	Sigma Aldrich	≥ 98,0%
Propyphenazon	479-92-5	TCI Deutschland	≥ 98,0%
Ritalinsäure	19395-41-6	BOC Inc.	≥ 99,0%
Simvastatin	79902-63-9	Sigma Aldrich	≥ 97,0%
Sotalol	3930-20-9	IS Chemicals	≥ 99,0%
Sulfadiazin	22199-08-2	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Sulfamerazin	127-79-7	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Sulfamethazin	57-68-1	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Sulfamethoxazol	723-46-6	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Sulfapyridin	144-83-2	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Sulfathiazol	72-14-0	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Tamoxifen	10540-29-1	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Terbutryn	886-50-0	Supelco	≥ 99,0%
Tramadol-Hydrochlorid	36282-47-0	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Trimethoprim	738-70-5	Fluka	≥ 98,0%
Trimethoprim	738-70-5	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Uracil	66-22-8	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Vancomycin-Hydrochlorid-*H ₂ O	1404-90-6	Sigma Aldrich	≥ 99,0%
Venlafaxin	93413-69-5	Santa Cruz Inc.	≥ 99,0%

5.2 Messparameter der Multimethode in Anwendungsbeispiel 1 (Kapitel 2.2.4)

Tabelle 5-2: Liste der untersuchten Arzneimittelwirkstoffe in Kläranlagenablauf mit den zugehörigen Massenübergängen zur Quantifizierung (Q1).

Analyt	Q1, m/z	Analyt	Q1, m/z
Benzotriazol	120 → 65	Diclofenac	296 → 214
5,6-Dimethyl-1H-Benzotriazol	148 → 77	Citalopram	325 → 109
Phenazon	189 → 56	Fenofibrat	361 → 233
Propyphenazon	231 → 56	Bezafibrat	362 → 139
Sulfapyridin	250 → 92	Azithromycin	375 → 83
Melperon	263 → 123	Methotrexat	455 → 175
Atenolol	267 → 147	Amidotrizoesäure	615 → 361
17β-Estradiol	273 → 107	Clarithromycin	748 → 158
N-Acetyl-Sulfamethoxazol	296 → 134	Paclitaxel	854 → 286
Norfloxacin	320 → 302	Allopurinol	137 → 110
Ciprofloxacin	334 → 315	Metronidazol	172 → 128
Ofloxacin	362 → 318	Ritalinsäure	221 → 84
Tamoxifen	372 → 72	Terbutryn	242 → 186
Clindamycin	425 → 126	Cyclophosphamid	263 → 142
Etoposid	589 → 229	Tramadol	265 → 58
Erythromycin	735 → 158	Sotalol	273 → 255
Docetaxel	808 → 226	Iomeprol	778 → 405
Trimethoprim	291 → 123	1-Methyl-Benzotriazol	134 → 77
Olanzapin	313 → 256	Paracetamol	152 → 110
Bisoprolol	326 → 116	Ibuprofen	206 → 161
Prednisolon	361 → 343	Carbamazepin	237 → 194
Amoxicillin	366 → 114	Ifosfamid	261 → 92
Simvastatin	419 → 199	Gemcitabin	264 → 112
Ceftazidim	547 → 167	Metoprolol	269 → 116
Vancomycin	725 → 100	Venlafaxin	279 → 58

Bei der bestehenden Offline SPE Methode wird eine HLB C-18 Kartusche (500 mg/6 mL) eingesetzt, die zunächst mit Methanol konditioniert und mit pH 3 Wasser equilibriert wird. Nach Probenaufgabe über einen PTFE-Schlauch und 5 min Trockensaugen erfolgt die Eluti-

on mit 3×3 mL Methanol. Das Eluat wird im Stickstoffstrom eingedampft und in 1 mL Wasser (95%)/ Acetonitril (5%) mit jeweils 0,1 % Ameisensäure gelöst. Die chromatografische Trennung erfolgt auf einer C-18 Säule, die MS Messung wird im Scheduled Multiple Reaction Monitoring (sMRM) Modus durchgeführt, nachdem die Substanzen mittels positiver Elektrospray Ionisierung (ESI) ionisiert wurden.

Bei der Online SPE wurde die verwendete HySphere C18 Kartusche zunächst mit Acetonitril konditioniert und mit Wasser equilibriert. Die Probe wurde aus einem Volumen von 1 mL mit einem Fluss von $200 \mu\text{L min}^{-1}$ auf die Kartusche gegeben. Die Elution erfolgte im Gradientenfluss (entsprechend Schema b in Abbildung 2-8) bei einer Flussrate von $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ mit den Lösemitteln Wasser + 0,1% Ameisensäure und Acetonitril + 0,1% Ameisensäure.

5.3 Zusätzliche Daten zu den Retentionszeitvorhersagen

Tabelle 5-3: Vergleich der relativen Fehler in % der vorhergesagten (vorh.) Retentionszeiten (RT) bestimmt durch die Programme mit den experimentell (exp.) bestimmten Retentionszeiten. Vorhersagen basierten auf den chromatografischen Läufen 40 °C und 5% B sowie 15% B.

Vorh. Lauf	Analyt	exp. RT/min	vorh. RT/min DryLab	Relativer Fehler in %	Vorh. RT/min ChromSword	Relativer Fehler in %	Vorh. RT/min NIKITAS	Relativer Fehler in %
40 °C 10% B	N-Acetylsulfamethazin	2,59	3,21	24,0	3,21	24,0	3,20	23,6
	Sulfa-methoxazol	4,27	4,61	8,1	4,61	8,1	4,60	7,9
	Trimethoprim	1,80	2,20	22,0	2,21	22,5	2,20	22,0
	Sulfamerazin	1,35	1,50	11,0	1,50	11,0	1,50	11,0
	N-Acetylsulfamerazin	1,82	2,16	18,8	2,16	18,8	2,20	21,0
	Sulfadiazin	0,94	1,02	8,3	1,02	8,3	1,00	6,2
	Sulfamethazin	1,94	2,22	14,4	2,23	14,9	2,20	13,4
	Sulfathiazol	1,14	1,26	10,1	1,26	10,1	1,30	13,6
	N-Acetylsulfadiazin	1,36	1,59	17,0	1,59	17,0	1,60	17,7
Relativer Fehler in % $\bar{X} \pm \sigma$				14,9 ± 5,9		15,0 ± 6,0		15,2 ± 6,3
40 °C 20% B	N-Acetylsulfamethazin	0,79	0,56	-28,7			0,45	-42,3
	Sulfa-methoxazol	1,40	1,20	-14,3			0,92	-34,1
	Trimethoprim	0,63	0,49	-22,2			0,40	-36,8
	Sulfamerazin	0,70	0,59	-15,4			0,46	-33,8
	N-Acetylsulfamerazin	0,53	2,16	307,5			0,43	-18,8
	Sulfadiazin	0,59	0,52	-12,0			0,41	-30,9
	Sulfamethazin	0,82	0,66	-19,2			0,52	-36,6
	Sulfathiazol	0,60	0,51	-15,0			0,41	-32,2
	N-Acetylsulfadiazin	0,62	0,52	-16,7			0,41	-33,7
Relativer Fehler in % $\bar{X} \pm \sigma$				17,9 ± 5,4				33,2 ± 6,3

Tabelle 5-4: Vergleich der relativen Fehler in % der vorhergesagten (vorh.) Retentionszeiten bestimmt durch die Programme mit den experimentell (exp.) bestimmten Retentionszeiten. Vorhersagen

basierten auf den chromatografischen Läufen 40 °C und 5% B sowie 15% B und 25% B bzw. 70 °C und 5% B sowie 15% B und 25% B.

Vorh. Lauf	Analyt	exp. RT/min	vorh. RT/min DryLab	Relativer Fehler in %	Vorh. RT/min ChromSword	Relativer Fehler in %	Vorh. RT/min NIKITAS	Relativer Fehler in %
40 °C 10% B	N-Acetylsulfamethazin	2,59	2,76	6,6	2,76	6,6	2,76	6,6
	Sulfamethoxazol	4,27	4,34	1,8	4,34	1,8	4,34	1,7
	Trimethoprim	1,80	1,94	7,5	1,93	7,0	1,93	7,2
	Sulfamerazin	1,35	1,40	3,6	1,40	3,6	1,40	3,7
	N-Acetylsulfamerazin	1,82	1,91	5,1	1,91	5,1	1,91	5,1
	Sulfadiazin	0,94	0,97	3,0	0,97	3,0	0,97	3,1
	Sulfamethazin	1,94	2,06	6,2	2,06	6,2	2,06	6,1
	Sulfathiazol	1,14	1,18	3,1	1,18	3,1	1,18	2,9
	N-Acetylsulfadiazin	1,36	1,44	6,0	1,45	6,7	1,45	6,4
Relativer Fehler in % $\bar{X} \pm \sigma$				4,8 ± 2,0		4,8 ± 1,9		4,8 ± 2,0
70 °C 10% B	N-Acetylsulfamethazin	1,75	1,83	4,8	1,83	4,8	1,80	3,0
	Sulfamethoxazol	2,12	2,15	1,6	2,15	1,6	2,13	0,6
	Trimethoprim	1,02	1,06	3,8	1,06	3,8	1,05	2,9
	Sulfamerazin	1,00	1,03	2,6	1,03	2,6	1,02	1,8
	N-Acetylsulfamerazin	1,24	1,27	2,7	1,27	2,7	1,25	1,3
	Sulfadiazin	0,72	0,73	1,7	0,73	1,7	0,73	1,2
	Sulfamethazin	1,45	1,51	3,9	1,51	3,9	1,49	2,8
	Sulfathiazol	0,76	0,78	2,6	0,78	2,6	0,77	1,4
	N-Acetylsulfadiazin	0,93	0,94	1,1	0,94	1,1	0,93	0,1
Relativer Fehler in % $\bar{X} \pm \sigma$				2,7 ± 1,2		2,8 ± 1,2		1,7 ± 1,0

5.4 Weiterführende Informationen zu den Raman- und SERS-Messungen

Tabelle 5-5: Ausgewählte Substanzen, die auf einen SERS-Effekt hin untersucht wurden.

Bezeichnung	CAS-Nr.	Lieferant	Reinheit	SERS-Effekt
Nilblau (SERS-Referenz)	2381-85-3	Merck	k. A.	ja
Koffein	58-08-2	ABCR	≥ 99,7%	ja
Theobromin	83-67-0	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Theophyllin	58-55-9	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Acenaphthylen	208-96-8	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Anthracen	120-12-7	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Benzo[a]pyren	50-32-8	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Benzo[b]fluoranthen	205-99-2	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Dibenzo[a,h]anthracen	53-70-3	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Indeno[1,2,3-cd]pyren	193-39-5	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Phenantren	85-01-8	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Pyren	129-00-0	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Amitriptylin	50-48-6	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Flavon	525-82-6	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Chrysin	480-40-0	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Prokainamid	51-06-9	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Propranolol	525-66-6	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Sulfamethoxazol	723-46-6	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Sulfamethizol	144-82-1	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Adenin	73-24-5	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Cytosin	71-30-7	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Thymin	65-71-4	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Uracil	66-22-8	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Papaverin	58-74-2	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	ja
Benzo[a]anthracen	56-55-3	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Fluoranthen	206-44-0	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Naphthalen	91-20-3	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Ancenaphthen	83-32-9	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Fluoren	86-73-7	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Benzo[k]fluoranthen	207-08-9	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Prednisolon	50-24-8	Sigma-Aldrich	≥ 98,0%	nein
17-β-Estradiol	50-28-2	Sigma-Aldrich	≥ 98,0%	nein

Erythromycin	114-07-8	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Cumarin	91-64-5	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Prednison	53-03-2	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Ketoprofen	22071-15-4	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein
Hydrocortison	50-23-7	Sigma-Aldrich	≥ 99,0%	nein

5.5 Technische Zeichnung der Lichtkoppeloptik

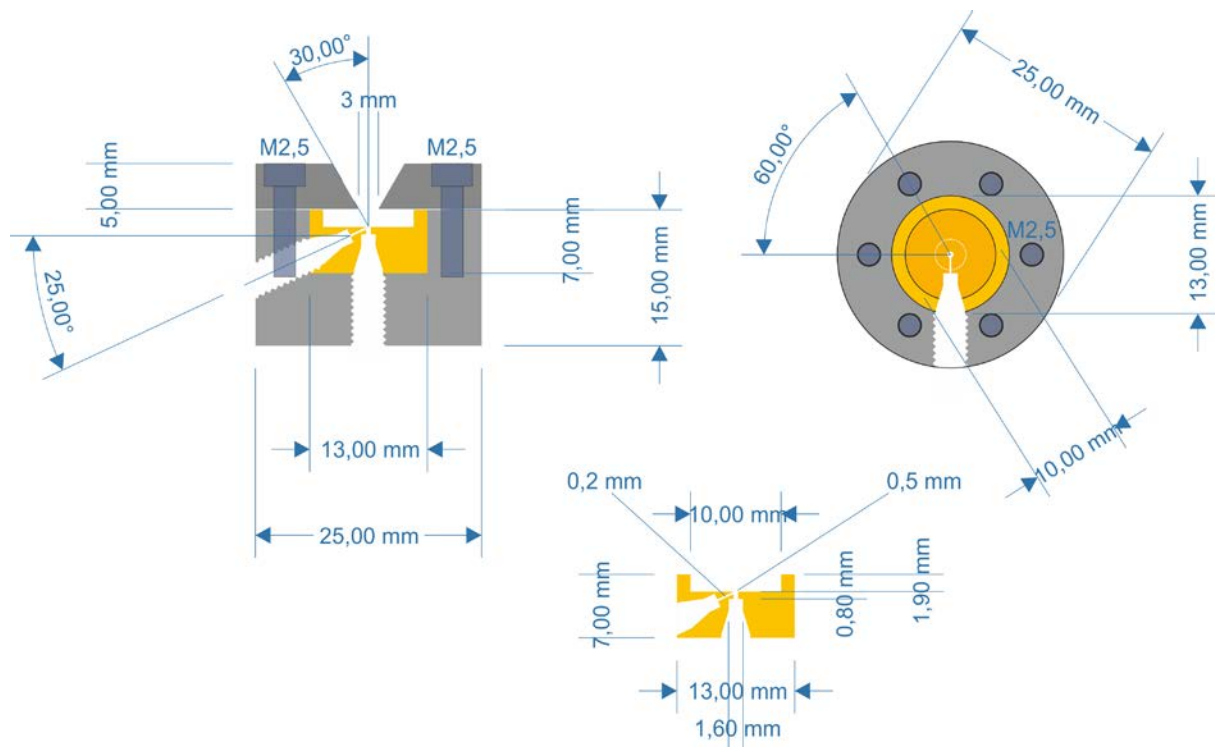


Abbildung 5-1: Technische Zeichnung der Lichtkoppeloptik.

5.6 Versuchsvorschriften zur Synthese von Silber-Kolloiden

Die Synthese der Silberkolloide erfolgte in einem Zweihalsrundkolben mit Rückflusskühler. Den schematischen Aufbau zeigt die Abbildung 5-2. Je nach Synthesevorschrift wird entweder die Silbernitrat- oder die Reduktionsmittellösung in dem Rundkolben vorgelegt. Die zweite Komponente wird mittels Spritze und Spritzenpumpe (Legato 100, KD Scientific Inc.) mit definierter Flussrate zugegeben. Dazu wurde ein Teflon-Stopfen mit angepasster Bohrung und PEEK-Kapillare verwendet. Die Einstellung der Temperatur erfolgt mittels Ölbad und Temperaturfühler.

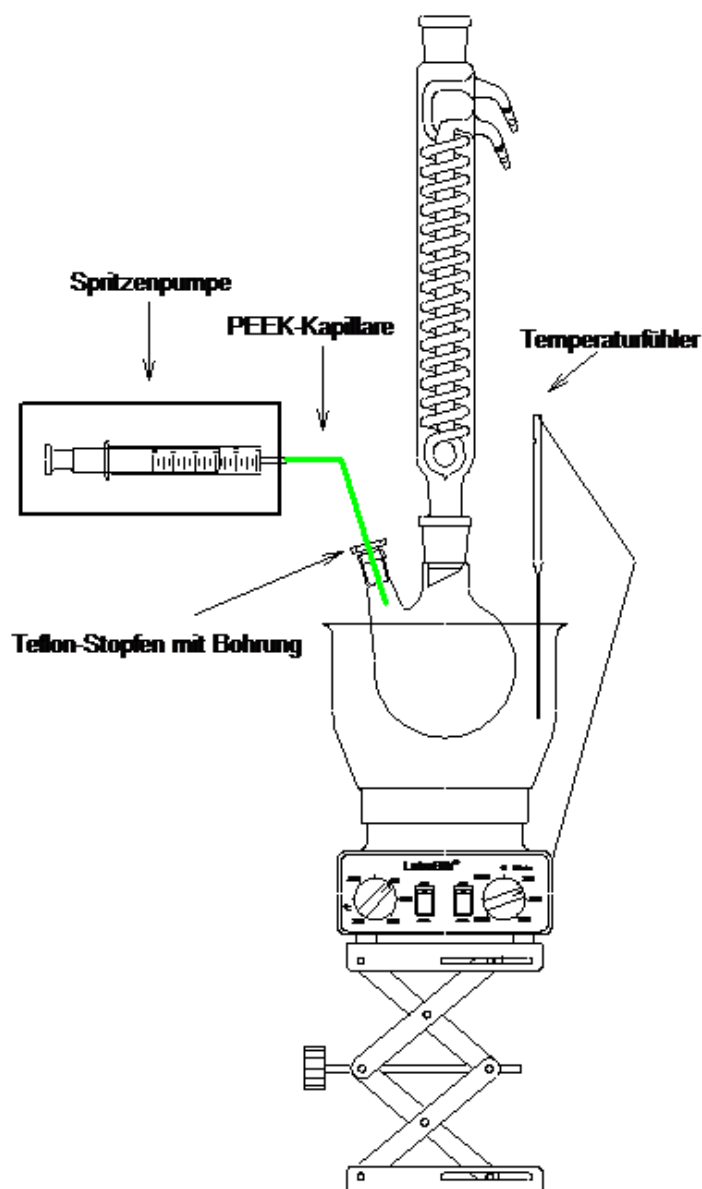


Abbildung 5-2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Synthese der Silber-Kolloide [72].

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Chemikalien zur Kolloid-Synthese aufgelistet:

Tabelle 5-6: Verwendete Chemikalien zur Silber-Kolloid-Synthese.

Bezeichnung	CAS-Nr.	Lieferant	Reinheit
Silbernitrat	7761-88-8	Sigma-Aldrich	≥ 99,8%
Natriumcitrat-Dihydrat	6132-04-3	AppliChem	≥ 99,0%
Hydroxylaminhydrochlorid	5470-11-1	AppliChem	≥ 99,5%
Natriumhydroxid	1310-73-2	VWR	Maßlösung (0,1 N)
Hydrazin-Monohydrat	7803-57-8	Sigma-Aldrich	≥ 98,0%
Natriumborhydrid	16940-66-2	AppliChem	≥ 96,0%
Methanol	67-56-1	VWR	≥ 99,8%
Acetonitril	75-05-8	Sigma-Aldrich	≥ 99,9%

5.6.1 Synthese nach Lee-Meisel

Zunächst werden 250 mL einer 2 mM Silbernitratlösung in einem 500 mL Zweihalsrundkolben mit Rückflusskühler vorgelegt und mittels Ölbad zum Kochen gebracht. Nach Erreichen der Siedetemperatur werden mittels Spritzenpumpe 5 mL einer 1 %-igen Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung mit einer Flussrate von 10 mL min⁻¹ zugegeben. Anschließend wird die Lösung noch eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Die erhaltenen Silber-Kolloide wurden intern als Probe LM-185 bezeichnet.

5.6.2 Synthese nach Leopold-Lendl

In einem 50 mL Zweihalsrundkolben mit Rückflusskühler werden 18 mL einer Lösung mit 1,67 mM Hydroxylamin-Hydrochlorid und 3,3 mM Natronlauge vorgelegt und auf eine Reaktionstemperatur von 60 °C unter Verwendung eines Ölbad erwärmt. Nach Erreichen der Zieltemperatur werden mittels Spritzenpumpe 2 mL einer 10 mM Silbernitratlösung mit einer Flussrate von 200 µL min⁻¹ zugegeben. Anschließend wird die Lösung noch 10 min bei 60 °C gerührt. Die erhaltenen Silber-Kolloide wurden intern als Probe LL-80 bezeichnet.

5.6.3 Synthese nach Zou-Dong

In einen 250 mL Zweihalsrundkolben mit Rückflusskühler werden 900 µL einer 40 mM Hydrazin-Lösung und 300 µL einer 40 mM Trinatriumcitrat-Dihydrat-Lösung in 60 mL Wasser vorgelegt. Eine zweite Lösung mit 300 µL Silbernitratlösung (60 mM) in 30 mL Wasser wird mittels Spritzenpumpe innerhalb von 30 min mit einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ hinzugegeben. Nach Ende der Zugabe wird die Reaktionslösung für 10 min weitergerührt. Die erhaltenen Silber-Kolloide wurden intern als Probe ZD-60 bezeichnet.

5.6.4 Silber-Kolloide nach Lee-Meisel mit anteilig organischem Lösungsmittel

Zunächst werden 125 mL einer 4 mM Silbernitratlösung in einen 250 mL Zweihalsrundkolben mit Rückflusskühler vorgelegt und in einem Ölbad zum Kochen gebracht. Nach Erreichen der Siedetemperatur werden mittels Spritzenpumpe 2,5 mL einer 2%-igen Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung mit einer Flussrate von 5 mL min^{-1} zugegeben. Danach wird die Lösung noch eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen der Lösung werden 127,5 mL Methanol bzw. Acetonitril zugegeben. Die erhaltenen Silber-Kolloide wurden intern als Probe LM-189 (50/50 MeOH/H₂O) und LM-191 (50/50 ACN/H₂O) bezeichnet.