

QUALITATIVE CHARAKTERISIERUNG POLYDISPERSER MACROGOLE SOWIE STRUKTURELL VERWANDTER HILFSSTOFFE MITTELS HPLC-CAD

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Christiane Theiss
aus
Hermannstadt (Rumänien)

Würzburg 2018

QUALITATIVE CHARAKTERISIERUNG POLYDISPERSER MACROGOLE SOWIE STRUKTURELL VERWANDTER HILFSSTOFFE MITTELS HPLC-CAD

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Christiane Theiss
aus
Hermannstadt (Rumänien)

Würzburg 2018

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie

und Pharmazie am: _____

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

“When you have eliminated the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.”

– Sir Arthur Conan Doyle, The Sign of Four –

– Meinen Eltern –

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum November 2014 bis Februar 2018

auf Anregung und unter der Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

am Lehrstuhl der Medizinischen Chemie

des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Ihr gilt mein besonderer Dank für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, das interessante Themengebiet sowie für ihre wertvollen Anregungen in allen Phasen der Promotion. Vielen Dank für das stets in mich gesetzte Vertrauen, welches mir die eigenverantwortliche Anfertigung dieser Dissertation ermöglichte.

Nicht unerwähnt sollen alle diejenigen bleiben, die mich während der gesamten Zeit stets unterstützt und die Promotion zu einem unvergesslichen Lebensabschnitt gemacht haben:

Das beste Büro-Team (01.012):

Adrian, Christine E., David, Jogi, Johannes, Klaus, Lu, Miri, Olli, Patrick S., Rasmus, Ruben und Sylvia.

sowie die anderen

Analytiker, die nicht an unserem Büro-Feeling teilnehmen durften:

Alex B., Jan, Jonas U., Jonas W., Markus, Nils, Nina und Raphael.

Natürlich nicht zu vergessen die Assistenten des 4. Semester:

Anja, Antonio, Christian, Eddi, Flo G., Flo S., Olli, Patrick N., Regina

und alle noch bisher unerwähnten

Kollegen, ehemalige Kollegen und Freunde des AK Holzgrabe, die für viele schöne Erinnerungen verantwortlich sind:

Alex H., Anna, Christine H., Daniela, Joshua, Ines, Michi, Niclas, Nicolas, Paul, Steffi.

Last but not least, danke ich meinen

Eitern,

sowie all denen, die zwar nicht direkt mit der Doktorarbeit zu tun hatten, auf deren Rückhalt und Unterstützung ich jedoch immer zählen konnte:

Alix, Chrissi, Claudi, Elena, Franzi, Lan, Kim, Nici, Nicole, Sandra, Tanja, Timo und Torsten.

!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	0
Inhaltsverzeichnis	i
Einleitung.....	1
1. Einleitung.....	2
1.1. Nichtionogene Emulgatoren.....	2
1.1.1. Macrogole	3
1.1.2. Fettalkohole und Fettsäuren.....	5
1.1.3. Macrogol-basierte, polymere Hilfsstoffe	9
1.2. Charakterisierung von Hilfsstoffgemischen nach Europäischem Arzneibuch (<i>Ph. Eur.</i>)	14
1.3. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	17
1.4. HPLC-Detektoren in der Qualitäts- und Reinheitsanalytik	19
1.4.1. UV/Vis-Detektoren.....	21
1.4.2. Massenspektrometrische Detektoren	23
1.4.3. Aerosol-basierte Detektion	24
Motivation und Ziel der Arbeit.....	29
2. Motivation und Ziel der Arbeit.....	30
Materialien und Methoden.....	33
3. Materialien und Methoden.....	34
3.1. Hilfsstoffe.....	34
3.2. Lösungsmittel und Chemikalien	37
3.3. Chromatographische Säulen	37
3.4. Geräte	38
3.5. Verbrauchsmaterialien	40
3.6. Übersicht der zur Methodenentwicklung und Validierung verwendeten Probenlösungen	41
3.7. Methoden	53
3.7.1. Methoden zur Trennung der hydrophilen Komponenten (PEGs) mittels HPLC-CAD.....	54
3.7.2. Methoden zur Trennung der lipophilen Komponenten (FAA und FA) mittels HPLC-CAD.....	58
3.7.3. Kombinierte Methoden zur Charakterisierung der Macrogol-basierten Derivate mittels HPLC-CAD.....	58
3.7.4. HPLC-MS-Methoden.....	61
Ergebnisse und Diskussion	67
4. Ergebnisse und Diskussion	68
4.1. Teil 1: Methodenentwicklung zur Trennung der hydrophilen Komponenten (PEGs).....	69
4.1.1. Methoden unter Verwendung der XTerra® RP ₁₈ -Säule und Methanol.....	71
4.1.2. Methoden unter Verwendung der XTerra® RP ₁₈ -Säule und Acetonitril.....	75
4.1.3. Methoden unter Verwendung der YMC-Pack Pro und Acetonitril	77
4.1.4. Optimierung der gefundenen Methode YMC_012	82
4.1.5. Verifizierung mittels LC/MS	86
4.2. Teil 2: Methodenentwicklung zur Trennung der lipophilen Komponenten (FA und FAA).....	91

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.	Teil 3: Methodenzusammenführung zur Trennung der Ether und Ester	96
4.3.1.	Ergebnisse: Fettalkoholether	100
4.3.2.	Ergebnisse: Fettsäureester.....	115
4.3.3.	Ergebnisse: Polysorbate	131
4.4.	Besondere Betrachtungen: Oxidativer Abbau ungesättigter Fettsäuren.....	136
Zusammenfassung		147
5.	Zusammenfassung	148
Summary		151
6.	Summary	152
Literaturverzeichnis		155
7.	Literaturverzeichnis	156
Anhang		171
8.	Anhang	172
8.1.	Publikationsverzeichnis	172
8.2.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	173
8.2.1.	Tabellenverzeichnis.....	173
8.2.2.	Abbildungsverzeichnis.....	175
8.3.	Abkürzungen.....	180
8.4.	Methodenübersicht.....	183
8.5.	Tabellen	204

1

Einleitung

1. Einleitung

Pharmazeutische Hilfsstoffe finden zwar nicht nur in der pharmazeutischen Industrie Anwendung, jedoch müssen sie in diesem Bereich die strengsten Kriterien erfüllen. So ist nicht nur im Bereich der API (*active pharmaceutical ingredient*) eine strenge Qualitätskontrolle (QC) erforderlich, sondern auch im Bereich der Hilfsstoffe um eine sichere und reproduzierbare Anwendung zu ermöglichen [1]. Eine bedeutende Gruppe der Hilfsstoffe sind die Emulgatoren, welche eine Vermischung von lipophilen (ölgigen) und hydrophilen (wässrigen) Phasen ermöglichen.

1.1. Nichtionogene Emulgatoren

Die Gruppe der Emulgatoren umfasst Stoffe, die aufgrund ihrer amphiphilen Struktur grenzflächenaktiv sind, wobei sich jeweils die lipophilen Enden der Ölphase und die hydrophilen Strukturteile der Wasserphase zuwenden. Sie finden sowohl in der pharmazeutischen Industrie, als auch der Kosmetik- und der Lebensmittelindustrie zahlreiche Anwendungen und lassen sich in vier Klassen einteilen.

Die ersten drei Gruppen, anionenaktive, kationenaktive und amphotere Emulgatoren, werden häufig auch unter dem Oberbegriff der ionogenen Emulgatoren zusammengefasst. Anionenaktive Emulgatoren weisen als hydrophile Komponente ein anionisches Strukturelement, meist eine deprotonierte Schwefel- oder Sulfonsäuregruppe, auf. Meist werden hierfür die Alkalisalze der Schwefelsäure (z. B. Natriumdodecylsulfat) eingesetzt. Analog dazu weisen kationenaktive Emulgatoren als hydrophile Komponente ein kationisches Strukturelement auf, bei dem es sich meist um Ammoniumverbindungen mit lipophiler Seitenkette handelt (z. B. Benzalkoniumchlorid, Cetylpyridiniumchlorid). Eine Zwischenform bildet die Klasse der amphoteren Emulgatoren, deren wichtigster pharmazeutischer Vertreter Lecithin ist. Diese können sich je nach pH-Wert der Zubereitung anionenaktiv oder kationenaktiv verhalten [2].

Den Gruppen der ionogenen Emulgatoren gegenüber steht die größte Klasse, die Gruppe der nichtionogenen Emulgatoren. Diese Gruppe lässt sich in zwei Untergruppen unterteilen. Auf der einen Seite zählen Fettsäuren und -alkohole zu den nichtionogenen Emulgatoren ohne Ethylenoxid. Hier übernimmt die Säure- bzw. Alkoholgruppe die Rolle des hydrophilen Endes, während das Kohlenstoffgrundgerüst den lipophilen Charakter repräsentiert. Oftmals werden hierbei jedoch nur HLB-Werte (*Hydrophilic Lipophilic Balance*) im Bereich $HLB \leq 10$ erreicht, wobei es sich nach Griffin [3] vorwiegend um W/O-Emulgatoren (HLB 6 – 8) handelt. Durch Modifikation mit Ethylenoxid lassen sich die HLB-Werte in den hydrophileren Bereich verschieben, sodass diese eher als O/W-Emulgatoren (HLB 8 – 18) einzustufen sind. Diese Gruppe der nichtionogenen Emulgatoren sind je nach Länge der Ethylenoxid-Seitenkette in der Lage, nahezu den gesamten HLB-Bereich (0 – 20) abzudecken. So finden sich neben den bereits erwähnten O/W- und W/O-

EINLEITUNG

Emulgatoren auch Netzmittel (HLB 7 – 9), waschaktive Substanzen (HLB 13 – 15) und Löslichkeitsvermittler (HLB 15 – 18) [2-5].

1.1.1. Macrogole

Das europäische Arzneibuch (*Pharmacopoea Europaea; Ph. Eur.*) definiert Macrogole oder auch Polyethylenglykole (PEGs; Carbowachse, usw.) als „Polymergemische mit der allgemeinen Formel $\text{H}[\text{OCH}_2\text{-CH}_2]_n\text{-OH}$, wobei n die mittlere Anzahl an Ethylenoxid-Einheiten wiedergibt. Der Typ des jeweiligen Macrogols wird durch eine Zahl definiert, die die mittlere relative molare Masse angibt“ [6].

So handelt es sich beispielsweise bei der Substanz PEG 1000 um ein Polymergemisch, dessen mittlere molare Masse 1000 g/mol beträgt. Unter Berücksichtigung der in **Abb. 1-1** dargestellten Grundstruktur und der jeweiligen molaren Massen der terminalen Gruppen ($M_r(\text{H}) = 1 \text{ g/mol}$ und $M_r(\text{OH}) = 17.015 \text{ g/mol}$) und der Wiederholeinheit ($M_r(1n) = 44.03 \text{ g/mol}$) ergibt sich nach Gleichung **Gl. 1**

$$n = \frac{1000 \frac{\text{g}}{\text{mol}} - 18.015 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{44.03 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 22.30$$

Gl. 1

eine mittlere Kettenlänge $n = 22.30$, d. h. das Maximum der Polymerverteilung wird sich im Bereich von $n = 22 - 23$ Ethylenglycol-Einheiten (EGE) bewegen, während, je nach Herstellungsverfahren, die Weite der Polymerverteilung variieren kann.

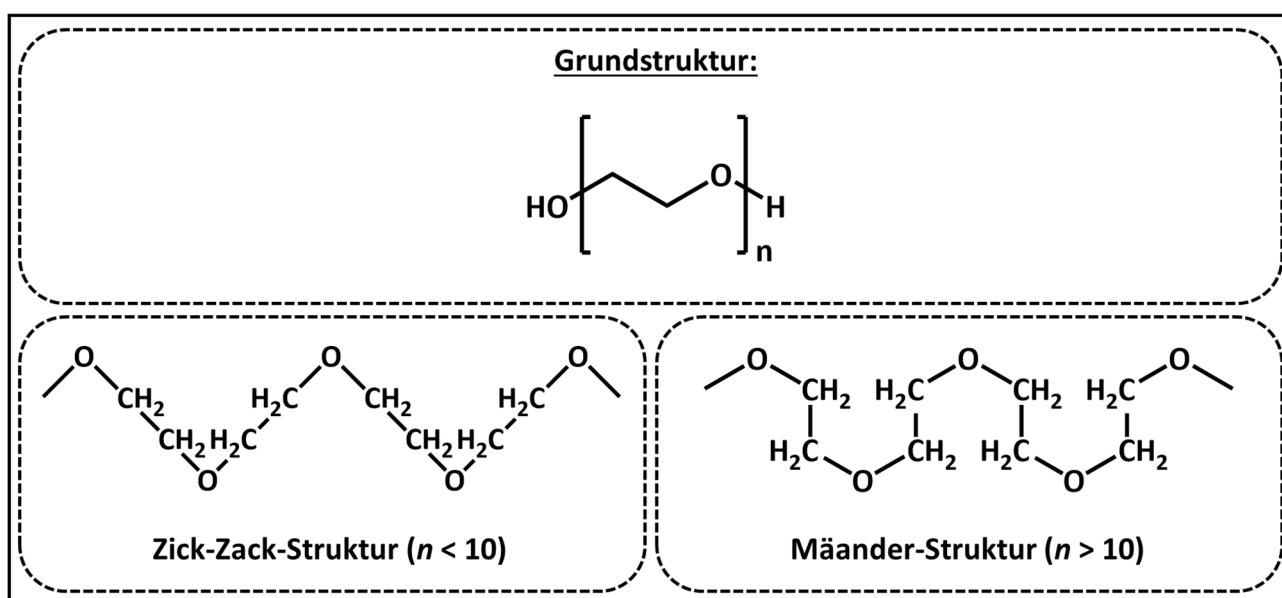


Abb. 1-1: Grundstruktur und sterische Ausrichtung der Macrogole [7].

EINLEITUNG

Abb. 1-1 zeigt die sterische Orientierung der PEG-Ketten. So liegen kürzere Ketten ($n < 10$) in der sogenannten Zick-Zack-Form vor, während längere ($n > 10$) in der Mäander-Form vorliegen [7].

Abhängig von ihrer Größe finden Macrogole zahlreiche Anwendungen. So werden niedermolekulare PEGs insbesondere als Weichmacher in Tablettenüberzügen in Konzentrationen von 5 – 30 % eingesetzt, was zu einer Erhöhung der Permeabilität des Filmüberzuges beiträgt und somit die Wirkstofffreisetzung steuert [8, 9]. PEG 300 und PEG 400 können in Konzentrationen bis zu 30 % (V/V) bedenkenlos als Wirkstoffträger in parenteralen Zubereitungen eingesetzt werden, ohne dass mit einem hämolytischen Effekt zu rechnen ist [7, 9].

In flüssigen Zubereitungen können gelöste Macrogole als Lösungsvermittler dienen oder die Viskosität und Konsistenz der Zubereitung steuern. In Kombination mit anderen Emulgatoren wirken Macrogole als Emulsionsstabilisatoren [9].

In halbfesten Zubereitungen werden sogenannte Macrogol-Salben (z. B. NRF: PEG 300 und PEG 1500 im Verhältnis 1:1) als Grundlage eingesetzt, wobei das Mengenverhältnis der Formulierung entsprechend dieser angepasst werden kann. Aufgrund der starken Hygroskopizität der Macrogole bis etwa PEG 2000 benötigen wasserhaltige Zubereitungen keine spezielle Konservierung, da ein Bakterienwachstum durch Entzug von Wasser aus der bakteriellen Zellwand unterbunden wird. Außerdem sind sowohl Macrogole als auch Macrogol-Lösungen autoklavierbar [7, 9].

Macrogole höherer Kettenlängen finden eher in festen Zubereitungen Anwendung. So werden PEGs ≤ 6000 als wasserlösliche Suppositoriengrundlage verwendet, wobei zumeist Mischungen aus zwei verschiedenen Macrogolen, wie z. B. 1:1-Mischungen von PEG 1000 und PEG 6000 in 10 – 15 % Wasser, verwendet werden, um Festigkeit und Auflösungsvermögen zu kontrollieren [7]. Vorteilhaft gegenüber fetthaltiger Suppositoriengrundlagen wie Kakaobutter oder Hartfett ist zum einen die Beständigkeit gegenüber höheren Temperaturen und damit die höhere thermische Stabilität. Des Weiteren ist die Wirkstofffreisetzung aus PEG-basierten Suppositorien unabhängig vom Schmelzpunkt, und damit von der Körperwärme. Die Wirkstofffreisetzung richtet sich nach dem Auflösungsvermögen der verwendeten Grundlage [7, 10].

In festen Formulierungen werden höhermolekulare PEGs beispielsweise als Bindemittel in der Tablettenherstellung eingesetzt und zur Vermittlung plastischer Verformbarkeit von Granulaten verwendet. In Nanopartikeln werden sie zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zugesetzt [9]. Im Größenbereich PEG 6000 bis PEG 20 000 finden sie sich insbesondere in der Zubereitung von Extrusionen und im Bereich 1 000 000 – 7 000 000 (USP/NF) zur Herstellung von Schmelzextrusionen wieder [11].

Neben dem weiten Einsatzspektrum als Hilfsstoffe werden PEGs selbst auch als Wirkstoff eingesetzt. So finden sie, beispielsweise PEG 3350 (Movicol®), als Laxantien Anwendung. Wurden sie früher meistens nur in hohen Dosen vor operativen Eingriffen des Gastrointestinaltraktes verabreicht [12, 13], haben sie heute

EINLEITUNG

einen hohen Stellenwert als Begleitmedikation bei längerem therapeutischem Einsatz von Opioiden [14] und bei chronischer Obstipation [15].

Im instrumentell-analytischen Bereich sind hochmolekulare PEGs wie beispielsweise PEG 20 000 in der Gaschromatographie (GC) als polare stationäre Phasen vertreten. Hier dienen sie unter anderem zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Lipiden [16, 17].

1.1.2. Fettalkohole und Fettsäuren

Die Gewinnung der Fettalkohole und -säuren erfolgt meist durch die Hydrolyse tierischer oder pflanzlicher Fette bzw. Öle [18-25]. Aufgrund der Gewinnung aus unterschiedlichen natürlichen Quellen können Zusammensetzung, und somit auch die jeweiligen physikalischen und chemischen Eigenschaften (siehe **Tab. 1-1**) der einzelnen Stoffe variieren. Das Europäische Arzneibuch definiert die für die Arzneimittelherstellung erforderlichen Zusammensetzungen der einzelnen Stoffe und gibt Referenzbereiche für verschiedene Güteklassen an. So ist Stearinsäure in drei unterschiedlichen Typen beschrieben [25]:

- **Typ 50 (= Typ I):** der Gehalt an Stearinsäure beträgt 40.0 – 60.0 % und die Summe aus Stearin- und Palmitinsäure beträgt mind. 90.0 %.
- **Typ 70:** der Gehalt an Stearinsäure beträgt 60.0 – 80.0 % und die Summe aus Stearin- und Palmitinsäure beträgt mind. 90.0 %.
- **Typ 95 (= Typ II):** der Gehalt an Stearinsäure beträgt mind. 90.0 % und die Summe aus Stearin- und Palmitinsäure beträgt mind. 96.0 %.

Zur Herstellung der Macrogol-Stearate werden normalerweise Typ 50 und Typ 95 verwendet [26], woraus sich auch innerhalb dieser definierten Gruppe strukturelle Unterschiede ergeben.

Neben der Herstellung von nichtionogenen Emulgatoren können auch die einzelnen Fettalkohole und -säuren als Emulgatoren, vorwiegend W/O-Emulgatoren, und auf anderen Gebieten eingesetzt werden [4]. So wird Stearinsäure nicht nur in Form von Magnesiumstearat, sondern auch in Reinform als Schmiermittel in der Kapsel- und Tablettenformulierung eingesetzt [27]. Des Weiteren findet sie Anwendung zur verbesserten Wirkstofffreisetzung aus magensaftresistenten Tabletten, welche durch Salzbildung in Duodenum und Dünndarm erzielt wird [28].

Aufgrund ihrer feuchtigkeitsbindenden und hauterweichenden Eigenschaften eignet sich Ölsäure gut als Penetrationsbeschleuniger für Wirkstoffe wie beispielsweise Aciclovir, Ketoprofen und Isosorbid [29]. Außerdem wird sie zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit lipophiler Arzneistoffe, wie z. B. Testosteron, aus Weichgelatine kapseln vorgeschlagen [30].

EINLEITUNG

Cetyl- und Stearylalkohol werden, neben der Stabilisierung halbfester Zubereitungen, auch zur Herstellung von *Solid-Lipid*-Nanopartikeln (SLNs) [31] und zur Entwicklung peroraler Retard-Arzneiformen eingesetzt. Die Mischung dieser beiden Fettalkohole wird als Cetylstearylalkohol bezeichnet und vorwiegend als Emulgator (W/O und O/W) sowie Bestandteil von Komplexemulgatoren wie „Emulgierender Cetylstearylalkohol“ eingesetzt [4].

Oleylalkohol wird, auch aufgrund seiner rückfettenden Eigenschaften, insbesondere bei öligen Dermatika eingesetzt [4]. Des Weiteren wird Oleylalkohol auch als Penetrationsbeschleuniger bei transdermalen Applikationen verwendet [32].

EINLEITUNG

Tab. 1-1: Übersicht der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Fettalkohole und -säuren. Besondere Bedingungen (Temperatur, Druck, ...) sind in Klammern angegeben.

IUPAC-Name	Trivialnamen	Summenformel	M _r [g/mol]	Schmelzpunkt [°C]	Siedepunkt [°C]	Dichte [g/cm ³]	Dampfdruck	Quellen
1-Dodecanol, Dodecan-1-ol	Laurylalkohol	C ₁₂ H ₂₆ O	186.339	24	259 (760 mmHg) 250 (101.3 kPa) 261	0.83	1.3 Pa (24 °C) 1.69 Pa (30 °C)	[33, 34]
1-Hexadecanol, Hexadecan-1-ol	Cetylalkohol, Palmitylalkohol	C ₁₆ H ₃₄ O	242.447	49.3 49	344 (760 mmHg) 344	0.84	6 x 10 ⁻⁶ mmHg (25 °C)	[35, 36]
1-Octadecanol, Octadecan-1-ol	Stearylalkohol, Cetanol, Lanette 18	C ₁₈ H ₃₈ O	270.501	59.5 59.8 59	336 210 (15 mmHg)	0.83	2.7 x 10 ⁻⁶ mmHg (25°C) 133 Pa (150°C)	[37, 38]
(Z)-Octadec-9-en-1-ol, cis-9-Octadecen-1-ol	Oleylalkohol	C ₁₈ H ₃₆ O	268.485	13 – 19 6.5 2 – 12	195 (8 mmHg) 305 – 370 (760 mmHg) 330 – 360 333	0.850 0.847 ± 0.06	9.3 x 10 ⁻⁵ mmHg (25 °C) 10.64 hPa (195 °C)	[4, 39, 40]
-	Cetylstearylalkohol, Lanette O	- ¹	-	48 – 53	-	0.82	-	[4]
Hexansäure, Pentacarbonsäure	Capronsäure, Ziegensäure	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.16	- 3.9	205.8 206	0.93	27 Pa (20 °C) 30 Pa (20 °C)	[41, 42]
Octansäure, Heptancarbonsäure	Caprylsäure	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.214	16.5 16	239 237	0.91	3.71 x 10 ⁻³ mmHg (25 °C) 0.25 Pa (298 K)	[43-45]
Decansäure, Nonancarbonsäure	Caprinsäure, veraltet: Kuhsäure, Bocksäure	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.268	31.9 31	268.7 268 – 270	0.893 0.89	3.66 x 10 ⁻⁴ mmHg (25°C) 0.054 Pa (298 K)	[45-47]
Dodecansäure	Laurinsäure	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.322	43.8 44 – 46 44	91.4	0.883 0.88	1.6 x 10 ⁻⁵ mmHg (25°C; extrapoliert) 2.3 x 10 ⁻³ Pa (298 K)	[45, 48, 49]

¹ Zusammensetzung: ≥ 40% Stearylalkohol und ≥ 90% Cetyl- und Stearylalkohol

EINLEITUNG

IUPAC-Name	Trivialnamen	Summenformel	M _r [g/mol]	Schmelzpunkt [°C]	Siedepunkt [°C]	Dichte [g/cm ³]	Dampfdruck	Quellen
Tetradecansäure	Myristinsäure	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.376	53.9 54 – 55	326.2 326	0.86 (bei 54 °C)	.4 x 10 ⁻⁶ mmHg (25°C) 7.0 x 10 ⁻⁵ Pa (298 K)	[45, 50, 51]
Hexadecansäure	Palmitinsäure, Cetylsäure	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.43	61.8 62.5 61 – 64	351.5 351 – 352 351	0.85	.8 x 10 ⁻⁷ mmHg (25 °C) 133 Pa (154 °C) 1.3 x 10 ⁻⁷ Pa (298 K)	[45, 52, 53]
Heptadecansäure	Margarinsäure, Daturinsäure	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.457	61.3 59 – 61	227 (133 Pa)	0.9 ± 0.1	6.23 x 10 ⁻⁸ mmHg (25 °C)	[54-56]
Octadecansäure	Stearinsäure	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.484	68.8 69.3 69 – 72 69	383 232 (15 mmHg) 370	0.94	4.2 x 10 ⁻⁸ mmHg (25 °C) 133 Pa (174 °C) 9.5 x 10 ⁻⁸ Pa (298 K)	[45, 57, 58]
∞ (9Z)-Octadec-9- ensäure, cis-9-Octadecen- säure	Ölsäure, Oleinsäure, 18:1(ω-9)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.468	13.4 16.3 17	360	0.895	5.46 x 10 ⁻⁷ mmHg (25 °C) 1.9 x 10 ⁻⁶ Pa (298 K)	[45, 59, 60]
(9Z,12Z)-Octadeca- 9,12-diensäure, (cis,cis)-Octadeca- 9,12-diensäure	Linolsäure, 18:2(ω-6)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.452	- 6.9 - 8.5 - 12	230 (16 mmHg) 230 (16 hPa)	0.9022 (20 °C) 0.902 (25 °C)	8.68 x 10 ⁻⁷ mmHg (25 °C)	[61, 62]

1.1.3. Macrogol-basierte, polymere Hilfsstoffe

1.1.3.1. Fettalkoholether (Alkoholethoxylate, Polyoxyethylenalkoholether)

Die Herstellung der Fettalkoholether erfolgt durch kontrollierte Kondensation der gewünschten Menge an Ethylenoxid (= Ethoxylierung) an den jeweiligen Fettalkohol [63-67]. Eine genaue Übersicht zu den einzelnen Fettalkoholethern findet sich in **Tab. 1-2**.

Generell sind Fettalkoholether bei kühler und trockener Lagerung stabil, neigen jedoch zu Autoxidation aufgrund enthaltener Doppelbindungen (z. B. Oleylalkohol), wobei diese an den in Allylstellung befindlichen C-Atomen erfolgt. Durch die entstehenden Peroxide kann der pH-Wert der Substanzen sinken, welcher wiederum die Zersetzung der enthaltenen Arzneistoffe oder andere Inkompatibilitäten, wie Reaktionen mit den entstehenden Peroxiden, zur Folge haben kann [5, 63].

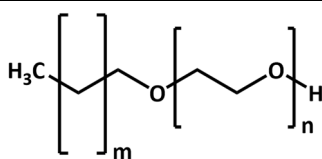
Fettalkoholether finden breite Anwendung als Emulgatoren und Emulsionsstabilisatoren, je nach Höhe des Ethoxylierungsgrades sowohl im W/O- ($n = 2 - 4$) als auch O/W-Bereich ($n = 10 - \geq 20$). So werden diese neben der Anwendung in topischen Arzneiformen, vor allem aber auch in der kosmetischen Industrie eingesetzt. Insbesondere die Macrogol-Cetylether finden ihr Einsatzgebiet hauptsächlich im kosmetischen Bereich. In den gängigsten Arzneibüchern, dem europäischen (*Ph. Eur.*), amerikanischen (*USP*) und japanischen (*JPE*), finden diese keine Erwähnung in Form einer eigenständigen Monographie [5].

Fettalkoholether mit einem HLB-Bereich von 6.5 – 8 ($n = 5 - 6$) werden als Netz- und Dispergiermittel eingesetzt [5, 63]. Fettalkoholether längerer Ketten ($n \geq 20$) werden zur Löslichkeitsverbesserung eingesetzt. Insbesondere für lipophile Komponenten wie ätherische Öle, lipophile Vitamine sowie lipophile Arzneistoffe wie beispielsweise Cortisonacetat [68], Chlordiazepoxid [69] und Cholesterol [70, 71], finden sie Verwendung [5]. In Suppositorien verbessern Fettalkoholether die Wirkstofffreisetzung [63, 72, 73] und in Filmüberzügen von Nanopartikeln sorgen sie für eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit [63, 74].

Polidocanol kann sowohl als Hilfsstoff (O/W-Emulgator) als auch als Wirkstoff (Lokalanästhetikum, Verödungsmittel) [75] verwendet werden, weshalb im *Ph. Eur.* zwei separate Monografien zu finden sind: „Lauromacrogol 400“ für die Anwendung als Wirkstoff und „Macrogol Laurylether“ als entsprechende Hilfsstoffmonographie.

EINLEITUNG

Tab. 1-2: Strukturelle Übersicht der betrachteten Fettalkoholether.



Macrogol-Laurylether	CAS: 9002-92-0	
<u>Definition nach Ph. Eur. 9.4 [64]:</u>		
"Gemisch von Ethern verschiedener Macrogole mit Fettalkoholen, hauptsächlich Laurylalkohol (C ₁₂ H ₂₆ O). Die Substanz enthält unterschiedliche Mengen an freiem C ₁₂ H ₂₆ O und kann freie Macrogole enthalten. Die Anzahl der Mole Ethylenoxid, die mit 1 Mol C ₁₂ H ₂₆ O reagiert haben, beträgt 3 bis 23 (Nominalwert)."		
Brij® 30 (syn.: Lipocol® L-4, Volpo® L4)	n =	4
	m =	10 (= Laurylalkohol; C12 FAA)
Thesit® (Polidocanol) (syn.: Laureth-9, Volpo® L9)	n =	9
	m =	10 (= Laurylalkohol; C12 FAA)
Macrogol-Cetylether	CAS: 9004-95-9	
<u>Definition [5]:</u>		
Macrogol-Cetylether werden weder in <i>Ph. Eur.</i> , <i>USP</i> noch <i>JPE</i> geführt. Formal handelt es sich, analog den anderen Alkylethern, um Gemische verschiedener Macrogole hauptsächlich mit Cetylalkohol.		
Brij® 52 (syn.: Lipocol® C-2, Ceteth-2)	n =	2
	m =	14 (= Cetylalkohol; C16 FAA)
Brij® C10 (syn.: Lipocol® C-10, Ceteth-10)	n =	10
	m =	14 (= Cetylalkohol; C16 FAA)
Macrogol-Stearylether	CAS: 9005-00-9	
<u>Definition nach Ph. Eur. 9.4 [65]:</u>		
"Gemisch von Ethern, die durch Ethoxylierung von Stearylalkohol gewonnen werden. Die Substanz kann freie Macrogole und wechselnde Mengen an freiem Stearylalkohol enthalten. Die Anzahl der Mole Ethylenoxid, die je Mol Stearylalkohol reagiert haben, beträgt 2 bis 20 (Nominalwert)."		
Brij® 52 (syn.: Lipocol® S-2, Steareth-2, Volpo® S2)	n =	2
	m =	16 (= Stearylalkohol; C18 FAA)
Brij® S20	n =	20
	m =	16 (= Stearylalkohol; C18 FAA)
Macrogol-Oleylether	CAS: 9004-98-2	
<u>Definition nach Ph. Eur. 9.4 [66]:</u>		
"Gemisch von Ethern verschiedener Macrogole und linearer Fettalkohole, hauptsächlich Oleylalkohol. Die Substanz enthält unterschiedliche Mengen an freiem Oleylalkohol und sie kann freie Macrogole enthalten. Die Anzahl der Mole Ethylenoxid, die mit 1 Mol Oleylalkohol reagiert haben, beträgt 2 bis 20 (Nominalwert). Ein geeignetes Antioxidans kann zugesetzt sein"		
Brij® O20 (syn.: Lipocol® O-20, Oleth-20, Volpo® N20)	n =	20
	m =	16 (= Oleylalkohol; C18:1 FAA)

EINLEITUNG

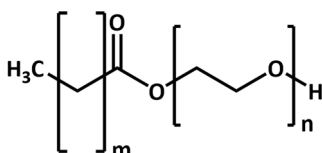
1.1.3.2. Fettsäureester

1.1.3.2.1. Macrogolstearate und -oleate

Die Herstellung der Macrogolstearate kann nach *Ph. Eur.* auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: Ethoxylierung von Stearinsäure mit der erforderlichen Menge (Mol) an Ethylenoxid (= Herstellungsweise 1) oder Veresterung der Fettsäure mit den Macrogolen der gewünschten mittleren Kettenlänge (= Herstellungsweise 2). Außerdem können zur Herstellung zwei verschiedene Typen der Stearinsäure, Typ I (Stearinsäure 50) und Typ II (Stearinsäure 95), verwendet werden (genaue Zusammensetzung siehe Kapitel 1.1.2). Dies kann, je nach Hersteller, zu unterschiedlichen Qualitäten führen, worauf bei einem Herstellerwechsel unbedingt zu achten ist [5, 26].

Aufgrund ihrer Esterstruktur sind Fettsäureester weniger stabil gegenüber Säuren und Basen als die entsprechenden Fettalkoholether. Die Gruppe der Macrogololeate ist zusätzlich empfindlich gegenüber Autoxidation, weswegen Macrogolstearate deutlich häufiger verwendet werden [5]. Letztere finden vorwiegend als O/W-Emulgatoren in halbfesten, dermalen Zubereitungen Anwendung [76], werden aber auch in Filmüberzügen als Stabilisator eingesetzt [5]. In Suppositorien können Macrogolstearate zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe, beispielsweise Glibenclamid, zugesetzt werden [77]. Macrogol-40-stearat (Myrj[®] 59) wurde ebenfalls in intravenösen Zubereitungen eingesetzt [78].

Tab. 1-3: Strukturelle Übersicht der betrachteten Fettsäureester.



Definition nach *Ph. Eur.* 9.4 [26]:

Gemisch von Mono- und Diestern hauptsächlich der Stearinsäure (Octadecansäure) und/ oder Palmitinsäure (Hexadecansäure) mit Macrogolen.

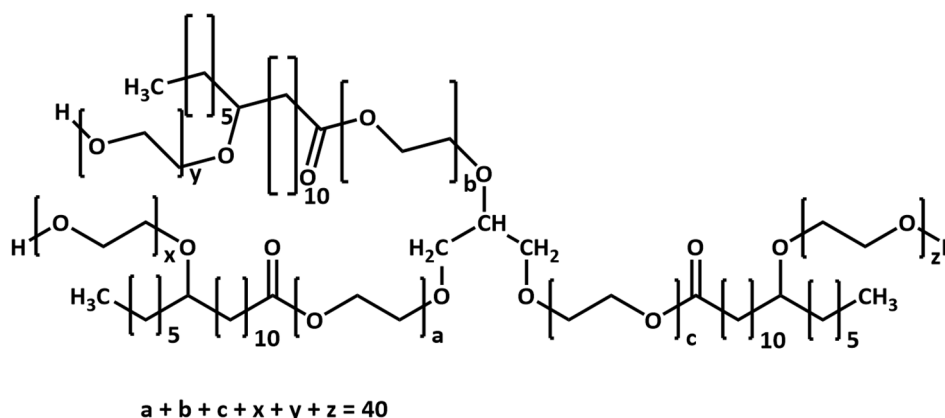
Sie werden entweder durch Ethoxylierung oder durch Veresterung von Macrogolen mit Stearinsäure 50 (Typ I) oder Stearinsäure 95 (Typ II) [...] gewonnen. Macrogolstearate können freie Macrogole enthalten. Die mittlere Polymerlänge beträgt 6 bis 100 Ethylenoxid-Einheiten je Molekül (Nominalwert).“

Macrogol-Stearate	CAS: 9004-99-3	
Myrj [®] 45 (syn.: Crodet [®] -S8, Lipopeg [®] 4-S)	n =	8
	m =	16 (= Stearinsäure; C18 FA)
Myrj [®] 52 (syn.: Crodet [®] -S40, Ritox [®] 52)	n =	40
	m =	16 (= Stearinsäure; C18 FA)
Myrj [®] 59 (syn.: Ritox [®] 53, Lipopeg [®] 100-S)	n =	100
	m =	16 (= Stearinsäure; C18 FA)

1.1.3.2.2. Macrogolglycerolhydroxystearate

Macrogolglycerolhydroxystearate werden durch Reaktion von hydriertem Rizinusöl mit den entsprechenden Äquivalenten an Ethylenoxid hergestellt. In der Kosmetikindustrie sind Kettenlängen von $n = 2 - 200$ gebräuchlich, wohingegen in der pharmazeutischen Industrie Kettenlängen mit $n = 7 - 60$ zum Einsatz kommen. Am häufigsten angewendet wird die Kettenlänge $n = 40$ (= Cremophor® RH40), deren Struktur in **Tab. 1-4** zu sehen ist [5].

Tab. 1-4: Strukturelle Übersicht zu Cremophor® RH40 (ethoxyliertes hydriertes Rizinusöl).



Definition nach Ph. Eur. 9.4 [79]:

“Macrogolglycerolhydroxystearat enthält hauptsächlich Tris(12-hydroxystearyl)glycerol, ethoxyliert mit 7 bis 60 Molekülen Ethylenoxid (Nominalwert), kleine Mengen Macrogolhydroxystearat und entsprechend freie Glycole. Die Substanz entsteht durch Reaktion von hydriertem Rizinusöl mit Ethylenoxid.“

Macrogolglycerolhydroxystearat (Cremophor® RH40)

CAS: 61788-85-0

Macrogolglycerolhydroxystearate als Reinsubstanzen sind chemisch stabil, mögliche Trübungen und Phasentrennungen können durch Homogenisieren, z. B. Schütteln, aufgehoben werden. Starke Säuren und Basen können, wie bei den Macrogolstearaten, zur Verseifung führen, worauf in Formulierungen zu achten ist. Wässrige Lösungen sind autoklavierbar (120 °C/ 30 min) [5].

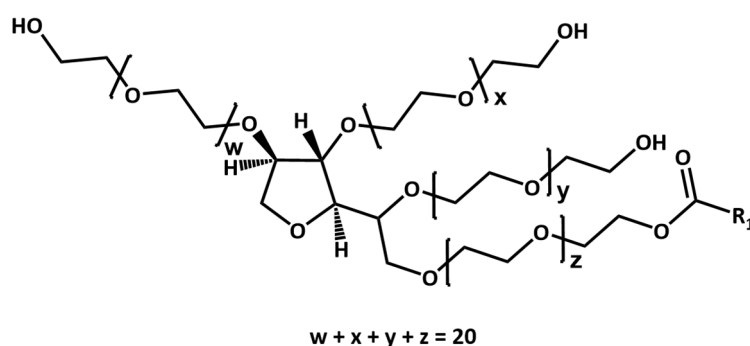
Macrogolglycerolhydroxystearate werden hauptsächlich zur Solubilisierung lipophiler Stoffe, wie ätherischen Ölen, lipophiler Vitamine und Wirkstoffe, sowie Fettsäuren und -alkohole, eingesetzt. Hierbei wird der zu lösende Stoff mit dem Hilfsstoff vermischt, auf 60 – 65 °C erhitzt und dann langsam mit Wasser zu einer klaren, mizellaren Lösung verdünnt [80, 81]. Außerdem werden sie als Emulgatoren in flüssigen Darreichungsformen zur oralen oder dermalen Applikation eingesetzt [5]. Insbesondere Cremophor® RH40 dient zur Herstellung von Mikroemulsionen und selbstemulgierenden Systemen [82, 83]. Außerdem konnte Cremophor® RH40 in experimentellen Ansätzen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung erfolgreich eingesetzt werden, beispielsweise in parenteralen Itraconazol-Mikroemulsionen [84].

EINLEITUNG

1.1.3.3. Polysorbate

Polysorbate (Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester) werden aus Sorbitol in drei Syntheschritten hergestellt. Zunächst erfolgt der Ringschluss von Sorbitol zum cyclischen Sorbitan, wobei Wasser eliminiert wird. Anschließend wird das Sorbitan Grundgerüst mit der entsprechenden Fettsäure partiell verestert und im letzten Schritt mit 20 Mol Ethylenoxid ethoxyliert [85]. Die Grundstruktur und Zusammensetzung der einzelnen Polysorbate findet sich in **Tab. 1-5**.

Tab. 1-5: Strukturelle Übersicht zu den betrachteten Polysorbaten.



Definition nach Ph. Eur. 9.4 [86, 87]:

“Gemisch von Partialestern von Fettsäuren, hauptsächlich Laurinsäure (Dodecansäure) [für Polysorbat 20, bzw.] Ölsäure (Acidum oleicum) [für Polysorbat 80], mit Sorbitol und seinen Anhydriden, die mit etwa 20 Mol Ethylenoxid für jedes Mol Sorbitol und Sorbitolanhydrid ethoxyliert sind.“

Polysorbate

Tween® 20	$R_1 = -C_{11}H_{23}$ (= Laurinsäure; C12 FA) CAS: 9005-64-5
Tween® 80	$R_1 = -C_{17}H_{33}$ (= Ölsäure; C18:1 FA) CAS: 9005-65-6

Im schwach-sauren bis schwach-basischen pH-Bereich sind Polysorbate stabil. Durch Einwirkung starker Säuren und Basen kann die Fettsäure abgespalten werden. Insbesondere Polysorbat 80 (Tween® 80; Polyoxyethylen-Sorbitan-oleat) neigt zur Autoxidation und der damit verbundenen Bildung zu Peroxiden. Diese Peroxide können zur oxidativen Zersetzung enthaltener Wirkstoffe führen [5, 88].

Polysorbate der Fettsäuren C_{12} bis C_{18} weisen HLB-Werte im Bereich 14.9 bis 16.7 auf und fallen somit in den Bereich der O/W-Emulgatoren. Meist werden, je nach erforderlichlichem HLB-Wert, Mischungen verschiedener Polysorbate verwendet [5, 85].

Neben der Anwendung als Emulgatoren werden Polysorbate auch zur Löslichkeitsverbesserung lipophiler Stoffe wie beispielsweise Docetaxel [89, 90], Hydrocortison [91], sowie ätherischer Öle und lipophiler

EINLEITUNG

Vitamine [80, 85] und zur Stabilisierung von Protein-Formulierungen zur parenteralen Anwendung [88] eingesetzt. Außerdem zeigte sich, dass die Bioverfügbarkeit von Substraten des P-Glycoproteins durch Verwendung von Tween® 80 verbessert werden konnte [92, 93].

1.2. Charakterisierung von Hilfsstoffgemischen nach Europäischem Arzneibuch (*Ph. Eur.*)

Zur Charakterisierung von Naturstoffgemischen, wie beispielsweise Fetten, verwendet das *Ph. Eur.* die sogenannten Fettkennzahlen. Diese werden ebenso für zahlreiche Hilfsstoffe, insbesondere solcher von polydisperser Natur, zur qualitativen Beurteilung verwendet. So gibt die Hydroxylzahl (OHZ) beispielsweise für die Gruppe der Macrogole die mittlere molare Masse der betrachteten Substanz wieder und fungiert, zusammen mit dem Erstarrungspunkt, als Identitätskriterium [94].

In **Tab. 1-6** findet sich eine Übersicht aller Hilfsstoffe, die in dieser Arbeit relevant sind, sowie der jeweils zu bestimmenden Fettkennzahlen. Die Fettkennzahlen richten sich sowohl nach den vorhandenen als auch den zu erwartenden (in Form von Verunreinigungen, Abbauprodukten, etc.) Strukturmerkmalen der betrachteten Substanz. So richtet sich beispielsweise die Monographie „Macrogolstearat“ einerseits nach der Bestimmung der einzelnen Macrogole in Form der Hydroxylzahl (OHZ), andererseits aber auch nach der Fettsäurenkomponente in Form der Iodzahl (IZ) und der Fettsäurezusammensetzung (FSZ). Außerdem ist explizit in dieser Gruppe der Macrogolester zu beachten, dass das *Ph. Eur.* verschiedene Herstellungsweisen gestattet, sodass sowohl mit verschiedenen Polymerverteilungen als auch Nebenprodukten zu rechnen ist. Bestimmungsmethoden wie Säurezahl (SZ), Verseifungszahl (VZ) und Restmengen an Ethylenoxid und Dioxan (EO&D) zielen darauf ab. Allerdings spiegeln SZ und VZ auch Hydrolysen während der Lagerung wider [26].

In **Tab. 1-7** findet sich eine Zusammenfassung der Fettkennzahlen. Hierbei handelt es sich ausschließlich um Parameter, die bestimmte Strukturmerkmale wiedergeben. So lässt sich anhand der Größenordnung der bestimmten Fettkennzahl zwar eine Aussage über die Menge an einer enthaltenen funktionellen Gruppe treffen, eine genaue Zusammensetzung lässt sich jedoch nicht daraus erschließen. So bleiben die Zusammensetzung und Verteilung der einzelnen Polymerketten unbekannt. Des Weiteren ist anzumerken, dass die meisten Bestimmungsmethoden mit einem gewissen analytischen Zeitaufwand, beispielsweise durch bestimmte Reaktionsdauern oder exakt getaktete Abläufe, verbunden sind, sodass die permanente Anwesenheit eines Analytikers gegeben sein muss.

EINLEITUNG

Tab. 1-6: Charakterisierung der betrachteten Hilfsstoffe mittels Fettkennzahlen (nach *Ph. Eur.* 9.4).

Monographie	Handelsnamen bzw. Bezeichnung nach IUPAC	Charakterisierung nach <i>Ph. Eur.</i> 9.4 (G: Gehalt)
Polyethylenglykol [6]	Macrogol, PEG	OHZ, Erstarrungspunkt, Dichte (g/ml), kin. Viskosität (mm ² /s), dyn. Viskosität (mPa*s), Ethylenglykol und Diethylenglykol (GC-FID)
Laurylalkohol [18, 95]	1-Dodecanol	G: 98.0 % (GC-FID)
Cetylalkohol [19]	1-Hexadecanol	OHZ, IZ, SZ, VZ; G: 95.0 % (GC-FID)
Cetylstearylalkohol [20]	Gemisch aus 1-Hexadecanol und 1-Octadecanol	OHZ, IZ, SZ, VZ; G: mind. 40.0 % Stearylalkohol und mind. 90.0 % Stearyl- und Cetylalkohol (GC-FID)
Laurinsäure [22, 95]	Dodecansäure	G: 98.0 % (GC-FID)
Myristinsäure [23, 95]	Tetradecansäure	G: 97.0 % (GC-FID)
Palmitinsäure [17, 24]	Hexadecansäure	IZ, SZ; FSZ (GC-FID, Methode C): 92.0 % Palmitinsäure, max. 6.0 % Stearinsäure
Margarinsäure	Heptadecansäure	<i>n/v</i> ²
Stearinsäure [25]	Octadecansäure	IZ, Erstarrungspunkt; FSZ (GC-FID)
Ölsäure [96]	(9Z)-Octadec-9-ensäure	IZ, POZ, SZ; G: 65.0 % - 88.0 (GC); FSZ (GC-FID, Methode C)
Linolsäure [95, 97]	(9Z,12Z)-Octadeca-9,12-diensäure	G: 98.0 % (GC-FID)
Macrogol-Laurylether [64]	Brij [®] 30, Thesit [®]	OHZ, IZ, SZ, VZ, EO&D
Macrogol-Cetylether	Brij [®] 52, Brij [®] C10	<i>n/v</i>
Macrogol-Stearylether [65]	Brij [®] 72, Brij [®] S20	OHZ, IZ, VZ, SZ, EO&D
Macrogol-Oleylether [66]	Brij [®] O20	OHZ, IZ, POZ, SZ, VZ, EO&D
Macrogol-Stearate [26]	Myrj [®] 45, Myrj [®] 52, Myrj [®] 59	OHZ, IZ, SZ, VZ, EO&D; FSZ (GC-FID, Methode C)
Macrogol-40-glycerol-hydroxystearat [79]	Cremophor [®] RH40	OHZ, IZ, SZ, VZ, EO&D
Polysorbate [86, 87]	Tween [®] 20, Tween [®] 80	rel. Dichte, dyn. Viskosität (mPa*s), OHZ, POZ, SZ, VZ, EO&D; FSZ (GC-FID, Methode C)

² *n/v*: nicht verfügbar. Keine entsprechende Monographie zu diesen Stoffen.

EINLEITUNG

Tab. 1-7: Bedeutung und Bestimmung der Fettkennzahlen.

Fettkennzahl	Mono-graphie	Bedeutung	Ablauf der Bestimmung
Hydroxylzahl (OHZ)	[6, 94]	Gesamtmenge an acetylierbaren Hydroxylgruppen.	Acetylierung der Hydroxylgruppen. Titration des entstehenden Kations (Pyridiniumion) mit KOH (Methode A, Macrogole) gegen Phenolphthalein bzw. Base mit Perchlorsäure (Methode B) gegen Kristallviolett. Differenzbestimmung gegen einen Blindwert.
Säurezahl (SZ)	[98]	Gesamtmenge an freien Säuren.	Direkttitration der freien Säuren mit 0.1 M NaOH oder 0.1 M KOH gegen Phenolphthalein.
Verseifungszahl (VZ)	[99]	Gesamtmenge an freien Säuren und verseifbaren Estern.	Verseifung der Ester mit 0.5 M KOH. Titration der Gesamtmenge an Säuren (freie und durch Veresterung entstandene) mit 0.5 M HCl gegen Phenolphthalein. Differenzbestimmung gegen einen Blindwert.
Esterzahl (EZ)	[100]	Gesamtmenge an verseifbaren Estern	Keine direkte Bestimmung. Differenz aus VZ und SZ.
Unverseifbarer Anteil (UVA)	[101]	Gesamtmenge an nicht verseifbaren Bestandteilen, die bei 100 – 105 °C nicht flüchtig sind.	Verseifung in ethanolischer KOH. Extraktion mit Ether. Abdampfen des Ethers. Trocknung des Rückstandes bei 100 – 105 °C und anschließende Wägung.
Iodzahl (IZ)	[102]	Gesamtmenge an ungesättigten Strukturmerkmalen.	Addition von IBr an ungesättigte Gruppen. Umsetzung des überschüssigen Reagenzes mit KI zu I ₂ . Titration des I ₂ mit Na ₂ S ₂ O ₃ gegen Stärke-Indikator. Differenzbestimmung gegen einen Blindwert.
Peroxidzahl (POZ)	[103]	Gesamtmenge an Peroxiden.	Reduktion von KI zu I ₂ durch die enthaltenen Peroxide. Titration des entstandenen I ₂ mit Na ₂ S ₂ O ₃ gegen Stärke-Indikator. Differenzbestimmung gegen einen Blindwert.

EINLEITUNG

Fettkennzahl	Mono-graphie	Bedeutung	Ablauf der Bestimmung
Ethylenoxid und Dioxan (EO&D)	[104]	Gesamtmenge an toxischen Rückständen	Bestimmung mittels <i>Head-Space</i> -Gaschromatographie. Vergleich mit Referenzlösungen Dreifachbestimmung.
Fettsäurezusammensetzung (FSZ)	[17, 95]	Bestimmung der Zusammensetzung von Fetten, fetten Ölen, Fettsäuren	Derivatisierung der Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern (FAMES; <i>fatty acid methyl esters</i>). Anschließend Trennung mittels Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID). Die Auswertung erfolgt mittels Referenzsubstanzen und Flächennormalisierung (100 %-Methode).

1.3. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Unter dem Begriff Chromatographie werden Verfahren zusammengefasst, die zur Trennung von Stoffgemischen geeignet sind. Dabei erfolgt die Trennung aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Analyten mit der stationären und mobilen Phase. Hierbei liegen verschiedene Trennmechanismen zugrunde: Adsorption, Verteilung, ionische Wechselwirkungen bzw. Ionenaustausch (IEC; *Ion exchange chromatography*), Größenausschluss (SEC; *Size-exclusion chromatography*), Affinität und chirale Interaktionen.

Auch in der HPLC können diese Mechanismen Einfluss nehmen, wobei die Abgrenzung voneinander oft nicht eindeutig ist, da mehrere Mechanismen zu einer Trennung beitragen können. Sie wird hauptsächlich im analytischen Bereich (< 1 µg bis < 1 mg Substanz) eingesetzt, findet aber auch präparativ (> 1 mg) Einsatz [105].

Generell werden in der HPLC flüssige mobile Phasen und flüssige oder feste stationäre Phasen verwendet. Die gängigsten mobilen Phasen sind in **Tab. 1-10** zusammengestellt. Im Vergleich zu Schwerkraftsäulen werden diese mittels Kolbenpumpen durch die Säule befördert, da die Schwerkraft allein nicht ausreichend wäre um konstante Fließgeschwindigkeiten zu gewährleisten. Dieser Zusammenhang resultiert aus dem erhöhten Widerstand durch die immer kleiner gestalteten Partikel, die zu einer Erhöhung der Trennleistung, durch Verringerung des A-Terms der *Van-Deemter-Gleichung*, notwendig sind [105]. Die *Van-Deemter-Gleichung* beschreibt die Korrelation aus der Trennbodenhöhe H und der Strömungsgeschwindigkeit u :

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

Gl. 2

EINLEITUNG

Der A-Term (Eddy-Diffusion, Mehrwegeeffekt) beschreibt hierbei den Einfluss des zufällig zurückgelegten Weges, den die Teilchen des Fließmittels und der Analyse durch die gepackte stationäre Phase nehmen können. Er ist unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit, verhält sich aber proportional zu Säulendurchmesser und Partikelgröße, und antiproportional zur Partikelgrößenverteilung.

Der B-Term (Longitudinaldiffusion) beschreibt den Einfluss der Eigendiffusion der Teilchen mit und entgegen der Strömungsrichtung auf die Peakverbreiterung. Der Einfluss dieses Terms sinkt mit erhöhter Strömungsgeschwindigkeit.

Der C-Term (Massentransfer) berücksichtigt die Peakverbreiterungen aufgrund von Porendiffusion. So benötigen tiefer eindringende Teilchen länger um erneut Wechselwirkungen mit der mobilen Phase eingehen zu können als Teilchen, die nur an der Oberfläche interagieren. Dieser Effekt erhöht sich bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten. Ein Weg diesen Effekt zu reduzieren sind sogenannte *Porous-Shell Particles* (bzw. *Core-Shell Particles*), die im Gegenteil zu total-porösen Partikeln (Durchmesser 1.5 – 5 μm) nur aus einer dünnen porösen Schicht (0.25 – 0.5 μm , Gesamtdurchmesser 2 – 5 μm), die auf einen keramischen sphärischen Kern aufgetragen ist, bestehen. Durch die verminderte Eindringtiefe sinkt der C-Term [106-110].

Handelsübliche HPLC-Säulen sind in einer Länge von 5 – 30 cm, einem Durchmesser von 2 – 8 mm und Teilchengrößen von 2 – 5 μm erhältlich. Die stationäre Phase liegt in Form von sphärischen (kugelförmigen) oder gebrochenen (unregelmäßigen) total- oder teil-porösen Partikeln einer durchschnittlichen Porengröße von 7 – 12.5 nm (70 – 125 Å) vor. Als Basis dienen meist poröse Materialien wie Kieselgel oder Aluminiumoxid. Diese dienen in der Normalphasenchromatographie (NP) meist als stationäre Phasen, werden jedoch meist für die in der HPLC häufiger angewandte Umkehrphasenchromatographie (*reversed phase*, RP) modifiziert. In **Tab. 1-8** sind die gängigsten Säulenmaterialien zusammengefasst [105, 110].

EINLEITUNG

Tab. 1-8: Gängige Modifikationen von Kieselgel [110].

Funktionelle Gruppe (Art der Modifikation)	Art der Chromatographie
C ₃	RP
C ₄	RP
C ₈	RP
C ₁₈	RP
C ₃₀	RP
Phenyl-	RP
Perfluorophenyl- (PFP)	RP
Cyano- (-CN)	RP, NP
Amino- (-NH ₂)	RP, NP, IEC
Diol	RP, HILIC, SEC
WAX	IEC
(weak anion exchange, schwacher Anionenaustauscher; z. B. tertiäre Ammoniumverbindungen wie Ammoniumhydroxid)	
WCX	IEC
(weak cation exchange, schwacher Kationenaustauscher; z. B. Carbonsäuren oder deren Salze)	
SAX	IEC
(strong anion exchange, starker Anionenaustauscher; meist quartäre Ammoniumgruppen)	
SCX	IEC
(strong cation exchange, schwacher Kationenaustauscher; meist Sulfonsäuregruppen)	

1.4. HPLC-Detektoren in der Qualitäts- und Reinheitsanalytik

In der HPLC finden eine Vielzahl an Detektoren Anwendung. Dabei müssen diese einige Anforderungen, wie universelle Anwendung, Temperaturstabilität, Linearität und Sensitivität, erfüllen. Diese Vielzahl an Detektoren wird formal in vier verschiedene Gruppen unterteilt: Analyt-selektive Detektoren, *Bulk-Property*-Detektoren, gekoppelte (strukturabhängige) Detektoren und Detektoren mit *Post-Column*-Derivatisierung. In **Tab. 1-9** finden sich die gängigsten, kommerziell verfügbaren Detektoren sowie deren Spezifikationen.

Die Signalerzeugung der Analyt-selektiven Detektoren beruht auf stoffspezifischen Eigenschaften des Analyten, die im Fließmittel nicht oder nur in geringem Ausmaß vorhanden sind. Zu ihnen gehören UV/Vis- und Fluoreszenzdetektoren, elektrochemische, radioaktive, konduktive und chirale Detektoren, sowie solche, die Chemilumineszenz verwenden.

EINLEITUNG

Im Gegensatz dazu geben *Bulk-Property*-Detektoren Änderungen einer Eigenschaft der mobilen Phase durch das Vorhandensein eines Analyten an. So ändert sich bei refraktometrische Detektoren der konstante Brechungsindex des Fließmittels durch die Anwesenheit eines Analyten. Bei Aerosol-basierten Detektoren (ELSD, NQAD, CAD; siehe Kapitel **1.4.3**) ist die entscheidende Eigenschaft die Flüchtigkeit, die im Falle der Analyten deutlich geringer sein sollte als die der mobilen Phase.

Gekoppelte Detektoren eignen sich zur Strukturaufklärung. Zu ihnen gehören die Massenspektrometrie (MS), die Infrarot-Spektroskopie (IR), sowie die *Nuclear Magnetic Resonance*-Spektroskopie (NMR).

Die vierte Gruppe umfasst Detektoren, die eine Nachsäulenderivatisierung (*post-column*) ermöglichen. Diese finden nur in speziellen Bereichen Anwendung, wenn die anderen genannten Detektoren ungeeignet sind [111-113].

Tab. 1-9: Übersicht über die verschiedenen Arten von Detektoren [112-114].

Detektionsprinzip/ Detektor	Nachweisgrenze³ (LOD)	linearer Bereich (in Dekaden)
Extinktion (UV/Vis)	10 pg	3 – 4
Fluoreszenz	10 fg	5
elektrochemisch	100 pg	4 – 5
Brechungsindex	1 ng	3
Leitfähigkeit	100 pg – 1 ng	5
MS	< 1 pg	5
FT-IR	1 µg	3
Lichtstreuung (ELSD)	1 – 10 ng	2 - 3
Lichtstreuung (CNLSD, NQAD™)	0.5 ng	3 - 5
Partikelladung (CAD)	5 ng	5

³ Die Nachweisgrenze ist zusätzlich abhängig von dem betrachteten Analyten, den HPLC-Bedingungen und dem verwendeten Gerät. Die Werte sind Durchschnittswerte und gelten für kommerziell verfügbare Geräte.

EINLEITUNG

1.4.1. UV/Vis-Detektoren

Die Gruppe der UV/Vis-Detektoren hat sich aufgrund zahlreicher Vorteile zum Goldstandard in der heutigen Analytik etabliert. Zu diesen gehören vor allem ein großer linearer Konzentrationsbereich von > 5 Zehnerpotenzen und eine hohe Sensitivität, sofern die betrachteten Analyten im UV/Vis-Bereich (190 – 600 nm) absorbieren. Dies erfordert chromophore Strukturmerkmale, d. h. Strukturmerkmale mit anregbaren π - und n-Elektronen [115]. Aromatische Strukturen absorbieren bei Wellenlängen < 260 nm stark, während bei linearen Molekülen mit einer oder mehr Doppelbindungen (Carbonyle, Olefine) dieser Bereich auf < 215 nm absinkt. Aliphatische Moleküle benötigen zur Anregung nochmals deutlich mehr Energie und sinken in Bereiche \leq 205 nm. In diesem Zusammenhang ist es wichtig auch den *UV-Cut-off* der einzelnen Lösungsmittel zu berücksichtigen, also die Grenzwellenlänge, ab der das Fließmittel selbst absorbiert [113]. In **Tab. 1-10** sind die Eigenschaften der für die HPLC wichtigsten Lösungsmittel aufgeführt.

Weitere Vorteile der UV/Vis-Detektoren sind ihre leichte Handhabung, Robustheit und die Kompatibilität mit Gradientenelution, sowie eine relative Stabilität gegenüber Temperaturänderungen, wodurch die Detektoren universell einsetzbar sind. Außerdem sind sie im Gegensatz zu Massenspektrometern und Aerosol-basierten Detektoren nicht destruktiv [113].

Tab. 1-10: Übersicht der physikalischen Eigenschaften der wichtigsten HPLC-Lösungsmitteln [116, 117].

Lösungsmittel	UV Cutoff [nm]	Brechungsindex	Viskosität [10^{-3} kg/m*s] ⁴	Siedepunkt [°C]	Elutionskraft (an Kieselgel) E_0
Aceton	330	1.359	0.36	56	0.53
Acetonitril	190	1.344	0.38	82	0.52
Chloroform	245	1.446	0.57	61	0.26
Dichlormethan	233	1.424	0.44	40	0.30
Dimethylsulfoxid (DMSO)	268	1.478	2.24	189	0.50
Ethylacetat	256	1.372	0.45	77	0.48
Hexan	195	1.375	0.31	69	0.00
Isopropanol	210	1.386	2.30	97	0.60
Methanol (MeOH)	205	1.328	0.55	65	0.70
1-Propanol	205	1.377	2.40	82	0.60
Tetrahydrofuran (THF)	212	1.407	0.55	66	0.53
Wasser	190	1.333	1.00	100	

⁴ Umrechnungsfaktor zur Darstellung in SI-Einheiten. Angabe in der Literatur in „cP“. 1 P (Poise) entspricht 0.1 kg/(m*s).

EINLEITUNG

Das Funktionsprinzip basiert darauf, dass die Lichtabsorption des Säuleneluates, welches durch eine Messzelle geleitet wird und im ultravioletten oder sichtbaren Bereich gemessen wird. Diese Messzellen besitzen meist Messlängen (b) von 2 – 10 mm und ein möglichst kleines Volumen (1 – 10 μ l), um Peakverbreiterungen durch Totvolumina zu vermeiden [111, 112].

Das Signal, d. h. die im Detektor an einer Halbleiterschicht (meist eine Photodiode) als elektrisches Signal vermessene Rest-Intensität (I), ist abhängig von dem Licht, das durch die Probenzelle gelangt, und folgt dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot b$$

Gl. 3

A ist die Absorption. Diese wird in der Software direkt aus dem Logarithmus des Verhältnisses der Intensität des eingestrahnten Lichtes (I_0) und des ankommenden Lichtes (I) berechnet. ϵ ist der molare Absorptionskoeffizient und somit eine substanzabhängige Größe, b ist die Schichtdicke, durch die der Lichtstrahl die Lösung durchleuchtet. Wie in der Gleichung zu sehen ist, handelt es sich bei der Absorption um eine von der Konzentration c [mol/l] abhängige Größe [113].

Um Schwankungen der Lampenintensität und des Flusses der mobilen Phase zu kompensieren wird der Aufbau oft um einen Strahlenteiler erweitert, wodurch in sogenannten Zweistrahlphotometern einer der Strahlen durch eine Referenzzelle geführt wird. Meistens befindet sich die Referenzzelle jedoch nicht im Fluss, sondern es wird eine mit Luft gefüllte Zelle verwendet, wodurch die Schwankungen der mobilen Phase nicht ausgeglichen werden [113].

Es gibt drei Arten von UV/Vis-Detektoren. Der Festwellenlängendetektor, welcher nur eine bestimmte Wellenlänge filtert und bei dieser misst, findet heutzutage kaum noch Anwendung. Hauptsächlich werden nur noch der VWD (*Variable wave-length detector*), bei dem die Messwellenlänge variiert werden kann, und der DAD (*Diode-Array-Detector*), mit dem der gesamte Spektralbereich gleichzeitig vermessen werden kann, eingesetzt [111-113].

1.4.2. Massenspektrometrische Detektoren

Die Massenspektrometrie lässt sich aus der modernen Analytik heutzutage nicht mehr wegdenken. So bietet sie, neben einer hohen Sensitivität und Selektivität, auch die Möglichkeit Proben mit komplexen Matrices, wie beispielsweise Körperflüssigkeiten, nach erfolgter chromatographischer Trennung (bspw. mittels HPLC) zu analysieren. Jedoch ist eine Kopplung mit der HPLC aufgrund der eingeleiteten Fließmittelmengen nicht so einfach wie beispielsweise mit der GC, bei der das Säuleneluat bereits gasförmig vorliegt.

Um die Kopplung zu ermöglichen ohne das notwendige Hochvakuum zu beeinträchtigen, wurden Verfahren wie die ESI (*electron spray ionization*), APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) und APPI (*atmospheric pressure photoionization*) entwickelt. Diese gehören zu den sogenannten weichen Ionisierungsarten, was bedeutet, dass keine Fragmentierungen der Analyten während der Ionisierung auftreten.

Liegen die Analyten ionisiert vor können sie, je nach verwendetem Analysator, entweder sofort selektiert und detektiert werden – wie beispielsweise bei einem *Single-Quadrupol* (Q) – oder es erfolgt vor der Detektion noch eine Fragmentierung, wie es beispielsweise bei dem *Triple-Quadrupol* (QqQ) oder der Ionenfalle (*ion trap*) möglich wäre.

Der *Single-Quadrupol* ist in der Lage, einen gewünschten Analyten nach seinem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) zu selektieren. Dies entspricht auch der Aufgabe der ersten Quadrupol-Einheit des QqQ. Die zweite Einheit (q) dient der Fragmentierung und Bildung von charakteristischen Fragmentionen (= Tochterionen). In der dritten Einheit kann der Fokus dann auf ein bestimmtes Tochterion gelegt und dieses isoliert werden. Dies gewährleistet eine hohe Selektivität auch innerhalb komplizierter Matrices, wie bspw. Plasmaproben, sodass auf aufwändige Probenvorbereitungen häufig verzichtet werden kann. Aufgrund dessen werden Quadrupol-Analysatoren meist zur quantitativen Analyse organischer Proben herangezogen.

Die Ionenfalle funktioniert ähnlich dem QqQ, wobei hier die Analytionen in einem elektromagnetischen Feld fixiert werden (**Abb. 1-2, 1**). Dieses wird mittels Hochspannung an einer Ringelektrode mit zwei Endkappen erzeugt. Über die Frequenzspannung dieser Elektrode lassen sich nun selektiv m/z festhalten (**Abb. 1-2, 2**), die an einem Elektronenvervielfacher ein elektrisches Signal erzeugen. Bei Bedarf kann das elektromagnetische Feld über erzwungene Oszillation, die auf die Resonanzfrequenz des betrachteten Analyten eingestellt ist, zur Fragmentierung der Analyten führen (**Abb. 1-2, 3a**), welche erneut selektiert und detektiert (**Abb. 1-2, 3b**) werden können. Dies ermöglicht eine umfassende Strukturaufklärung. Im quantitativen Bereich ist die Ionenfalle dem Quadrupol unterlegen, da es durch die Akkumulation in der Ionenfalle zur intermolekularen Adduktbildung mit Lösungsmittelmolekülen und damit auch zu einer variablen Signalintensität kommen kann.

EINLEITUNG

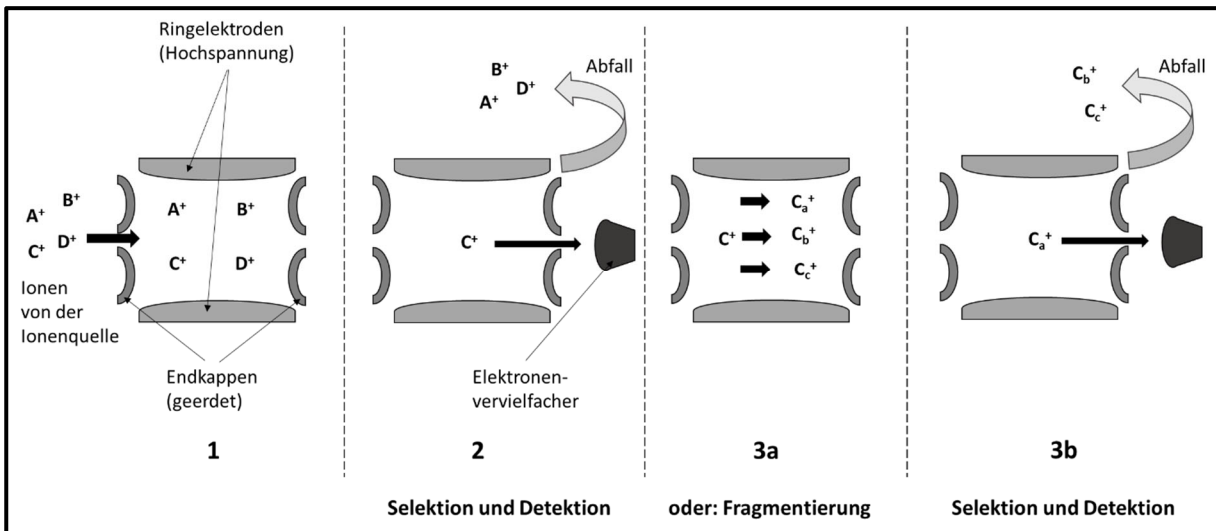


Abb. 1-2: Funktionsweise der Ionenfalle [113].

Eine weitere Art der Massenspektrometere sind *Time-of-flight*-Massenspektrometer (TOF). Bei diesen wird allen Analyten die gleiche kinetische Energie zugeführt und die Zeit gemessen, die die einzelnen Ionen benötigen um ein Flugrohr zu passieren. Die Geschwindigkeiten korrelieren mit m/z und werden durch entsprechende Programme ausgewertet [113, 118].

1.4.3. Aerosol-basierte Detektion

Zur Gruppe der aerosol-basierten Detektoren gehören drei kommerziell verfügbare Detektoren: der *Charged Aerosol Detector* (CAD), der *Evaporative Light Scattering Detector* (ELSD) und der *Nano Quantity Analyte Detector* (NQAD™). Letzterer wird auch, vorwiegend im Entwicklungsbereich, als *Condensation Nucleation Light Scattering Detector* (CNLSD) bezeichnet.

Allen dreien ist gemein, dass das von der Trennsäule kommende Eluat zunächst vernebelt wird, sodass sich Tröpfchen bilden. Die Tröpfchenbildung und der zugehörige mittlere Durchmesser (d_d) ist dabei von mehreren Parametern abhängig: hierzu gehören Eigenschaften der mobilen Phase wie deren Oberflächenspannung (σ), Viskosität (η) und Dichte (ρ). Andere Variablen wie die Strömungsgeschwindigkeit des flüssigen Eluats (v_l) und des Verneblergases (v_g), sowie die Volumenflüsse beider (Q_l und Q_g) spielen ebenfalls mit hinein. Unter Berücksichtigung dieser Parameter setzt sich die *Nukiyama-Tanasawa-Gleichung* zusammen:

$$d_d = 585 * \frac{\sqrt{\sigma}}{(v_g - v_l) * \sqrt{\rho}} + 597 * \left(\frac{\eta}{\sqrt{\rho * \sigma}} \right)^{0.45} * \left(1000 * \frac{Q_l}{Q_g} \right)^{1.5}$$

Gl. 4

EINLEITUNG

Aus diesem Zusammenhang lässt sich bereits ersehen, dass mobile Phasen mit einer geringeren Viskosität und Oberflächenspannung zu kleineren Tröpfchen führen, da sich der mittlere Tröpfchendurchmesser d_d proportional zu diesen Eigenschaften verhält. Da vor dem Verdampfungsraum größere Tröpfchen, deren vollständige Trocknung nicht erzielt werden würde, abgeleitet werden, resultiert aus dem kleineren Tröpfchendurchmesser eine höhere Substanzzufuhr und somit ein größerer Signalausschlag (*Response*). Dadurch kommt es in der Umkehrphasenchromatographie bei Gradientenelution zu einem *Response*-Anstieg durch Erhöhung des organischen Anteils.

Der Fließmittelanteil wird im Verdampfungsraum bzw. -rohr verdampft, sodass nur noch feste oder flüssige Partikel der Analysesubstanzen zurückbleiben. Dies setzt voraus, dass sämtliche verwendeten Lösungsmittel und -zusätze vollständig verdampfbar sind. Da insbesondere organische Lösungsmittel oftmals nicht-flüchtige Rückstände enthalten, sollte auf eine hohe Reinheit dieser Lösungsmittel geachtet werden, insbesondere da der weitertransportierte Anteil mit steigendem organischem Anteil ebenfalls zunimmt. Die Notwendigkeit der Flüchtigkeit schränkt zwar einerseits die Auswahl an Fließmitteln stark ein, andererseits sind entwickelte Methoden anschließend problemlos auf die Massenspektrometrie übertragbar, da hier dieselben Anforderungen gelten.

Der Durchmesser der verbliebenen Partikel ist abhängig von drei Faktoren: dem Ausgangsdurchmesser der Tröpfchen (d_d), der eingesetzten Konzentration (c) an Analyt und der Dichte (ρ_p) des partikelbildenden Analyten. Der Zusammenhang wird durch Gleichung **Gl. 5** beschrieben:

$$d_p = d_d * \left(\frac{c}{\rho_p} \right)^{1/3}$$

Gl. 5

Aufgrund des nicht-linearen Partikelwachstums ergibt sich für die *Response* (A) ein nicht-linearer Zusammenhang, wobei die injizierte Menge an Analyt (m_{inj}) und zwei Koeffizienten (a , b) mit eingehen:

$$A = a * (m_{inj})^b$$

Gl. 6

Der Koeffizient a ist hierbei ein Maß für die Sensitivität, während der Exponent b die Kurvenform beschreibt. Ein linearer Zusammenhang zwischen *Response* und Analytkonzentration besteht bei $b = 1$. Im Falle $b < 1$ spricht man von einer sublinearen *Response* (nach unten gekrümmte Kurve), bei $b > 1$ von supralinear (nach oben gekrümmte Kurve). In allen drei Detektortypen gilt, unabhängig davon wie die Detektion erfolgt, der lineare Zusammenhang ($b = 1$) nur in einem kleinen Konzentrationsbereich (siehe **Tab. 1-9**).

EINLEITUNG

Mittels log-log-Transformation lässt sich aber in gewissem Maße eine Linearität erzeugen [112-114]:

$$\log A = b \cdot \log m_{inj} + \log a$$

Gl. 7

Nach der Partikelerzeugung unterscheiden sich die drei Detektoren in ihrer Detektionsweise. Der ELSD und NQAD™ nutzen beide die Streuung eines polychromatischen Lichtstrahles, die an der Partikeloberfläche auftritt. Dabei werden die Partikel durch diesen Lichtstrahl (meist LED oder Halogenlampen) bewegt und das gestreute Licht wird an einem Photomultiplier gemessen. Der NQAD™ bietet gegenüber dem ELSD den Vorteil, dass die Partikel vor dem Lichtstrahl noch einen Kondensationsraum durchqueren, in dem, meist mit Wasserdampf, gesättigte Bedingungen herrschen. An der Partikeloberfläche kondensiert das Wasser und bildet eine Kondensationsschicht, die zu einem Größen- und Gewichtszuwachs führt, wodurch einerseits, nach **Gl. 6**, die *Response* generell ansteigt und andererseits kleinere Partikel, die zu Rayleigh-Streuung führen, auf einen Größenbereich anwachsen, der zu der wünschenswerteren Mie-Streuung führt.

Bei beiden Streuungsarten handelt es sich um elastische Streuungen von Licht, wobei die Rayleigh-Streuung an Partikeln erfolgt, deren Radius (r_p) deutlich kleiner als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes ist (Verhältnis $r_p/\lambda < 0.1$) und bei der Mie-Streuung die Partikelradien im Größenbereich der eingestrahnten Wellenlänge liegen ($r_p/\lambda = 0.1 - 2$). Bei $r_p/\lambda > 2$ treten Reflexion oder Refraktion auf. Da die Mie-Streuung im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung unabhängig von der eingestrahnten Wellenlänge ist, ist sie die robustere und effizientere Streuungsart, wodurch der NQAD™ auch der robustere der beiden Detektoren ist [119].

Weitere Nachteile des ELSD sind eine geringere Sensitivität [120] und sogenannte *Spike-Peaks*, die bei Injektionen größerer Substanzmengen, welche oft zur Reinheitsanalytik nach *Ph. Eur.* eingesetzt werden, willkürlich auftreten können. Diese sitzen meist auf dem Hauptpeak auf und können mögliche Verunreinigungen überdecken [121].

1.4.3.1. Das Funktionsprinzip des Charged Aerosol Detector (CAD)

Der Corona® CAD ist das erste kommerziell erhältliche Modell des von Dixon und Peterson im Jahr 2002 vorgestellten Detektors [122]. Es handelt sich hierbei um einen destruktiven Detektor. In **Abb. 1-3** ist der schematische Aufbau des Corona® CAD dargestellt. Durch eine Gaszufuhr wird Stickstoff zugeleitet, welcher entweder über eine Flasche reinen Stickstoffes zugeführt werden kann oder über einen Stickstoffgenerator aus Druckluft generiert wird. Dieser wird in zwei Ströme aufgeteilt (1), wovon ein Teil an einer Corona-Nadel aufgeladen wird (4). Der andere Teil gelangt in den Vernebler (2) orthogonal zur Strömungsrichtung des von der Säule kommenden Eluentstroms, wodurch das Eluat vernebelt wird und Eluattröpfchen unterschiedlicher

EINLEITUNG

Größe entstehen. Neuere Modelle, wie der Corona® Veo, nutzen einen konzentrischen Vernebler, bei dem der Stickstoff über eine den Eluentzulauf umschließende Ringdüse zugeleitet wird.

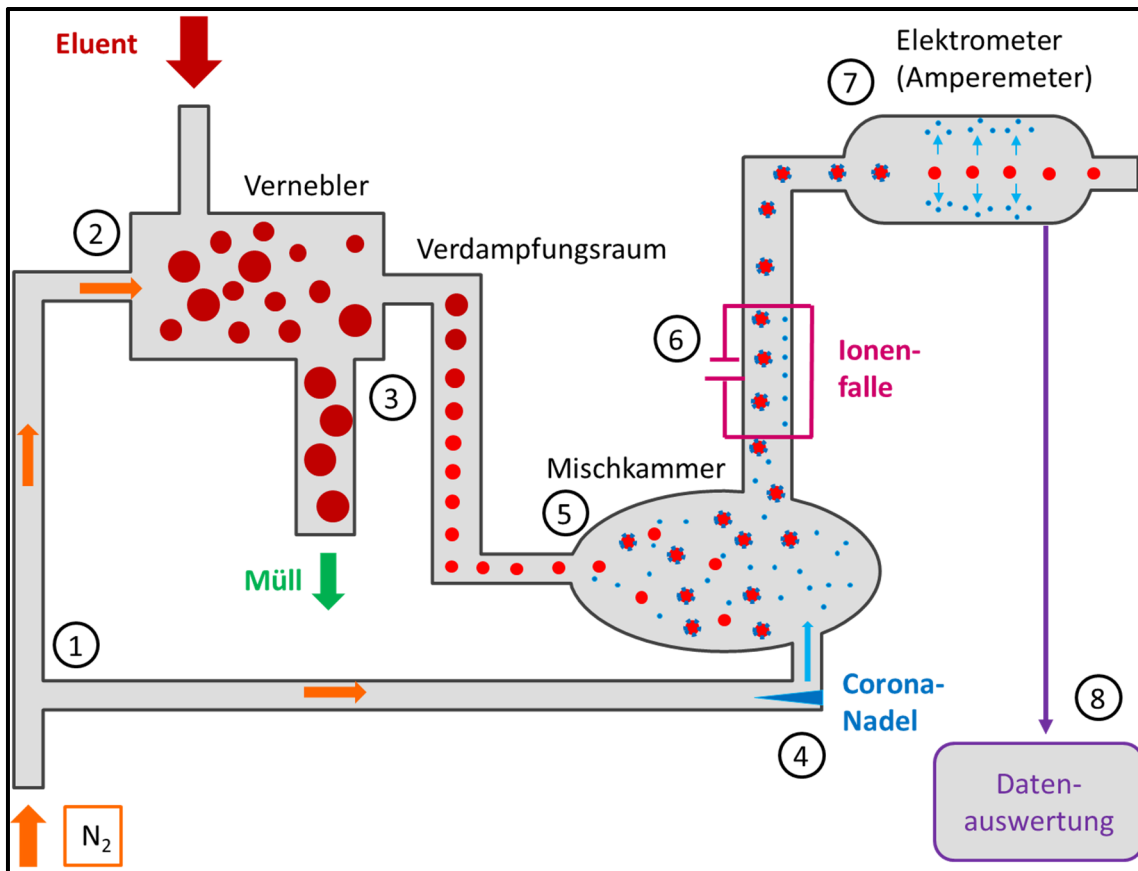


Abb. 1-3: Schematischer Aufbau des Corona® Charged Aerosol Detectors [114].

Die größeren Tröpfchen gelangen nicht in den Verdampfungsraum und werden in das Abfallgefäß abgeleitet, während die kleineren in ein Verdampfungsrohr geleitet werden. Dort werden die Tröpfchen (3) durch Verdampfen des flüchtigen Fließmittels getrocknet. Die festen oder flüssigen Substanzpartikel werden dann in eine Mischkammer (5) geleitet, wo sie mit dem an der Corona-Nadel erzeugten (4), geladenen Stickstoffstrom kollidieren. Dabei wird Ladung an die Partikeloberfläche übertragen. Die geladenen Partikel werden anschließend durch eine Ionenfalle weitergeleitet (6), die kleine, schnell bewegliche Teilchen abziehen kann. So werden die verbliebenen geladenen Stickstoffmoleküle entfernt. Die Partikel gelangen nun in ein Amperemeter (7), an dem eine Saugspannung angelegt ist, sodass die Ladung wieder von der Partikeloberfläche abgesaugt werden kann. Diese erzeugt im Amperemeter ein Signal, das über geeignete Programme ausgewertet wird und als Graph Stromstärke gegen Zeit aufgetragen wird. Die restlichen Partikel werden abgeleitet [114].

1.4.3.2. Anwendung zur Hilfsstoffanalytik

Betrachtet man die in **Abb. 1-4** dargestellte Übersicht der Veröffentlichungen unter Verwendung des CAD, lässt sich ein klarer Bedeutungszuwachs des CAD erkennen. Betrachtet man weiterhin den zunehmenden Anteil an Veröffentlichungen im Bereich der polymeren Hilfsstoffe, so lässt sich die Relevanz des CAD auf diesem Gebiet nicht mehr bestreiten.

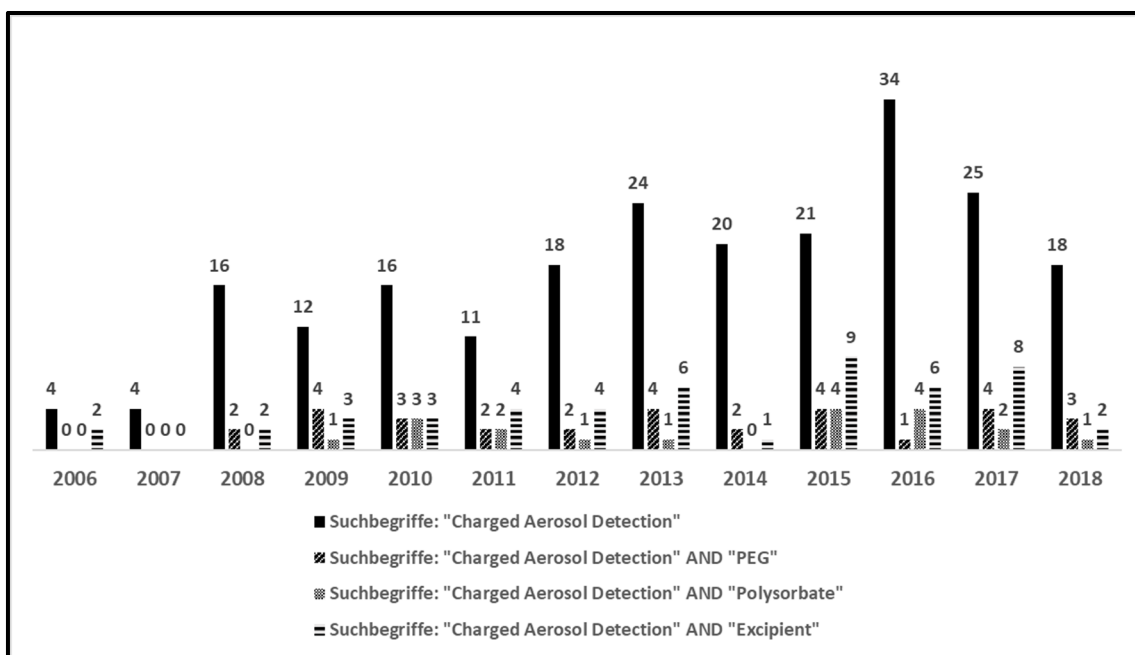


Abb. 1-4: Ergebnisse einer Stichwortsuche nach Publikationsjahr (über ScienceDirect vom 25.04.2018).

So findet der CAD im Bereich der nicht-chromophoren Substanzklassen, neben den vielseitig untersuchten Polysorbaten [123-129], auch bei anderen polymeren Strukturen wie Macrogolen [130-132], Polidocanol [133, 134], sowie anderen nichtionogenen Emulgatoren [135-138], und Naturstoffgemischen wie Fetten und fetten Ölen [139-141], sowie Fettsäuren [142-145] weite und stetig wachsende Anwendung.

Motivation und Ziel der Arbeit

2

2. Motivation und Ziel der Arbeit

Viele der potentiellen neuen Wirkstoffe scheitern bereits vor der klinischen Phase der Zulassungsstudien aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit, da sie unter eine der beiden BCS-Klassifizierungen II (geringe Löslichkeit, hohe Permeabilität) oder IV (geringe Löslichkeit, geringe Permeabilität) fallen [146, 147]. In diesem Zusammenhang steigt die Bedeutung der in Fertigarzneimitteln verwendeten Hilfsstoffe: So dienen diese schon längst nicht mehr als einfache Füllstoffe oder Emulgatoren, sondern ermöglichen eine Löslichkeitsverbesserung, Lösungsstabilisierung komplexerer Formulierungen oder die gezielte, verzögerte Wirkstofffreisetzung [80].

Zu diesem Zwecke kommen vermehrt polymere Substanzen zum Einsatz, wobei sich die Gruppe der Macrogole in den vergangenen Jahren besonders etablierte. So werden immer mehr Makromoleküle wie Peptide oder Proteine mittels PEGylierung modifiziert um beispielsweise eine bessere Löslichkeit oder längere Halbwertszeiten zu erzielen [148-152]. Auch in der „klassischen“ Galenik finden die Macrogole und die davon abgeleitete Substanzklassen wie Polysorbate, Macrogol-Fettsäureester und Macrogol-Fettalkoholether, weiterhin Anwendung (siehe Kapitel 1.1) [80].

In Anbetracht der immer komplexer werdenden Formulierungen ist es unerlässlich, dass eine gleichbleibende Qualität und Zusammensetzung der verwendeten Hilfsstoffe gewährleistet werden kann. Diese wird im *Ph. Eur.* durch eine Reihe empirischer Kenngrößen, den Fettkennzahlen, erfasst, die Aufschluss über die in der Substanz vorhandene Menge bestimmter Strukturmerkmale geben. Jedoch handelt es sich hierbei lediglich um Summenparameter, welche nur bestimmte Sollbereiche wiedergeben, die für Polymere einer deklarierten mittleren molaren Masse erfüllt werden müssen. Außerdem setzen sich diese Methoden, wie in Kapitel 1.2 dargestellt, meist aus einer strikten Abfolge mehrerer Analysenschritte (z. B. vorhergehende Derivatisierung, Rücktitration überschüssiger Reagenzien, etc.) zusammen, die, jeder für sich genommen, bereits mehr oder weniger fehlerbehaftet sind und eine permanente Anwesenheit eines Analytikers erforderlich machen. Jedoch ist eine genaue Erfassung der Größenverteilung der einzelnen Oligomerketten der Macrogole sowie frei vorliegender Bestandteile der Macrogol-basierten Ester und Ether, wie beispielsweise Fettsäuren, durch die alleinige Bestimmung der Fettkennzahlen nicht erreichbar, was das Beispiel der Macrogolstearate verdeutlichen soll. Hier sind bereits innerhalb einer definierten Gruppe verschiedene Herstellungsmethoden zugelassen, wobei die Auswirkung auf den Grad der Polymerisierung und der dazugehörigen Oligomerverteilung bei jeder Herstellungsmethode unterschiedlich ausfallen kann. Des Weiteren können zur Herstellung verschiedene Typen an Stearinsäure (Typ I und Typ II) eingesetzt werden, die das *Ph. Eur.* zwar mit separaten Referenzbereichen der Fettkennzahlen anführt, jedoch lassen diese auch hier keinen genauen Rückschluss zur Oligomerverteilung zu [26]. Hierfür ist es zwingend notwendig, neue und ergänzende Verfahren zu entwickeln.

MOTIVATION UND ZIEL DER ARBEIT

Heutzutage gilt die Flüssigchromatographie als der Goldstandard der pharmazeutischen Analytik. Insbesondere in der Qualitäts- und Reinheitsanalytik haben sich HPLC und UHPLC etabliert und finden mit der Kopplung an UV- und MS-Detektoren weite Anwendung. Jedoch sind viele der pharmazeutisch verwendeten Polymere für diese Detektoren schlecht bis gar nicht zugänglich, da ihnen auf der einen Seite die zur UV-Detektion notwendigen chromophoren Strukturmerkmale fehlen und sie auf der anderen Seite, bedingt durch den polymeren Charakter, zu komplexen und aufwändig auszuwertenden Massenspektren führen. Für eine schnelle Routine-Analytik sind somit UV-Detektoren nicht und MS-Detektoren nur bedingt geeignet.

Unter Berücksichtigung dieser Betrachtungen scheint die Auswahl eines andersartigen Detektors sinnvoll, der weitestgehend strukturunabhängig, und dadurch universell einsetzbar ist. Diese Anforderungen erfüllt die Gruppe der Aerosol-basierten Detektoren, zu denen CAD, ELSD und NQADTM bzw. CNLSD zählen. In zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen hat sich der CAD in den Punkten Robustheit, Sensitivität und bedienerfreundlicher Handhabung den anderen beiden Detektoren als überlegen gezeigt [153-155].

Aufgrund dieser Überlegungen befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Entwicklung einer universellen HPLC-CAD-Methode, die in der Lage ist, ein möglichst breites Spektrum an macrogol-basierten Polymeren, repräsentiert durch die Gruppen der Macrogole, Macrogolfettsäureester, Macrogolfettalkoholether und Polysorbate, sowie deren frei vorliegenden Einzelkomponenten, qualitativ zu erfassen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die genannten Substanzklassen möglichst gleichzeitig, d. h. mit einer universellen Methode, in ihren jeweiligen Einzelkomponenten zu erfassen und mögliche Verunreinigungen (z. B. Abbauprodukte aufgrund von Esterhydrolysen oder Autoxidationen) zu trennen. Diese Methode sollte zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit und zur Vermeidung von Fehlern nach Möglichkeit einfach strukturiert sein, was bedeutet, dass möglichst gängige, kommerziell erhältliche Säulen (z. B. RP-18) verwendet und die Fließmittelherstellung möglichst einfach (z. B. möglichst Komponenten) gehalten werden sollte.

3 Materialien und Methoden

3. Materialien und Methoden

3.1. Hilfsstoffe

Substanz	Interne Bezeichnung	CAS-Nr.	Bezugsquelle
Macrogole (PEGs)			
PEG 300 ($\varnothing M_r = 285 - 315$ g/mol)	PEG 300	25322-68-3	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
PEG 400 ($\varnothing M_r = 380 - 420$ g/mol)	PEG 400	25322-68-3	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
PEG 600 ($\varnothing M_r = 570 - 630$ g/mol)	PEG 600	25322-68-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
PEG 1000 ($\varnothing M_r = 950 - 1050$ g/mol)	PEG 1000	25322-68-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
PEG 1500 ($\varnothing M_r = 1400 - 1600$ g/mol)	PEG 1500	25322-68-3	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
PEG 2000 ($\varnothing M_r = 1800 - 2200$ g/mol)	PEG 2000	25322-68-3	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
PEG 3000 ($\varnothing M_r = 2700 - 3300$ g/mol)	PEG 3000	25322-68-3	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Fettalkohole (FAA)			
1-Dodecanol (Laurylalkohol)	C12 FAA	112-53-8	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
1-Hexadecanol (Cetylalkohol)	C16 FAA	36653-82-4	Cognis GmbH Düsseldorf, Deutschland
Cetylstearylalkohol	C16/ C18 FAA	36553-82-4 und 112-92-5	Caesar & Lorentz GmbH (Caelo) Hilden, Deutschland
Fettsäuren (FA)			
Hexansäure (Capronsäure)	C6 FA	142-62-1	Acros Organics New Jersey, USA
Octansäure (Caprylsäure)	C8 FA	124-07-2	Alfa Aesar GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Decansäure (Caprinsäure)	C10 FA	334-48-5	Alfa Aesar GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland

MATERIALIEN UND METHODEN

Substanz	Interne Bezeichnung	CAS-Nr.	Bezugsquelle
Dodecansäure (Laurinsäure)	C12 FA	143-07-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Tetradecansäure (Myristinsäure)	C14 FA	544-63-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Hexadecansäure (Palmitinsäure)	C16 FA	57-10-3	Fluka Analytical; Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Heptadecansäure (Margarinsäure)	C17 FA	506-12-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Octadecansäure (Stearinsäure)	C18 FA	57-11-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Octadecansäure (Stearinsäure)	C18 FA (Typ 1)	57-11-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
(9Z)-Octadec-9-ensäure (Ölsäure)	C18:1 FA „alt“	112-80-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
(9Z,12Z)-Octadeca-9,12- diensäure (Linolsäure)	C18:2 FA „alt“	60-33-3	Fluka Analytical; Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
(9Z)-Octadec-9-ensäure (Ölsäure)	C18:1 FA	112-80-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
(9Z,12Z)-Octadeca-9,12- diensäure (Linolsäure)	C18:2 FA	60-33-3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Polyalkylenglycoether (Fettalkoholethoxylate; FAEO)			
Brij® 30	Brij® 30	9002-92-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Brij® 52	Brij® 52	9004-95-9	Croda Europe Ltd. Snaith, Yorkshire, United Kingdom
Brij® 72	Brij® 72	9005-00-9	ICI Surfactants Wilton, Middlesbrough, Cleveland, UK
Brij® C10	Brij® C10	9004-95-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Brij® S20	Brij® S20	9005-00-9	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland

MATERIALIEN UND METHODEN

Substanz	Interne Bezeichnung	CAS-Nr.	Bezugsquelle
Brij® O20	Brij® O20	9004-98-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Polidocanol	Thesit®	3055-99-0	Fagron GmbH & Co. KG Barsbüttel, Deutschland
Polyethylenglycolfettsäureester			
Cremophor® RH40	RH40	61788-85-0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Myrj® 45	Myrj® 45	9004-99-3	Croda Europe Ltd. Snaith, Yorkshire, United Kingdom
Myrj® 52	Myrj® 52	9004-99-3	Croda Europe Ltd. Snaith, Yorkshire, United Kingdom
Myrj® 59	Myrj® 59	9004-99-3	Croda Europe Ltd. Snaith, Yorkshire, United Kingdom
Polysorbate			
Tween® 20	Tween® 20	9005-64-5	Croda France Chocques, Frankreich
Tween® 80	Tween® 80	9005-65-6	Croda France Chocques, Frankreich

3.2. Lösungsmittel und Chemikalien

Substanz	Reinheit und Qualität	CAS-Nr.	Bezugsquelle
Millipore-Wasser	>18.2 MΩ (erzeugt durch ein Merck Milli-Q Synthesis System)	n/a	Merck Millipore Schwalbach, Deutschland
Acetonitril (J.Baker)	Gradient Grade	75-05-8	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Acetonitril (for HPLC)	Gradient Grade, ≥99.9 %	75-05-8	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Methanol (HiPerSolv Chromanorm®)	Gradient Grade; Evaporation Residue < 1 ppm	67-56-1	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure (50 % in Wasser)	puriss. Pa. for HPLC; 49 – 51 % (T)	64-18-6	Fluka Analytical; Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Trifluoressigsäure (Chromosolv® for HPLC)	≥99,9 %	76-05-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid 35 %		7722-84-1	BASF Ludwigshafen, Deutschland

3.3. Chromatographische Säulen

Bezeichnung	Hersteller	Dimensionen
XTerra® RP ₁₈	Waters Corporation Milford, MA, USA	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 250 x 4.6 mm ➤ 5 µm Partikelgröße ➤ sphärische Partikel ➤ 125 Å Porengröße ➤ 15 % Kohlenstoff
YMC-Pack Pro C18	YMC Europe GmbH Dinslaken, Deutschland	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 150 x 4.0 mm; ➤ 3 µm Partikelgröße ➤ sphärische Partikel (S-3 µm) ➤ 12 nm (120 Å) Porengröße ➤ 16 % Kohlenstoff

MATERIALIEN UND METHODEN

3.4. Geräte

Art	Modell	Modell-Nr. bzw. -typ	Hersteller
LC-CAD-System			
Vakuum-Entgaser	Agilent 1100 Series	G1379A	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Binäre Pumpe	Agilent 1100 Series	G1312A	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Autosampler mit Rheodyne 6-Wege- Ventil	Agilent 1100 Series	G1313A	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Säulenthermostat	Agilent 1200 Series	G1316A	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Diodenarray-Detektor	Agilent 1100 Series	G1315B	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Stickstoffgenerator	ESA Nitrogen Generator	N2-4000- L1252	ESA Biosciences Inc. Chelmsford, USA
Charged Aerosol Detektor	ESA Corona CAD	70-9116	Dionex Softron GmbH Courtaboeuf, Frankreich
LC-MS-System			
Vakuum-Entgaser	Agilent 1200 Series	G1379B	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Binäre Pumpe	Agilent 1100 Series	G1312A	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Autosampler mit Rheodyne 6-Wege- Ventil	Agilent 1100 Series	G1329A	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Autosampler- thermostat	Agilent 1100 Series	G1330B	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Säulenthermostat	Agilent 1200 Series	G1316A	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Diodenarray-Detektor	Agilent 1100 Series	G1315B	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
LC/MSD-Ionenfalle	Agilent 1100 Series	G2445D	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland

MATERIALIEN UND METHODEN

Art	Modell	Modell-Nr. bzw. -typ	Hersteller
Software zur Datenaufnahme und -auswertung	Agilent ChemStation® Software	Rev. B.03.02	Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland
Waagen			
Präzisionswaage	Sartorius CPA225D-OCE		Sartorius Weighing Technology GmbH Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage	Mettler Toledo AB104-S/PH		Mettler Toledo GmbH Gießen, Deutschland
Pipetten			
Eppendorf-Pipette	Research	10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Pipette	Reference	0,5 – 10 µl 50 – 200 µl 100 – 1000 µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Sonstiges			
Vortex	Vortex Genie 2	G560E	Scientific Industries Inc.; Bohemia, New York, USA
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex	RK156	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus	B6030	Heraeus Hanau, Deutschland

MATERIALIEN UND METHODEN

3.5. Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Transferpipetten (Glas)	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Transferpipetten (PE)	Brand Darmstadt, Deutschland Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH Würzburg, Deutschland
Einmalspritzen „Tuberkulin“ (1 ml) und „Luer“ (2 ml)	Henke-Sass, Wolf GmbH Tuttlingen, Deutschland
Einmalspritzen „Terumo® Syringe (5 ml)	Terumo Deutschland GmbH Eschborn, Deutschland
Einmalkanülen „Sterican®“ (0.90 x 70 mm)	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalkanülen „BD Microlance™ 3“ (0,90x40 mm)	Becton Dickinson S. A. Fraga (Huesca), Spanien
Pipettenspitzen (0.5 – 10 µl)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 – 200 µl)	Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen (100 – 1000 µl)	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Gläschen mit Schnappdeckel (PE), 7 ml	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße, 2 ml (Micro-Centrifuge Tubes)	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
HPLC-Braunglasvials (1,5 ml)	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland
Deckel für HPLC-Vials (9 mm; PTFE)	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland Agilent Technologies GmbH Waldbronn, Deutschland

3.6. Übersicht der zur Methodenentwicklung und Validierung verwendeten Probenlösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen, sowie für alle weiteren Verdünnungsschritte wurden ausschließlich Lösungsmittel von hoher Reinheit wie MilliPore®-Wasser, Acetonitril (mind. HPLC-Qualität, wenn möglich MS-Qualität) und Methanol (mind. HPLC-Qualität, wenn möglich MS-Qualität) verwendet. Zusätze wie Trifluoressigsäure (TFA) und Ameisensäure (AS) waren ebenfalls mindestens von HPLC-Qualität.

Probelösungen ME01

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen PEGs wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml Wasser gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen mit Wasser zu 10.0 ml aufgefüllt (= 1:100-Verdünnung). Für die „Mix“-Proben wurden 100 µl der jeweiligen Stammlösungen gemischt und mit Wasser zu 10.0 ml aufgefüllt.

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
PEG 300	Wasser	127.2
PEG 400	Wasser	100.7
PEG 600	Wasser	110.9
PEG 1000	Wasser	104.0
Mix 300 + 400	Wasser	127.2 + 100.7
Mix 300 + 1000	Wasser	127.2 + 104.0
Mix 600 + 1000	Wasser	110.9 + 104.0
„Mix all“ (PEG 300 + 400 + 600 + 1000)	Wasser	127.2 + 100.7 + 110.9 + 104.0

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME02

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen PEGs wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml eines Gemisches aus Wasser und ACN (90:10) gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen mit dem Lösungsmittelgemisch zu 10.0 ml aufgefüllt (= 1:100-Verdünnung). Die konzentriertere Probe „PEG 3000 (conc.)“ wurde durch 1:10-Verdünnung, d. h. 1000 µl in 10.0 ml, hergestellt. Für die „Mix“-Proben wurden 100 µl der jeweiligen Stammlösungen gemischt und mit dem Lösungsmittelgemisch zu 10.0 ml aufgefüllt.

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Fettsäuren bzw. -alkohole wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 10 µl der Stammlösungen mit dem Lösungsmittelgemisch (Wasser : ACN; 90:10) zu 10.0 ml aufgefüllt (= 1:1000-Verdünnung).

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
PEG 300	Wasser : ACN (90 : 10)	100.32
PEG 400	Wasser : ACN (90 : 10)	102.40
PEG 600	Wasser : ACN (90 : 10)	106.60
PEG 1000	Wasser : ACN 90 : 10	99.90
PEG 1500	Wasser : ACN (90 : 10)	103.76
PEG 3000 (dil.)	Wasser : ACN (90 : 10)	102.23
PEG 3000 (conc.)	Wasser : ACN (90 : 10)	1022.3
Mix 300 + 1000 + 1500	Wasser : ACN (90 : 10)	100.32 + 99.90 + 102.23
Mix 300 + 1000 + 3000	Wasser : ACN (90 : 10)	100.32 + 99.90 + 102.23
C12 FA	MeOH; Wasser : ACN (90 : 10)	10.78
C16 FA	MeOH; Wasser : ACN (90 : 10)	10.38
C17 FA	MeOH; Wasser : ACN (90 : 10)	10.38
C18 FA	MeOH; Wasser : ACN (90 : 10)	10.39
C16 FAA	MeOH; Wasser : ACN (90 : 10)	10.373

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME03

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Fettsäuren bzw. -alkohole wurden eingewogen und in jeweils 100.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 1000 µl der Stammlösungen mit MeOH zu 10.0 ml aufgefüllt (= 1:10-Verdünnung). Die Probe „C12 FA (conc.)“ entspricht der Stammlösung.

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
C12 FA (dil.)	MeOH	10.64
C12 FA (conc.)	MeOH	106.4
C16 FA	MeOH	10.04
C17 FA	MeOH	10.56
C18 FA	MeOH	10.30
C16 FAA	MeOH	10.98

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME04

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen PEGs wurden eingewogen und in jeweils 100.0 ml Wasser gelöst (= Stammlösungen). Je 100 µl dieser Stammlösungen wurden jeweils in 900 µl Wasser gelöst (= 1:10-Verdünnung).

Jeweils ca. 10 mg der einzelnen Fettsäuren bzw. -alkohole wurden eingewogen und in jeweils 10 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Je 100 µl dieser Stammlösungen wurden jeweils in 900 µl MeOH gelöst (= 1:10-Verdünnung).

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Emulgatoren wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Je 10 µl dieser Stammlösungen wurden jeweils in 990 µl MeOH gelöst (= 1:100-Verdünnung).

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
PEG 300	Wasser	113.40
PEG 400	Wasser	106.62
PEG 600	Wasser	112.6
PEG 1000	Wasser	99.4
PEG 1500	Wasser	103.5
PEG 2000	Wasser	108.8
PEG 3000	Wasser	105.5
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
C12 FA	MeOH	107.4
C16 FA	MeOH	115.5
C17 FA	MeOH	93.5
C18 FA (Typ I)	MeOH	100.2
C16 FAA	MeOH	105.5
C16/C18 FAA	MeOH	102.5
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
Thesit®	MeOH	98.94
Cremophor® RH40	MeOH	115.13
Myrj® 45	MeOH	114.96
Myrj® 52	MeOH	95.74
Myrj® 59	MeOH	100.34

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME05

Jeweils ca. 100 mg von Myrj[®] 59 wurden eingewogen und in 1.0 ml des jeweiligen betrachteten Lösungsmittels bzw. -gemisches gelöst (= Stammlösungen). Die Stammlösungen wurden, sofern sich die Substanz gelöst hat, direkt vermessen. Für die beiden konzentrierten Proben „Myrj[®] 59 (conc.)“ wurden etwa jeweils 300 mg eingewogen und in jeweils 1.0 ml des jeweiligen Lösungsmittels gelöst.

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [mg/ml]
Myrj [®] 59	Wasser	110.26
Myrj [®] 59	ACN	106.83
Myrj [®] 59	Wasser : ACN (1 : 1)	103.38
Myrj [®] 59	MeOH	99.46
Myrj [®] 59	Wasser : MeOH (1 : 1)	102.59
Myrj [®] 59	MeOH : ACN (1 : 1)	96.63
Myrj [®] 59	ACN + 0.1 % TFA	108.76
Myrj [®] 59	Wasser + 0.1 % TFA	104.22
Myrj [®] 59	Wasser + 0.1 % AS ⁵ (= mob. Phase A)	104.04
Myrj [®] 59	ACN + 0.1 % AS (= mob. Phase B)	98.88
Myrj [®] 59 (conc.)	ACN	312.39
Myrj [®] 59 (conc.)	ACN + 0.1 % AS	303.08
Myrj [®] 59	mob. Phase A : mob. Phase B (1:1)	96.27
Myrj [®] 59	mob. Phase A : mob. Phase B (90:10)	97.77
Myrj [®] 59	mob. Phase A : mob. Phase B (10:90)	118.13

⁵ AS = Ameisensäure

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME06

Zur Herstellung der ungestressten Proben wurden jeweils ca. 50 mg Substanz eingewogen und in jeweils 10.0 ml Wasser gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 10 µl der Stammlösungen in jeweils 990 µl Wasser gelöst (= 1:100-Verdünnung).

Zur Herstellung der gestressten Proben wurden jeweils ca. 100 mg Substanz eingewogen, in jeweils 10.0 ml Wasser gelöst (= Stammlösungen) und 3 h im Ultraschallbad gestresst. Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen in jeweils 900 µl Wasser gelöst (= 1:10-Verdünnung).

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
Tween® 20	Wasser	52.7
Tween® 20 (Stress)	Wasser	102.6
Tween® 80	Wasser	55.0
Tween® 80 (Stress)	Wasser	112.9

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME07

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Fettsäuren- bzw. -alkohole wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen in jeweils 900 µl MeOH gelöst (= 1:10-Verdünnung). Die Fettsäuren C6 und C8 wurden zusätzlich direkt aus den Stammlösungen (= conc.) vermessen.

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
C6 FA	MeOH	995.7
C6 FA (conc.)	MeOH	9957.0
C8 FA	MeOH	1052.5
C8 FA (conc.)	MeOH	10525.0
C10 FA	MeOH	967.0
C12 FA	MeOH	1104.0
C14 FA	MeOH	1004.0
C16 FA	MeOH	1087.0
C17 FA	MeOH	1147.0
C18 FA (Typ II)	MeOH	1136.0
C18:1 FA	MeOH	1043.5
C18:2 FA	MeOH	998.3
C12 FAA	MeOH	1204.0
C16 FAA	MeOH	1072.0
C16/18 FAA	MeOH	1069.0

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME08

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Fettsäuren wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden 971 µl dieser Stammlösungen in je ein Vial überführt und mit 29 µl einer 35 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt (entspricht einer finalen Konzentration von 1 % H₂O₂). Analog wurde mit dem Blank verfahren (971 µl MeOH + 29 µl H₂O₂).

Diese Lösungen wurden im Abstand von 6 h über einen Zeitraum von 0 – 72 h und später noch in größeren Zeitabständen (t = 144 h; 168 h; 192 h und 264 h) vermessen.

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
C18:1 FA (Stress)	MeOH	1043.5
C18:2 FA (Stress)	MeOH	998.3
Blank	MeOH	-

Probelösungen ME09

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Alkoholethoxylate wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen in jeweils 900 µl MeOH gelöst (= 1:10-Verdünnung).

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
Brij® C10	MeOH	94.2
Brij® S20	MeOH	144.8
Brij® O20	MeOH	98.8
Brij® 30	MeOH	126.0
Brij® 52	MeOH	95.6
Brij® 72	MeOH	100.0

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME10

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen PEGs wurden eingewogen und in jeweils 100.0 ml Wasser gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen in jeweils 900 µl Wasser gelöst (= 1:10-Verdünnung).

Jeweils ca. 10 mg der einzelnen Fettsäuren bzw. -alkohole, die als Feststoffe vorliegen, wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen in jeweils 900 µl MeOH gelöst (= 1:10-Verdünnung). Jeweils ca. 100 mg der flüssig vorliegenden Substanzen (C18:1 FA, C18:2 FA) wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 10 µl der Stammlösungen in jeweils 990 µl MeOH gelöst (= 1:100-Verdünnung). Für die „Mix“-Proben wurden je 100 µl (C12, C16, C17, C18 FA; C16, C16/C18 FAA) bzw. 10 µl (C18:1, C18:2 FA) der jeweiligen Stammlösungen gemischt und in 380 µl MeOH gelöst (Gesamtvolumen = 1 ml).

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Substanzen wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen in jeweils 900 µl Wasser gelöst (= 1:10-Verdünnung). Von Myrj® 59 wurden 98.88 mg eingewogen und in 10.0 ml ACN + 0.1 % Ameisensäure (mobile Phase B) gelöst (= Stammlösung). Anschließend wurden 200 µl dieser Stammlösung in 800 µl mobile Phase B gelöst (= 1:5-Verdünnung).

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
PEG 300	Wasser	113.40
PEG 400	Wasser	106.62
PEG 600	Wasser	112.6
PEG 1000	Wasser	99.4
PEG 1500	Wasser	103.5
PEG 2000	Wasser	108.8
PEG 3000	Wasser	105.5
<hr/>		
C12 FA	MeOH	110.4
C16 FA	MeOH	108.7
C17 FA	MeOH	114.7
C18 FA (Typ II)	MeOH	113.6
C18:1	MeOH	104.35
C18:2	MeOH	99.83
C16 FAA	MeOH	107.2

MATERIALIEN UND METHODEN

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
C16/C18 FAA	MeOH	106.9
Mix FA + FAA	MeOH	110.4 + 108.7 + 114.7 + 113.6 + 104.35 + 99.83 + 107.2 + 106.9
<hr/>		
Brij [®] C10	MeOH	942
Brij [®] S20	MeOH	1448
Brij [®] O20	MeOH	988
Brij [®] 30	MeOH	1260
Brij [®] 52	MeOH	956
Brij [®] 72	MeOH	1000
Thesit [®]	MeOH	989.4
Cremophor [®] RH40	MeOH	1151.3
Myrj [®] 45	MeOH	1149.6
Myrj [®] 52	MeOH	957.4
Myrj [®] 59	ACN + 0.1 % AS (mob. Phase B)	19 776
Tween [®] 20	MeOH	1026
Tween [®] 80	MeOH	1129

Probelösungen ME11

Jeweils ca. 100 mg Substanz wurden in 10.0 ml des jeweiligen Lösungsmittels (Cremophor[®] RH40 in MeOH, PEG 1000 in Wasser) gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 μl der Stammlösungen in jeweils 900 μl des jeweiligen Lösungsmittels gelöst (= 1:10-Verdünnung).

Für die gemischte Probe wurden jeweils 100 μl der jeweiligen Stammlösungen gemischt und in 800 μl MeOH gelöst (Gesamtvolumen = 1 ml).

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Cremophor [®] RH40	MeOH	983.1
Cremophor [®] RH40 + PEG 1000	MeOH, Wasser	983.1 + 1110.1

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen ME12

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Fettsäuren wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösung). Von diesen Stammlösungen wurden je 900 µl mit 100 µl 35 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt (finale Konzentration 3.5 % H₂O₂) und in definierten Zeitabständen vermessen.

In einem weiteren Stresstest wurden ebenfalls 900 µl der Stammlösungen mit 100 µl H₂O₂ versetzt und über einen Zeitraum von 24 h bei 60 °C inkubiert.

In einem dritten Stabilitätsansatz wurden die Stammlösungen (ohne Zusatz) in einem Rundgläschen mit Schnappdeckelverschluss bei Raumtemperatur auf der Laborbank über einen Zeitraum von 66 Tagen (LCMS_004, Bedingungen 1) bzw. 190 Tagen (LCMS_004, Bedingungen 2) gelagert. Vor der Messung wurde die Probe analog zu den anderen Proben mit 100 µl Wasser verdünnt.

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
C18:1 FA (3.5 % H ₂ O ₂)	MeOH	89.21
C18:2 FA (3.5 % H ₂ O ₂)	MeOH	91.67
Blank (3.5 % H ₂ O ₂)	MeOH	-
C18:1 FA (3.5 % H ₂ O ₂ + 60°C)	MeOH	89.21
C18:2 FA (3.5 % H ₂ O ₂ + 60°C)	MeOH	91.67
Blank (3.5 % H ₂ O ₂ + 60°C)	MeOH	-
C18:1 FA ("Bench")	MeOH	89.21
C18:2 FA ("Bench")	MeOH	91.67

MATERIALIEN UND METHODEN

Probelösungen Val01

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen PEGs wurden eingewogen und in jeweils 100.0 ml Wasser gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 100 µl der Stammlösungen in jeweils 900 µl Wasser gelöst (= 1:10-Verdünnung).

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Fettsäuren bzw. -alkohole wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 10 µl der Stammlösungen in jeweils 990 µl MeOH gelöst (= 1:100-Verdünnung). Von C14 FA wurden 11.03 mg eingewogen, in 10.0 ml MeOH gelöst (= Stammlösung) und entsprechend 1:10 mit MeOH verdünnt (100 µl Stammlösung + 900 µl MeOH). Für die „Mix“-Probe wurden je 10 µl bzw. 100 µl (C14 FA) der jeweiligen Stammlösungen gemischt und in 820 µl MeOH gelöst (Gesamtvolumen = 1 ml).

Jeweils ca. 100 mg der einzelnen Hilfsstoffe wurden eingewogen und in jeweils 10.0 ml des entsprechenden Lösungsmittels gelöst (= Stammlösungen). Anschließend wurden je 10 µl der Stammlösungen in jeweils 990 µl des jeweiligen Lösungsmittels gelöst (= 1:100-Verdünnung).

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [µg/ml]
PEG 300	Wasser	96.01
PEG 400	Wasser	104.24
PEG 600	Wasser	102.73
PEG 1000	Wasser	111.01
PEG 1500	Wasser	96.27
PEG 2000	Wasser	98.20
PEG 3000	Wasser	101.14
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
C12 FA	MeOH	101.31
C14 FA	MeOH	110.30
C16 FA	MeOH	111.25
C17 FA	MeOH	98.21
C18 FA (Typ II)	MeOH	100.15
C18:1	MeOH	106.30
C18:2	MeOH	99.80
C16 FAA	MeOH	97.71
C16/C18 FAA	MeOH	98.62

MATERIALIEN UND METHODEN

Substanz	Lösungsmittel	Zielkonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
Mix FA + FAA	MeOH	101.31 + 110.30 + 111.25 + 98.21 + 100.15 + 106.30 + 99.80 + 97.71 + 98.62
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
Brij® C10	MeOH	104.46
Brij® S20	MeOH	95.74
Brij® O20	MeOH	108.79
Brij® 30	MeOH	107.41
Brij® 52	MeOH	107.59
Brij® 72	MeOH	106.12
Thesit®	MeOH	105.42
Cremophor® RH40	MeOH	98.31
Myrj® 45	MeOH	100.66
Myrj® 52	MeOH	101.03
Myrj® 59	ACN + 0.1 % AS (mob. Phase B)	94.55
Tween® 20 (Polysorbat 20)	MeOH	97.98
Tween® 80 (Polysorbat 80)	MeOH	109.05

3.7. Methoden

Im Folgenden werden ausschließlich die für die Methodenentwicklung ausschlaggebenden Methoden genannt. Eine Übersicht sämtlicher Methoden, die zur Methodenentwicklung beigetragen haben, findet sich im Anhang (Kapitel 8.4) in den Tabellen **Tab. 8-1** bis **Tab. 8-6**. Der konkrete Verlauf der Methodenentwicklung wird in Kapitel 4 erörtert. Bei sämtlichen Methoden wurde die Säulentemperatur nicht kontrolliert (Raumtemperatur).

Für alle Messungen am CAD wurden folgende Einstellungen verwendet:

Druck des zugeführten Stickstoffs (N_2 -Inlet):	35 \pm 0.1 psi
Filtereinstellung:	"none"
Messbereich:	100 pA

MATERIALIEN UND METHODEN

3.7.1. Methoden zur Trennung der hydrophilen Komponenten (PEGs) mittels HPLC-CAD

XTerra_MeOH_000		
Säule:	Waters XTerra® RP-18, 5 µm, 250 x 4.6 mm	
Lösungsmittel:	Wasser (MilliPore®), MeOH	
Flussrate:	0.5 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	MeOH [%]
	0	30
	50	50
	55	30
	65	30
Detektion	CAD	
Probelösungen:	ME01	

XTerra_MeOH_003		
Säule:	Waters XTerra® RP-18, 5 µm, 250 x 4.6 mm	
Lösungsmittel:	Wasser (MilliPore®), MeOH	
Flussrate:	0.5 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	MeOH [%]
	0	10
	50	50
	55	50
	60	10
	70	10
Detektion:	CAD	
Probelösungen:	ME01	

MATERIALIEN UND METHODEN

XTerra_MeOH_010		
Säule:	Waters XTerra® RP-18, 5 µm, 250 x 4.6 mm	
Lösungsmittel:	Wasser (MilliPore®), MeOH	
Flussrate:	0.5 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	MeOH [%]
	0	5
	5	10
	30	40
	45	50
	55	50
	60	5
	70	5
Detektion	CAD	
Probelösungen:	ME01	

XTerra_ACN_000		
Säule:	Waters XTerra® RP-18, 5 µm, 250 x 4.6 mm	
Lösungsmittel:	Wasser (MilliPore®), ACN	
Flussrate:	1.0 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	ACN [%]
	0	10
	25	50
	30	10
	40	10
Detektion	CAD	
Probelösungen:	ME01	

MATERIALIEN UND METHODEN

XTerra_ACN_003		
Säule:	Waters XTerra® RP-18, 5 µm, 250 x 4.6 mm	
Lösungsmittel:	Wasser (MilliPore®), ACN	
Flussrate:	1.0 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	ACN [%]
	0	10
	15	25
	20	25
	30	40
	40	50
	45	50
	50	10
60	10	
Detektion	CAD	
Probelösungen:	ME01	

YMC_009		
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm	
Lösungsmittel:	Wasser (MilliPore®), ACN	
Flussrate:	0.5 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	ACN [%]
	0	10
	2	10
	25	30
	30	30
	35	40
	40	10
	45	10
Detektion und	UV (DAD)	
Detektoreinstellungen (1):	210 – 360 nm	
Detektion (2):	CAD	
Probelösungen:	ME01	

MATERIALIEN UND METHODEN

YMC_012

Säule: YMC-Pack Pro C18, S-3 μm , 12 nm, 150 x 4.0 mm

Lösungsmittel: Wasser (MilliPore®), ACN

Flussrate: 0.5 ml/min

Injektionsvolumen: 10 μl

Gradientenbedingungen:

t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
40	10
45	10

Detektion und UV (DAD)

Detektoreinstellungen (1): 210 - 360 nm

Detektion (2): CAD

Probelösungen: ME01, ME02

YMC_012_M006f

Säule: YMC-Pack Pro C18, S-3 μm , 12 nm, 150 x 4.0 mm

Lösungsmittel: Wasser (MilliPore®), ACN

Flussrate: 1.0 ml/min

Injektionsvolumen: 10 μl

Gradientenbedingungen:

t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
40	10
42.5	10

Detektion CAD

Probelösungen: ME02

3.7.2. Methoden zur Trennung der lipophilen Komponenten (FAA und FA) mittels HPLC-CAD

FA_YMC_004	
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm
Lösungsmittel:	Wasser (MilliPore®), ACN
Flussrate:	1.0 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Gradientenbedingungen:	isokratisch; 10 % ACN
Detektion	CAD
Probelösungen:	ME02

3.7.3. Kombinierte Methoden zur Charakterisierung der Macrogl-basierten Derivate mittels HPLC-CAD

YMC_D003		
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm	
mobile Phase A:	Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure	
mobile Phase B:	ACN + 0.1 % Ameisensäure	
Flussrate:	1.0 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	B [%]
	0	10
	1	10
	6	15
	7.5	15
	17.5	30
	27.5	32.5
	35	32.5
	45	85
	85	85
	100	10
	105	10
Detektion	CAD	
Probelösungen:	ME04; ME05; ME06; ME07; ME08; ME09	

MATERIALIEN UND METHODEN

YMC_D003_Low		
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm	
mobile Phase A:	Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure	
mobile Phase B:	ACN + 0.1 % Ameisensäure	
Flussrate:	1.0 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	B [%]
	0	10
	1	10
	6	15
	7.5	15
	17.5	30
	20	30
	25	85
	45	85
	55	10
	60	10
Detektion	CAD	
Probelösungen:	ME04	

YMC_D003_High		
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm	
mobile Phase A:	Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure	
mobile Phase B:	ACN + 0.1 % Ameisensäure	
Flussrate:	1.0 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	B [%]
	0	10
	10	30
	20	32.5
	27.5	32.5
	37.5	85
	77.5	85
	85	10
	90	10
Detektion	CAD	
Probelösungen:	ME04	

MATERIALIEN UND METHODEN

YMC_D003_final		
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm	
mobile Phase A:	Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure	
mobile Phase B:	ACN + 0.1 % Ameisensäure	
Flussrate:	1.0 ml/min	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Gradientenbedingungen:	t [min]	B [%]
	0	10
	1	10
	6	15
	7.5	15
	17.5	30
	27.5	32.5
	35	32.5
	45	75
	50	80
	70	85
	105	85
	115	10
	120	10
Detektion und	UV	
Detektoreinstellungen (1):	210 nm (nur für Stabilitätsuntersuchungen)	
Detektion (2):	CAD	
Probelösungen:	ME04; ME10; ME11; ME12	
	Val01	

MATERIALIEN UND METHODEN

3.7.4. HPLC-MS-Methoden

LCMS_001		
(Methodenverifizierung YMC_009)		
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm	
mobile Phase A:	Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure	
mobile Phase B:	ACN + 0.1 % Ameisensäure	
Flussrate:	0.5 ml/min	
Gradientenbedingungen:	t [min]	B [%]
	0	10
	2	10
	25	30
	30	30
	35	40
	40	10
	45	10
Detektion und	Ionenfalle	
Detektoreinstellungen:	Bedingungen 1	Bedingungen 2
	Vernebler (<i>Nebulizer</i>)	50.0 psi
	Trocknungsgasstrom (<i>Drying Gas</i>)	10 l/min
	Stabilität (<i>Stability</i>)	100 %
	Trocknungstemperatur (<i>Drying temperature</i>)	350 °C
	Ionisierung (<i>ionization</i>)	Positivmodus
	ICC (<i>Ion charge control</i>)	Positivmodus
	Ziel (<i>Target</i>)	100 000
	max. Bestimmungszeit für das Hintergrund- signal (<i>Max.</i> <i>Accumulation time</i>)	200.00 ms
	Scanbereich (<i>Scan</i>)	100 bis 600
	mittlere Spektren- anzahl (<i>Average</i>)	7
Zielmassen (<i>target masses</i>)	Substanz	Injektions- volumen [µl]
		Zielmasse (<i>target mass</i>)
	PEG 300	1 und 3
	PEG 400	1 und 3
	PEG 600	1 und 3
	PEG 1000	2
	PEG 1500	2
Probelösungen:	ME04	

MATERIALIEN UND METHODEN

LCMS_002																						
(Methodenverifizierung YMC_012)																						
Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm																					
mobile Phase A:	Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure																					
mobile Phase B:	ACN + 0.1 % Ameisensäure																					
Flussrate:	1.0 ml/min																					
Gradientenbedingungen:	<table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="padding: 5px;">t [min]</th> <th style="padding: 5px;">B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center; padding: 5px;">0</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">10</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 5px;">1</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">10</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 5px;">6</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">15</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 5px;">7.5</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">15</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 5px;">17.5</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">30</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 5px;">20</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">10</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 5px;">22.5</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">10</td></tr> </tbody> </table>		t [min]	B [%]	0	10	1	10	6	15	7.5	15	17.5	30	20	10	22.5	10				
t [min]	B [%]																					
0	10																					
1	10																					
6	15																					
7.5	15																					
17.5	30																					
20	10																					
22.5	10																					
Detektion und	Ionenfalle																					
Detektoreinstellungen:	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="padding: 5px;">Vernebler (<i>Nebulizer</i>)</td><td style="padding: 5px;">30.0 psi</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Trocknungsgasstrom (<i>Drying Gas</i>)</td><td style="padding: 5px;">8 l/min</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Stabilität (<i>Stability</i>)</td><td style="padding: 5px;">20 %</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Trocknungstemperatur (<i>Drying temperature</i>)</td><td style="padding: 5px;">350 °C</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Ionisierung (<i>ionization</i>)</td><td style="padding: 5px;">Positivmodus</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">ICC (<i>Ion charge control</i>)</td><td style="padding: 5px;"></td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Ziel (<i>Target</i>)</td><td style="padding: 5px;">100 000</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">max. Bestimmungszeit für das Hintergrund- signal (<i>Max. Accumulation time</i>)</td><td style="padding: 5px;">200.00 ms</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">Scanbereich (<i>Scan</i>)</td><td style="padding: 5px;">100 bis 1200 (300, 400, 600) 500 bis 1600 (1000) 950 bis 2050 (1500)</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">mittlere Spektren- anzahl (<i>Average</i>)</td><td style="padding: 5px;">7</td></tr> </table>		Vernebler (<i>Nebulizer</i>)	30.0 psi	Trocknungsgasstrom (<i>Drying Gas</i>)	8 l/min	Stabilität (<i>Stability</i>)	20 %	Trocknungstemperatur (<i>Drying temperature</i>)	350 °C	Ionisierung (<i>ionization</i>)	Positivmodus	ICC (<i>Ion charge control</i>)		Ziel (<i>Target</i>)	100 000	max. Bestimmungszeit für das Hintergrund- signal (<i>Max. Accumulation time</i>)	200.00 ms	Scanbereich (<i>Scan</i>)	100 bis 1200 (300, 400, 600) 500 bis 1600 (1000) 950 bis 2050 (1500)	mittlere Spektren- anzahl (<i>Average</i>)	7
Vernebler (<i>Nebulizer</i>)	30.0 psi																					
Trocknungsgasstrom (<i>Drying Gas</i>)	8 l/min																					
Stabilität (<i>Stability</i>)	20 %																					
Trocknungstemperatur (<i>Drying temperature</i>)	350 °C																					
Ionisierung (<i>ionization</i>)	Positivmodus																					
ICC (<i>Ion charge control</i>)																						
Ziel (<i>Target</i>)	100 000																					
max. Bestimmungszeit für das Hintergrund- signal (<i>Max. Accumulation time</i>)	200.00 ms																					
Scanbereich (<i>Scan</i>)	100 bis 1200 (300, 400, 600) 500 bis 1600 (1000) 950 bis 2050 (1500)																					
mittlere Spektren- anzahl (<i>Average</i>)	7																					
Zielmassen (<i>target masses</i>)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Substanz</th> <th style="text-align: center; padding: 5px;">Injektions- volumen [µl]</th> <th style="text-align: center; padding: 5px;">Zielmasse (<i>target mass</i>)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="padding: 5px;">PEG 300</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">1</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">283; 415</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">PEG 400</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">1</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">371; 547</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">PEG 600</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">1</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">459; 679; 899</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">PEG 1000</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">2</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">723; 899; 1119; 1339</td></tr> <tr><td style="padding: 5px;">PEG 1500</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">2</td><td style="text-align: center; padding: 5px;">1207; 1427; 1648; 1868</td></tr> </tbody> </table>		Substanz	Injektions- volumen [µl]	Zielmasse (<i>target mass</i>)	PEG 300	1	283; 415	PEG 400	1	371; 547	PEG 600	1	459; 679; 899	PEG 1000	2	723; 899; 1119; 1339	PEG 1500	2	1207; 1427; 1648; 1868		
Substanz	Injektions- volumen [µl]	Zielmasse (<i>target mass</i>)																				
PEG 300	1	283; 415																				
PEG 400	1	371; 547																				
PEG 600	1	459; 679; 899																				
PEG 1000	2	723; 899; 1119; 1339																				
PEG 1500	2	1207; 1427; 1648; 1868																				
Probelösungen:	ME04																					

MATERIALIEN UND METHODEN

LCMS_003

(Methodenverifizierung YMC_012_006f)

Säule: YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm

mobile Phase A: Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure

mobile Phase B: ACN + 0.1 % Ameisensäure

Flussrate: 1.0 ml/min

Gradientenbedingungen:

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
40	10
45	10

Detektion und Ionenfalle

Detektoreinstellungen:

	Bedingungen 1	Bedingungen 2 bzw. 3
Vernebler (<i>Nebulizer</i>)	30.0 psi	30.0 psi bzw. 50.0 psi
Trocknungsgasstrom (<i>Drying Gas</i>)	8 l/min	8 l/min bzw. 10 l/min
Stabilität (<i>Stability</i>)	20 %	20 % bzw. 100 %
Trocknungstemperatur (<i>Drying temperature</i>)	350 °C	350 °C
Ionisierung (<i>ionization</i>)	Positivmodus	Positivmodus
ICC (<i>Ion charge control</i>)		
Ziel (<i>Target</i>)	100 000	100 000
max. Bestimmungszeit für das Hintergrundsignal (<i>Max. Accumulation time</i>)	200.00 ms	200.00 ms
Scanbereich (<i>Scan</i>)	100 bis 1200 (300, 400, 600) 500 bis 1600 (1000) 950 bis 2050 (1500)	100 bis 2100
mittlere Spektranzahl (<i>Average</i>)	7	7

MATERIALIEN UND METHODEN

Zielmassen (*target masses*)

Substanz	Injektions- volumen [μl]	Zielmasse (<i>target mass</i>)
PEG 300	1	283; 415
PEG 400	1	371; 547
PEG 600	1	459; 679; 899
PEG 1000	2	723; 899; 1119; 1339
PEG 1500	2	1207; 1427; 1648; 1868

Probelösungen:

ME04

MATERIALIEN UND METHODEN

LCMS_004

(Untersuchung zu Cremophor® RH40)

Säule: YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm

mobile Phase A: Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure

mobile Phase B: ACN + 0.1 % Ameisensäure

Flussrate: 1.0 ml/min

Gradientenbedingungen:

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
45	75
50	80
70	85
105	85
115	10
120	10

Detektion und

Ionenfalle

Detektoreinstellungen:

	Bedingungen 1	Bedingungen 2
Vernebler (<i>Nebulizer</i>)	50.0 psi	50.0 psi
Trocknungsgasstrom (<i>Drying Gas</i>)	10 l/min	10 l/min
Stabilität (<i>Stability</i>)	100 %	100 %
Trocknungstemperatur (<i>Drying temperature</i>)	350 °C	350 °C
Ionisierung (<i>ionization</i>)	Positivmodus	Negativmodus
ICC (<i>Ion charge control</i>)		
Ziel (<i>Target</i>)	100 000	100 000
max. Bestimmungszeit für das Hintergrund- signal (<i>Max.</i> <i>Accumulation time</i>)	200.00 ms	200.00 ms
Scanbereich (<i>Scan</i>)	100 bis 2100	100 bis 1000
mittlere Spektren- anzahl (<i>Average</i>)	7	7
Zielmassen (<i>target</i> <i>masses</i>)	723; 1119; 1427; 1868	299; 938

Probelösungen:

ME11

MATERIALIEN UND METHODEN

LCMS_004

(Untersuchung zur Stabilität von ungesättigten Fettsäuren)

Säule:	YMC-Pack Pro C18, S-3 µm, 12 nm, 150 x 4.0 mm	
mobile Phase A:	Wasser (MilliPore®) + 0.1 % Ameisensäure	
mobile Phase B:	ACN + 0.1 % Ameisensäure	
Flussrate:	1.0 ml/min	
Gradientenbedingungen:	t [min]	B [%]
	0	10
	1	10
	6	15
	7.5	15
	17.5	30
	27.5	32.5
	35	32.5
	45	75
	50	80
	70	85
	105	85
	115	10
	120	10
Detektion und	Ionenfalle	
Detektoreinstellungen:	Vernebler (<i>Nebulizer</i>)	50.0 psi
	Trocknungsgasstrom (<i>Drying Gas</i>)	10 l/min
	Stabilität (<i>Stability</i>)	100 %
	Trocknungstemperatur (<i>Drying temperature</i>)	350 °C
	Ionisierung (<i>ionization</i>)	Negativmodus
	ICC (<i>Ion charge control</i>)	
	Ziel (<i>Target</i>)	100 000
	max. Bestimmungszeit für das Hintergrund- signal (<i>Max.</i> <i>Accumulation time</i>)	200.00 ms
	Scanbereich (<i>Scan</i>)	100 bis 600
	mittlere Spektren- anzahl (<i>Average</i>)	7
	Zielmassen (<i>target</i> <i>masses</i>)	281 (für C18:1 FA) 279 (für C18:2 FA)
Probelösungen:	ME12	

Ergebnisse und Diskussion

4

4. Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund ihrer polydispersen Struktur eignen sich sowohl Macrogole als auch Macrogol-basierte Hilfsstoffe ideal zur Löslichkeitsverbesserung vieler Stoffe. Ihre Zusammensetzung aus unterschiedlichen Kettenlängen ermöglicht es, Stoffe zu stabilen Formulierungen zu vermengen, welche sich stark unterscheiden. Jedoch birgt diese hohe, herstellungsabhängige Variabilität auch Gefahren. So kann aus einem Wechsel des Herstellers oder einer Änderung der Herstellungsweise eine völlig neue Oligomerverteilung resultieren, welche wiederum die galenische Stabilität und Qualität negativ beeinflussen kann. Darum ist es unerlässlich, eine geeignete, standardisierbare HPLC-Methode zu besitzen, welche ein genaues Bild dieser Verteilung liefert. Aufgrund ihres Mangels an chromophoren Strukturmerkmalen lassen sich diese Substanzen jedoch nicht mit dem Goldstandard, der HPLC-UV, untersuchen. Um die notwendigen Informationen zu Zusammensetzung und Oligomerverteilung zu erhalten, wurde hier stattdessen eine HPLC-CAD-Methode entwickelt, da dieser Detektor strukturunabhängig ist und lediglich eine geringe Flüchtigkeit der Analyten voraussetzt.

Da es sich bereits bei den Macrogolen um eine stark inhomogene und variierende Substanzgruppe handelt sowie die darauf basierenden Substanzen sich ebenfalls strukturell stark unterscheiden können, wurde die Methodenentwicklung in drei Teile unterteilt. Der strukturelle Aufbau diente hierbei als Grundlage. Meist setzen sich die zu analysierenden Substanzen aus den Edukten, Macrogolen einer bestimmten durchschnittlichen Masse und einer lipophilen Komponente wie Fettalkohole oder -säuren zusammen, welche die endgültigen Produkte, d. h. Macrogoether bzw. -ester, bilden. Je nach Herstellungsweise können noch unterschiedliche Mengen der Edukte vorhanden sein. Da sich die drei Gruppen „freie Macrogole“, „freie lipophile Komponenten“ und „Ether bzw. Ester“ in ihrer Lipophilie unterscheiden, wurde jede Gruppe separat in einem Entwicklungsschritt untersucht, um die Methodenentwicklung weniger komplex darzustellen. So war anzunehmen, dass eher hydrophile Substanzen wie Macrogole (PEG) geringere Wechselwirkungen mit einer Umkehrphase eingehen, wobei diese Wechselwirkungen mit zunehmender Kettenlänge ansteigen sollten. Mit diesem Aspekt befasste sich Teil I der Methodenentwicklung, der vorwiegend unter Verwendung von geringen Anteilen an organischem Fließmittel erfolgte. Für lipophile Substanzen wie Fettsäuren (FA) und Fettalkohole (FAA), waren deutlich höhere Wechselwirkungen anzunehmen, wobei auch diese mit steigender Kettenlänge zunehmen sollten. Hierzu wurde Teil II unter Verwendung relativ hoher Anteile an organischem Fließmittel entwickelt. Teil III widmete sich der Optimierung der Trennung der Ether und Ester. So war zu erwarten, dass die Wechselwirkungen mit der stationären Phase durch den lipophilen Rest stärker ausfallen sollten als bei den reinen PEGs und geringer als bei den reinen FA und FAA. Außerdem war zu erwarten, dass mit längerer Kettenlänge der PEG-Komponente die Hydrophilie ansteigen sollte, während andererseits mit längerer Kettenlänge der FA-/FAA-Komponente die Lipophilie ansteigen sollte.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Gradient der final gefundenen Methode ist in **Abb. 4-1** dargestellt. Hier findet sich auch die Einteilung in die drei Entwicklungsschritte, die separat erarbeitet wurden.

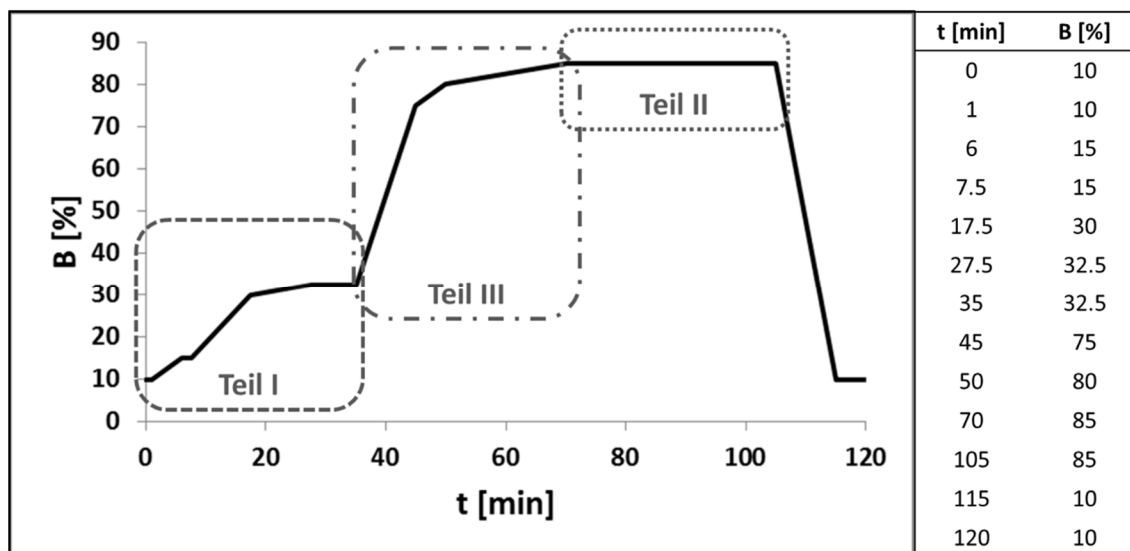


Abb. 4-1: Darstellung des Gradienten der finalen Methode (YMC_D003_final) mit der für die Methodenentwicklung relevanter Unterteilung. Teil I dient zur Trennung der hydrophilen Strukturen (PEGs), Teil II zur Trennung der lipophilen Strukturen (FA und FAA) und Teil III zur Trennung Ether und Ester.

4.1. Teil 1: Methodenentwicklung zur Trennung der hydrophilen Komponenten (PEGs)

Zur Entwicklung der Methode zur Trennung der PEGs wurden die von Daniela Brinz entwickelten und 2008 publizierten [156] HPLC-ELSD-Methoden als Ausgangspunkte gewählt. Als stationäre Phase wurde eine XTerra® RP18 (250 x 4.6 mm; 5 µm, 125 Å Porengröße) von Waters verwendet. Hierbei handelt es sich um octadecylsilantiertes Kieselgel, das in Form von sphärischen Partikeln vorliegt (Vergleich Kapitel 3.3). Die beiden Methoden verwenden einerseits reines Methanol (XTerra_MeOH_000), andererseits reines Acetonitril (XTerra_ACN_000) als organische Fließmittelkomponente, sowie hochreines Wasser (MilliPore®). Dieser einfache Aufbau unter Verwendung relativ einfacher Gradienten (siehe **Tab. 4-1**) an der am verbreitetsten stationären Phase (RP-18) führte bereits zu guten Trennergebnissen für PEGs der mittleren molaren Massen im Bereich von 300 bis 1000.

In **Abb. 4-2** sind die verschiedenen Ergebnisse für die beiden Originalmethoden dargestellt. Wie daraus zu ersehen ist, eignen sich beide Methoden zur Trennung von PEGs kleinerer durchschnittlicher molarer Massen; es wird eine vollständige Basislinientrennung beobachtet (**Abb. 4-2, a und c**).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tab. 4-1: Ausgangsmethoden nach *Brinz* und *Holzgrabe* [156]. Schritte zur Reequilibration wurden ergänzt.

XTerra_MeOH_000		XTerra_ACN_000	
Flussrate:	0.5 ml/min	Flussrate:	1.0 ml/min
t [min]	MeOH [%]	t [min]	ACN [%]
0	30	0	10
50	50	25	50
55	50	30	10
65	30	40	10

Im Falle der höheren Kettenlängen, die in PEG 1000 dominieren und teilweise auch in PEG 600 vorkommen, kommt es jedoch bei beiden Methoden zur Verschlechterung der Auflösung zwischen den Peaks der länger-kettigen Oligomere. Im Falle von XTerra_MeOH_000 (**Abb. 4-2; b**) kommt dies insbesondere durch die starke Peakverbreiterung zustande, die, wie in Kapitel 1.3 erörtert, aus der geringen Flussrate resultiert. Aufgrund der höheren Viskosität von Wasser-Methanol-Gemischen im Vergleich zu Wasser-Acetonitril-Gemischen gleicher Zusammensetzung und der Säulendimensionen (250 x 4.6 mm, 5 µm) resultiert bei den Methoden unter Verwendung von Methanol einer höheren Rückdruck, der die Flussrate auf 0.5 ml/min limitiert. Bei der Methode XTerra_ACN_000 hingegen können höhere Flussraten bis zu 1.0 ml/min problemlos genutzt werden. Jedoch zeigte sich hier (**Abb. 4-2; d**) eine schlechtere Auflösung als unter Verwendung von Methanol.

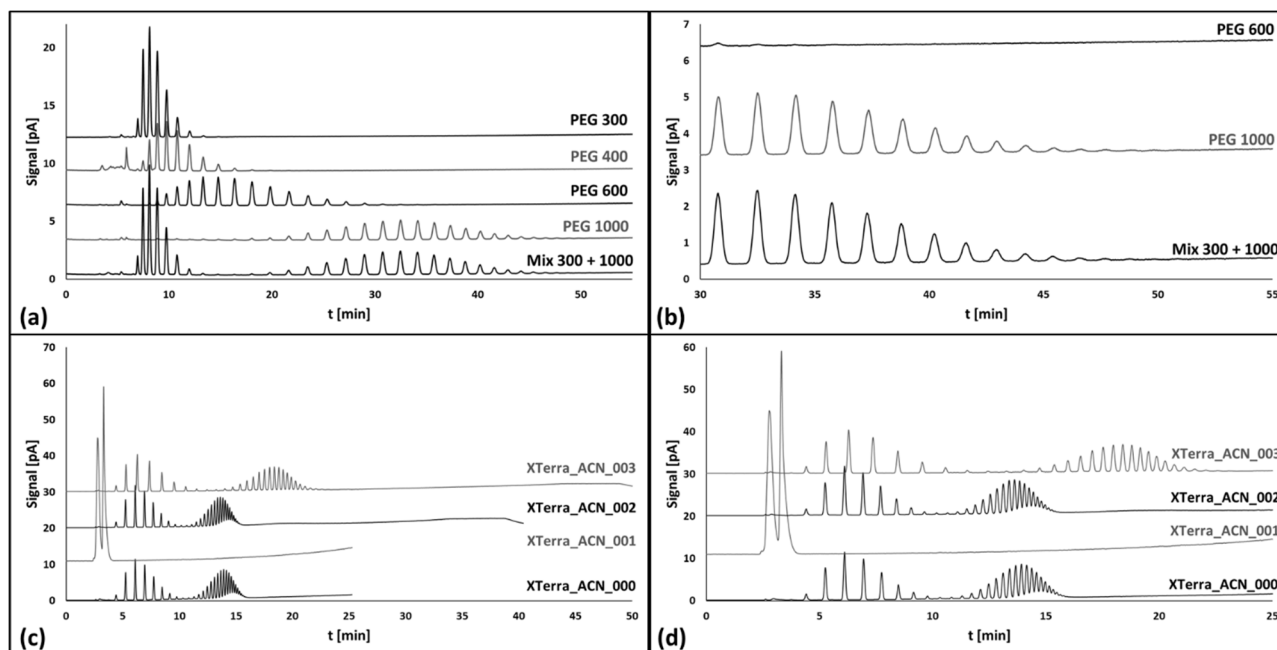


Abb. 4-2: Chromatogramme von PEG 300, 400, 600, 1000 und einer Mischung aus PEG 300 und 1000 getrennt mit den beiden Methoden XTerra_MeOH_000 (**a + b**) und XTerra_ACN_000 (**c + d**).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ausgehend von beiden Methoden wurden Anpassungen vorgenommen, die auf eine Verbesserung der Auflösung abzielten. Die Bedingungen sämtlicher untersuchten Anpassungen finden sich in Kapitel **8.4**.

Um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, erfolgte die Integration der einzelnen Chromatogramme mittels der Agilent ChemStation® Software (Rev. B.03.02) unter Verwendung derselben Einstellungen. So wurden die unteren Grenzen für die Peakweite auf 0.05, für die Fläche auf 0.5 und für die Peakhöhe auf 0.01 festgesetzt. Der Wert für die Empfindlichkeit der Steigung der Kurve wurde auf 0.1 festgesetzt, sofern es bei der Integration nicht zu Peakaufspaltungen aufgrund des Grundrauschens kam. In diesen seltenen Fällen wurde der Wert angepasst (0.2 – 0.4), bis keine Peakaufspaltungen mehr erfolgten. Die Auflösung R_S berechnet sich aus zwei aufeinanderfolgenden Peaks (x) und ($x+1$) nach Gleichung **Gl. 8**:

$$R_S = 1.18 \times \frac{t_R(x+1) - t_R(x)}{b_{0,5}(x+1) + b_{0,5}(x)}$$

Gl. 8

Hierbei fließen die Retentionszeiten (t_R) der beiden Peaks, sowie deren Peakbreite auf halber Höhe ($b_{0,05}$) mit ein.

4.1.1. Methoden unter Verwendung der XTerra® RP₁₈-Säule und Methanol

Aufgrund der Beobachtungen (siehe **Abb. 4-2**), dass die Auflösung der Peaks zwischen PEGs mit höheren Kettenlängen unter Verwendung von Methanol (**Abb. 4-2 a + b**) besser war, wurde zunächst diese Methode modifiziert. Als primäres Ziel wurde eine Basislinientrennung ($R_S > 1.4$) zwischen allen gefundenen Peaks angestrebt; dabei fielen auch Werte bis zu einer unteren Grenze von $R_S = 1.0$, welche eine restliche Peaküberlagerung von 2 % ergibt [157], in den Akzeptanzbereich. Des Weiteren wurden Werte $R_S < 3 - 4$ angestrebt, um unnötig lange Analysendauern zu vermeiden. Somit wurden zwei Bereiche festgelegt: der Idealbereich mit $1.4 < R_S < 3.0$ und der akzeptable Bereich mit $1.0 < R_S < 4.0$.

Um ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Kettenlängen zu betrachten, wurde eine Mischung (1:1) aus PEG 300, aus vornehmlich kürzeren Ketten bestehend, und PEG 1000, aus mittel- und langkettigen Oligomeren bestehend, hergestellt und genutzt („Mix 300 + 1000“).

Da es sich bei der Ausgangsmethode um einen einfachen linearen Gradienten handelt, wurden zunächst Untersuchungen dahingehend durchgeführt, wie sich eine Anpassung der Ausgangskonzentration an organischem Fließmittel, hier MeOH, auf die Auflösung auswirkt (XTerra_MeOH_001 bis XTerra_003a). Außerdem wurden Untersuchungen durchgeführt, wie sich die Steilheit des Gradienten auf die Trennung auswirkt und ob ein mehrstufiger Gradient Vorteile bietet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

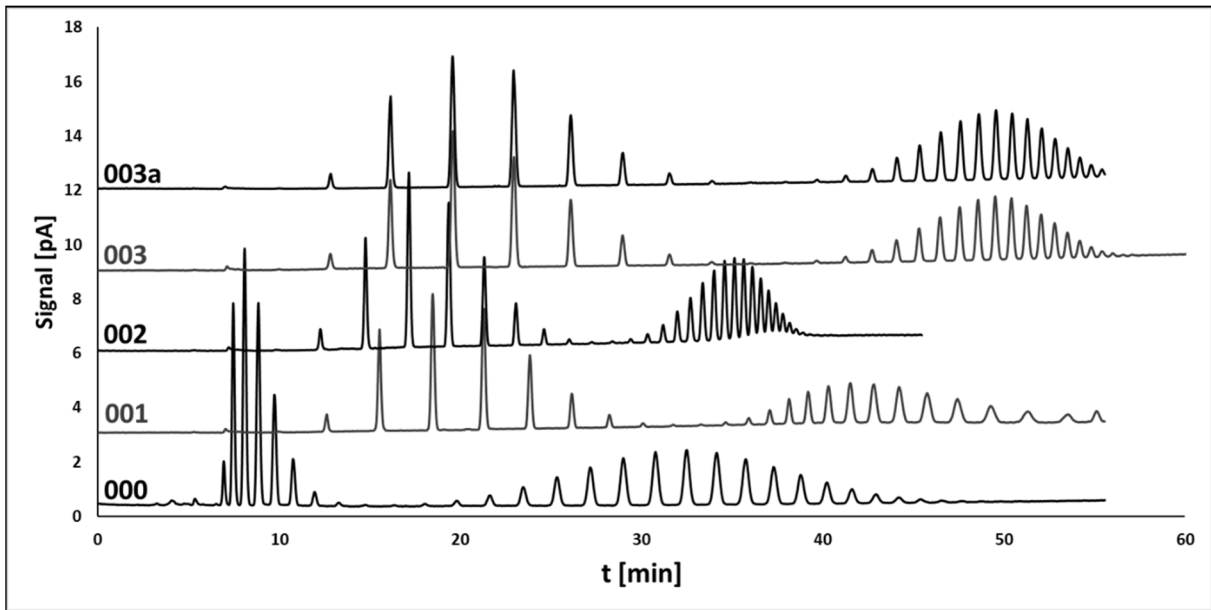


Abb. 4-3: Chromatogramme der gemischten Probe „Mix PEG 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden XTerra_MeOH_000 bis XTerra_MeOH_003a. Die Startkonzentration MeOH aller Methoden lag bei 10 %, während die Zielkonzentration bei 50 % MeOH lag. Diese wurde bei „001“ über einen 2-stufigen Gradienten erreicht, während „002“-„003a“ einstufig verliefen. Der Gradient von „002“ verlief steiler als bei „003“ und „003a“.

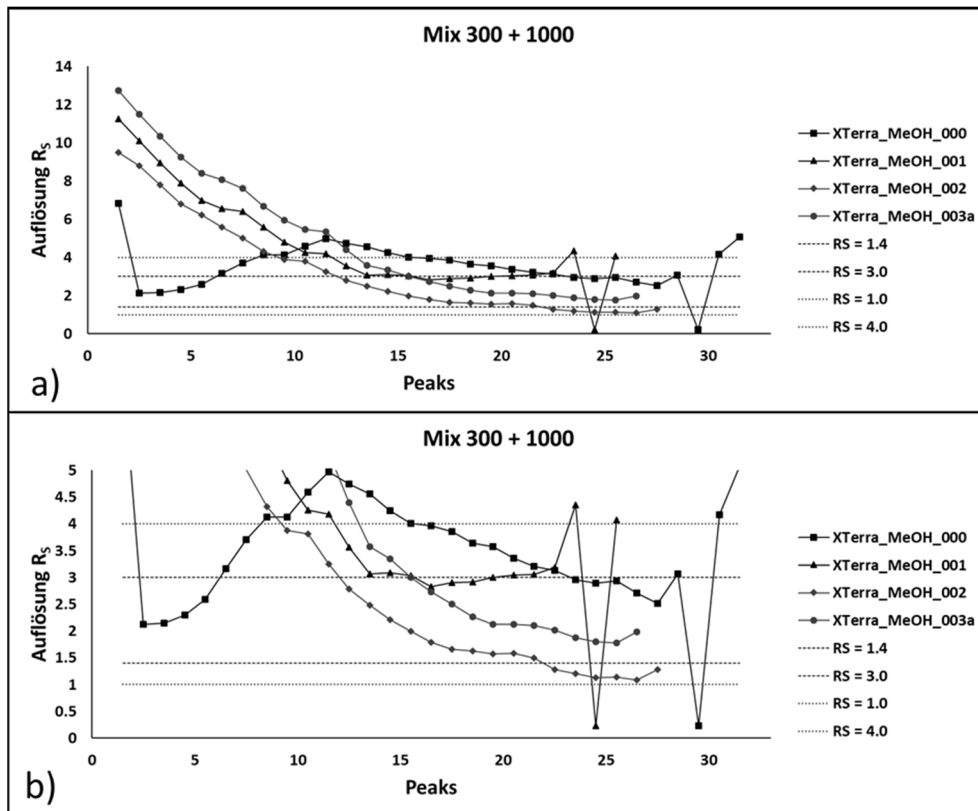


Abb. 4-4: Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden XTerra_MeOH_000 bis XTerra_MeOH_003a mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Die Startkonzentration MeOH aller Methoden lag bei 10 % und die Zielkonzentration bei 50 % MeOH. Diese wurde bei „001“ über einen 2-stufigen Gradienten erreicht, während „002“ - „003a“ einstufig verliefen. Der Gradient von „002“ verlief steiler als bei „003“ und „003a“. **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Chromatogramme finden sich in **Abb. 4-3**, die berechneten Auflösungen zwischen den einzelnen Peaks sind in **Abb. 4-4** und im Anhang (**Tab. 8-7**).

Aus diesen ersten Untersuchungen ergaben sich folgende Schlussfolgerungen:

- Eine Verringerung der Ausgangskonzentration an MeOH von 30 % (**Abb. 4-3**, „000“) auf 10 % begünstigt die Auflösung zwischen Peaks der kürzerkettigen Oligomere (**Abb. 4-3**, „001“ – „003a“).
- Steilere Gradienten von der Ausgangskonzentration (10 % MeOH) auf die Zielkonzentration (50 % MeOH) begünstigen die Trennleistung, verringern aber die Selektivität in deutlich höherem Ausmaß (**Abb. 4-3**, „002“).
- Eine Unterteilung in verschiedene Gradientenstufen, angepasst an die unterschiedlichen Kettenlängen zur Optimierung der Auflösung, erscheint sinnvoll (**Abb. 4-3**, „001“).

Basierend auf diesen Schlussfolgerungen wurde die Methodenentwicklung in Hinblick auf eine Unterteilung des Gradienten fortgeführt.

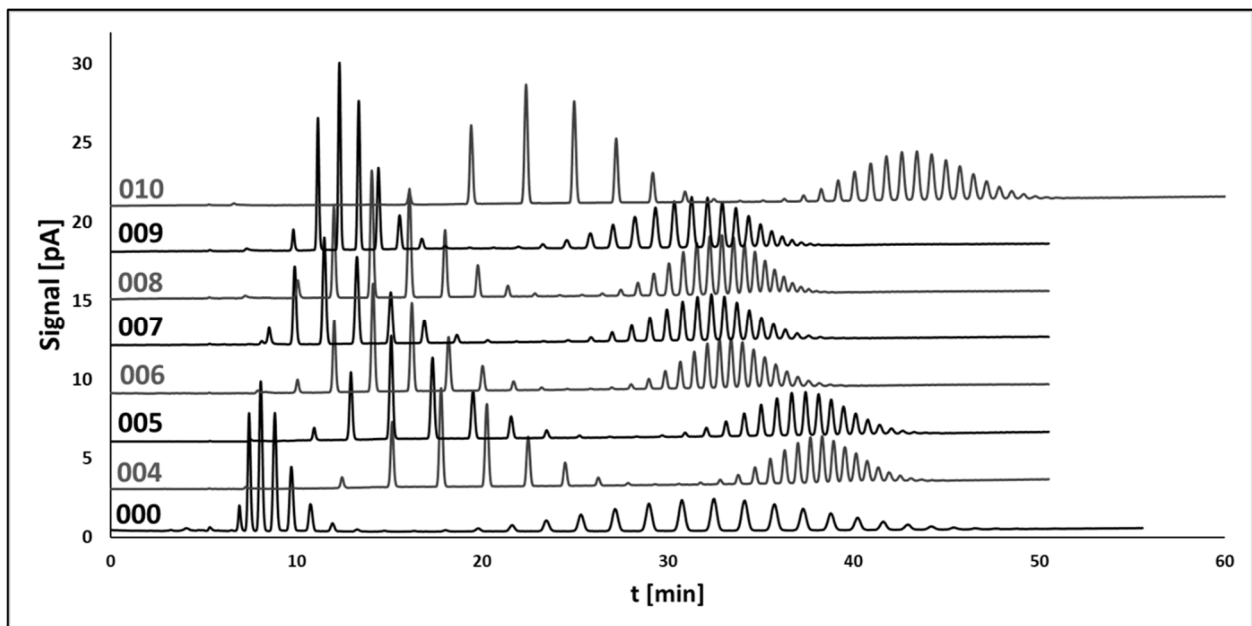


Abb. 4-5: Chromatogramme der gemischten Probe „Mix PEG 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden XTerra_MeOH_000 und XTerra_MeOH_004 bis XTerra_MeOH_010. Einführung verschiedener Stufen im Vergleich zur einstufigen Ausgangsmethode („000“) und Variation der Steilheit. 2-stufige Gradienten in den Methoden „004“ bis „007“ mit sinkender Steilheit („004“ > „005“ > „006“ > „007“), 3-stufige Gradienten in den Methoden „009“ und „010“.

Es wurden ein initialer Gradient G1 auf 45 % MeOH, gefolgt von einem weiteren Gradienten G2 auf 50 % MeOH genutzt (XTerra_MeOH_004 bis XTerra_MeOH_007). Variiert wurden hier die Ausgangskonzentration an MeOH (10 %, 15 % und 20 %), sowie die Steilheit des Gradienten. Es zeigte sich (**Abb. 4-5**), dass jede dieser vier Methoden („004“ – „007“) eine deutliche Verbesserung der Trennleistung gegenüber der

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Originalmethode aufweisen konnte, d. h. eine Einteilung in mehrere Stufen ist überlegen. Die Elution der niedrigeren Kettenlängen erfolgt bei niedrigen Konzentrationen an MeOH (ca. 20 – 33 %), während die Elution der länger-kettigen PEGs erst mit dem zweiten Gradienten, im Bereich 45 – 50 % MeOH, erfolgt.

Hierauf aufbauend wurde der initiale Gradient weiter modifiziert (**Abb. 4-5**, „008“), was jedoch keine weitere Verbesserung erbrachte, sodass eine dritte Gradientenstufe eingesetzt wurde (**Abb. 4-5**, „009“ und „010“). Diese beiden Methoden zeigten sich den anderen Methoden in Bezug auf Trennleistung, Selektivität und der daraus resultierenden Auflösung als überlegen (**Abb. 4-6, Tab. 8-8**), was sich in einem großen Anteil an R_S -Werten im akzeptablen Bereich äußerte. Außerdem sind diese Werte homogener verteilt, während sie in den vorausgehenden Methoden deutlich weiter gestreut waren und häufiger außerhalb des akzeptablen Bereiches lagen.

Allerdings ist hierbei anzumerken, dass beide Methoden eine lange Laufzeit von 65 min aufweisen. Mit 60 min („009“) und 70 min („010“) Laufzeit sind bereits sehr lange Chromatographiedauern für die PEGs bis PEG 1000 erreicht, woraus sich abschätzen ließ, dass noch längere Retentionszeiten für PEGs > PEG 1000 zu erwarten wären. Diese hohen Analysenzeiten resultierten zum einen aus der geringen Flussrate, die aufgrund des hohen Rückdrucks des Wasser-Methanol-Gemisches in Kombination mit der Säulenlänge ($l = 250$ mm) entstanden ist. Mit einer verringerten Flussrate steigt jedoch auch der Einfluss des B-Terms der *Van-Deemter-Gleichung* (siehe Kapitel **1.3**), wodurch sich die Trennleistung verringert. Des Weiteren ist die Elutionsstärke von Methanol geringer als die von Acetonitril, wodurch die Retention vergleichsweise höher ist. Dies hat zwar den Vorteil, dass sich Methanol-Gradienten besser steuern lassen, da sich kleine Änderungen geringer auswirken als bei dem elutionsstärkeren Acetonitril; dadurch wird jedoch auch die Laufzeit erhöht. Mit erhöhter Laufzeit steigt auch die Aufenthaltszeit der Substanzen auf der Säule, was wiederum zu Peakverbreiterungen aufgrund der Längsdiffusion führen kann.

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde im weiteren Verlauf der Methodenentwicklung Methanol durch Acetonitril ersetzt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

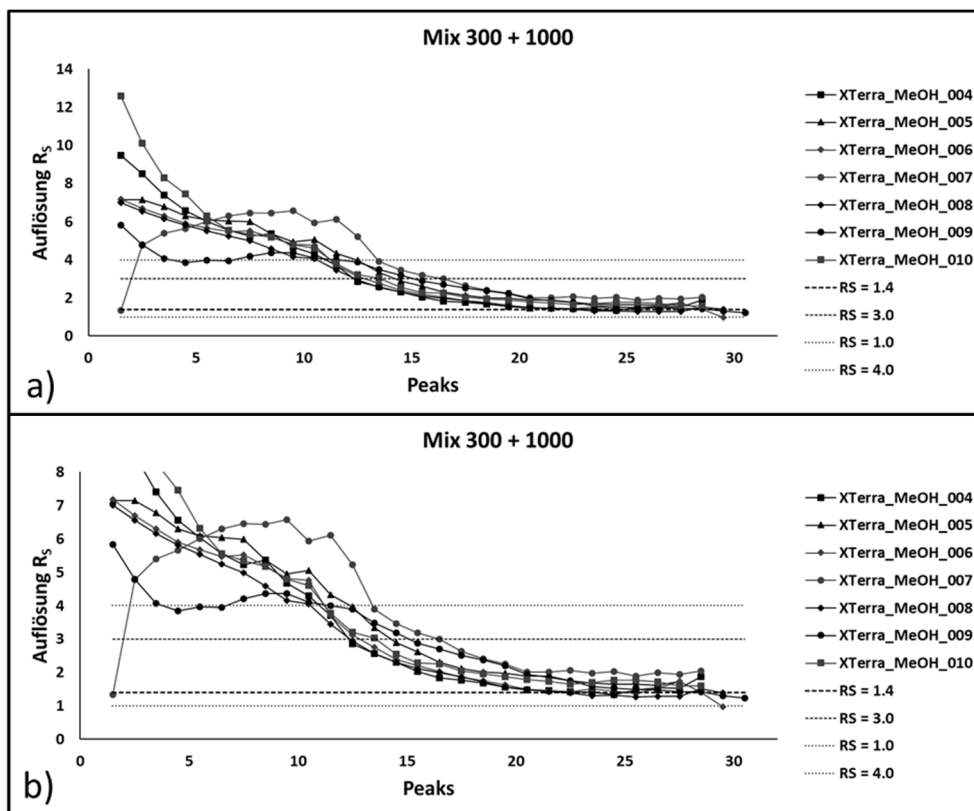


Abb. 4-6: Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden XTerra_MeOH_004 bis XTerra_MeOH_0010 mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Einführung verschiedener Stufen im Vergleich zur einstufigen Ausgangsmethode („000“) und Variation der Steilheit. 2-stufige Gradienten in den Methoden „004“ bis „007“ mit sinkender Steilheit („004“ > „005“ > „006“ > „007“), 3-stufige Gradienten in den Methoden „009“ und „010“. **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

4.1.2. Methoden unter Verwendung der XTerra® RP₁₈-Säule und Acetonitril

Als Ausgangspunkt wurde hier die zweite Methode von Daniela Brinz [156] verwendet (XTerra_ACN_000), welche sich analog zur Methode unter Verwendung von MeOH (XTerra_MeOH_000) aus einem einfachen linearen Gradienten zusammensetzt (siehe Kapitel 4.1). Vorteilhaft an dieser Methode ist die kurze Laufzeit (mit Reequilibrierung 40 min), die aus der höheren Elutionsstärke und der höheren Flussrate resultiert. Jedoch war im Vergleich zu MeOH eine schlechtere Auflösung der Peaks insbesondere im Bereich der längeren Oligomere zu beobachten.

Basierend auf den mit MeOH erzielten Erkenntnissen wurde bei der Methodenentwicklung bereits frühzeitig auf mehrstufige Gradienten zurückgegriffen. Versuche, eine Verkürzung der Laufzeit durch höhere Startkonzentrationen an ACN zu erzielen, schlugen fehl, da es im Bereich der kürzesten Oligomere zu Koelutionen kam (**Abb. 4-7**, XTerra_ACN_001). Es zeigte sich, dass die optimalen Startbedingungen bei Verwendung von 10 % ACN lagen (**Abb. 4-7**). Ein mehrstufiger Gradient (XTerra_ACN_002 bzw. _003) zeigte

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

hingegen eine enorme Verbesserung der Selektivität, wobei flachere Gradienten (**Abb. 4-7**, XTerra_ACN_003) mit kürzeren isokratischen Phasen deutlich bessere Ergebnisse erzielen, als steilere Gradienten (**Abb. 4-7**, XTerra_ACN_002).

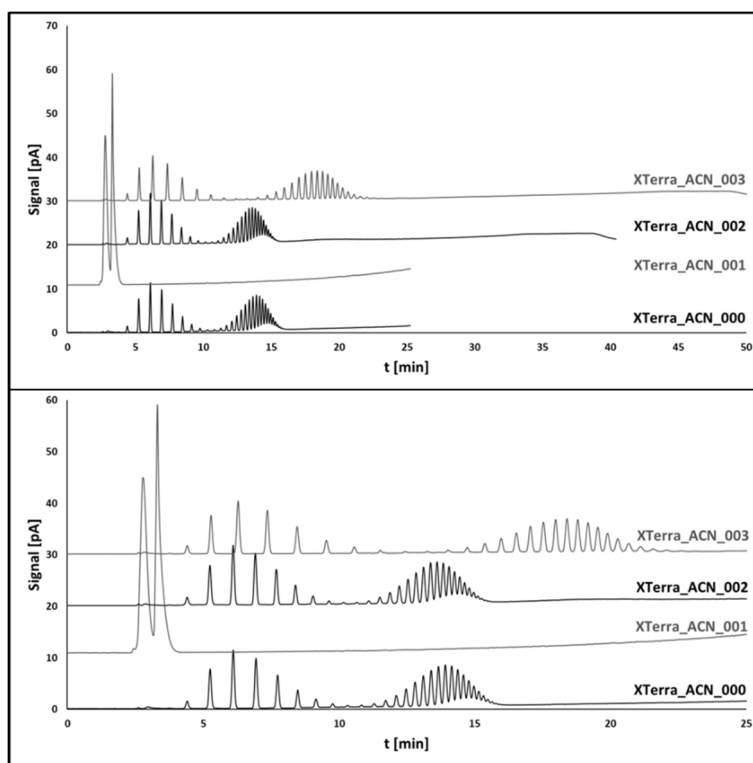


Abb. 4-7: Chromatogramme der gemischten Probe „Mix 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden XTerra_ACN_000 bis XTerra_ACN_003. Einstufige Methoden XTerra_ACN_000 (Ausgangsmethode, 10 % ACN Startkonzentration) und XTerra_ACN_001 (30 % ACN Startkonzentration) verglichen mit den 2-stufigen Methoden XTerra_ACN_002 (generell steilere Gradienten) und XTerra_ACN_003 (flachere Gradienten).

Allerdings war, aufgrund der sichtbar breiteren Peaks (**Abb. 4-7**, XTerra_ACN_003), die Trennleistung im Bereich von Oligomeren mit höheren Kettenlängen noch verbesserungswürdig. Diese Peakverbreiterungen haben negativen Einfluss auf die Auflösungen zwischen den Peaks (**Tab. 8-9**, **Abb. 4-8**) und lassen sich einerseits durch Modifikation des Gradienten und andererseits durch die Säulendimensionen beeinflussen. Aus diesem Grund wurde entsprechend der *Van-Deemter-Gleichung* (siehe Kapitel 1.3) eine andere RP-18-Säule gewählt, die YMC-Pack Pro C18, welche aufgrund ihrer Dimensionen von 150 x 4.0 mm verglichen zu 250 x 4.6 mm und Partikelgröße von 3 μm verglichen zu 5 μm zu einem geringeren A-Term führen sollte. Auch war mit einem höheren Kohlenstoffgehalt, 16 % im Vergleich zu 15 % der XTerra-Säule, anzunehmen, dass mehr lipophile Interaktionen möglich sein sollten.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

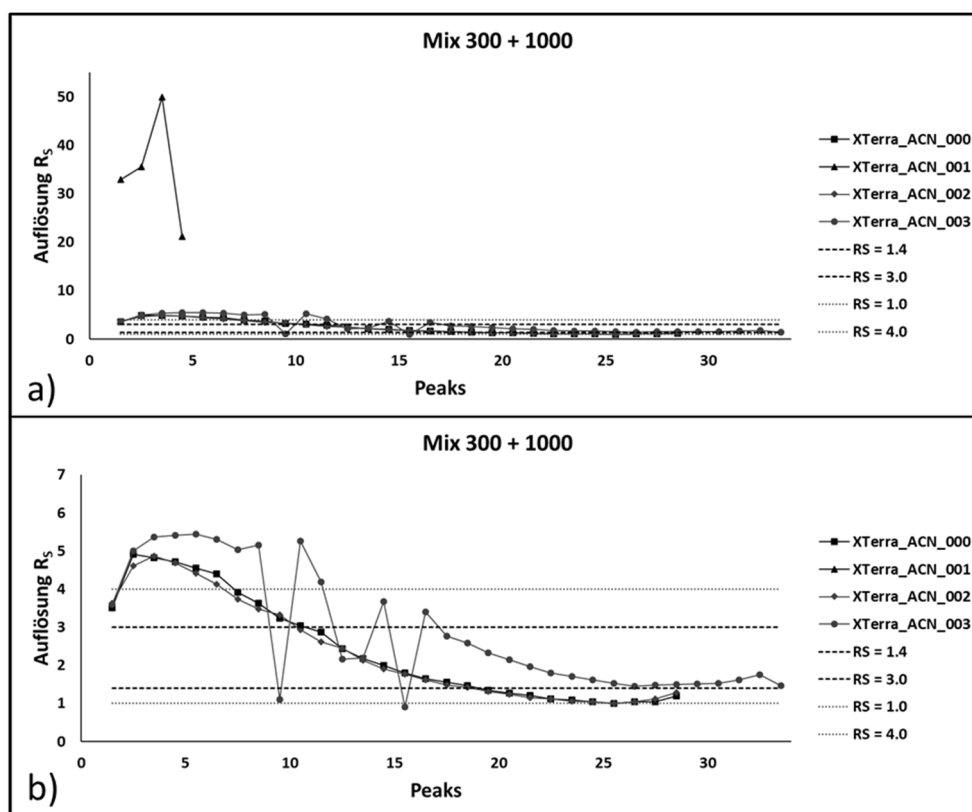


Abb. 4-8: Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden XTerra_ACN_000 bis XTerra_ACN_003 mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Einstufige Methoden XTerra_ACN_000 (Ausgangsmethode, 10 % ACN Startkonzentration) und XTerra_ACN_001 (30 % ACN Startkonzentration) verglichen mit den 2-stufigen Methoden XTerra_ACN_002 (generell steilere Gradienten) und XTerra_ACN_003 (flachere Gradienten). **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

4.1.3. Methoden unter Verwendung der YMC-Pack Pro und Acetonitril

Da sich Umkehrphasen verschiedener Hersteller und sogar Chargen derselben Hersteller in ihrer Beschaffenheit unterscheiden können [158, 159], wurde bei der Methodenentwicklung an der neuen Säule zunächst bewusst darauf verzichtet die bereits gefundenen Methoden den Säulendimensionen anzupassen und zu verwenden. Um den Versuchsaufbau noch möglichst einfach zu halten, wurde außerdem statt der gemischten Probe aus PEG 300 und PEG 1000, eine Probe von PEG 600 verwendet, da sich dieses aus einem hohen Anteil an kurz- und mittelkettigen Oligomeren, sowie geringen Anteile der längerkettigen Oligomere zusammensetzt.

Zunächst wurden also die optimalen Startbedingungen für diese Säule eingegrenzt (**Abb. 4-9**), wobei sich eine Startkonzentration von 10 % ACN als am besten geeignet zeigte (**Abb. 4-9**, YMC_004 – 006), während höhere Konzentrationen zu Koelutionen führten (**Abb. 4-9**, YMC_001 - 003).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

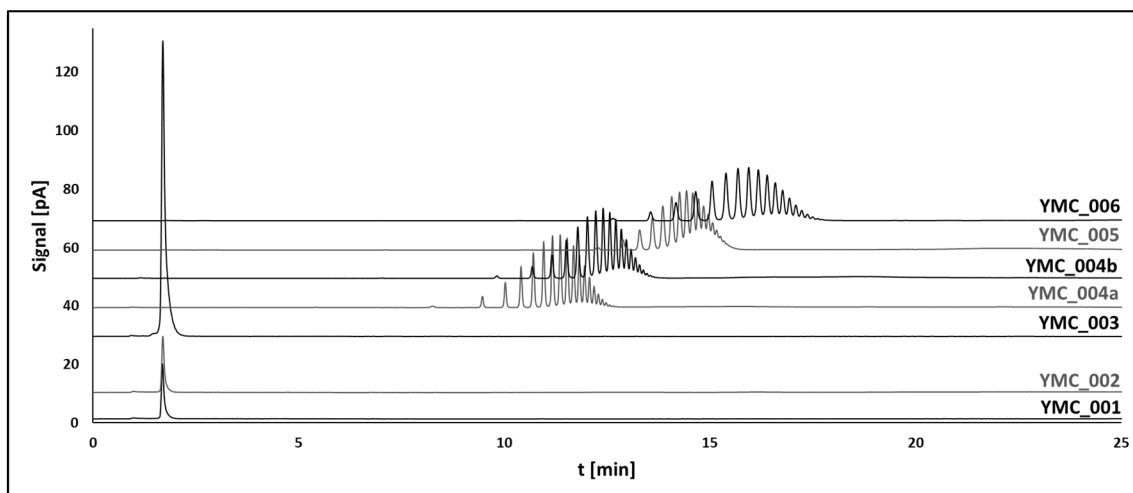


Abb. 4-9: Chromatogramme von PEG 600 zum Vergleich der Methoden YMC_001 bis YMC_006. Bestimmung der optimalen Startkonzentration und der geeigneten Steilheit des einfachen Gradienten. ACN-Startkonzentrationen: 30 % (YMC_001 – 003) und 10 % (YMC_004 – 006). Steigende Steilheit resultierend aus sinkender Flussrate: YMC_004a (1.0 ml/min; flachster Gradient), YMC_004b (0.75 ml/min), YMC_005 (0.5 ml/min; steilster Gradient). Verlängerung der Gradientenzeit und dabei sinkende Steilheit (YMC_006).

Die Zielkonzentration an ACN des Gradienten wurde zunächst, analog zur Methode von D. Brinz, auf 50 % festgelegt, welche über einen einfachen linearen Gradienten erreicht wurde. Es erfolgte eine Modifikation der Steilheit durch Variation der Flussrate, wobei aus langsameren Flussraten bei gleichbleibender Gradientenzeit-Tabelle ein steilerer effektiver Gradient entstand. Durch Verwendung verschiedener Flussraten von 1.0 ml/min (YMC_004a), 0.75 ml/min (YMC_004b) und 0.5 ml/min (YMC_005), stellte sich heraus, dass ein flacherer Gradient zur besseren Peakauflösung führt. Auch eine zeitliche Verlängerung des Gradienten (YMC_006) hatte eine Abflachung der Steilheit und eine Verbesserung der Peakauflösungen, insbesondere im Bereich der Oligomerketten mittlerer Länge, zur Folge (**Abb. 4-10, Tab. 8-11**).

Da sich die langsamere Flussrate von 0.5 ml/min besser dazu eignet die Auswirkungen der Anpassungen direkt zu beobachten, wurden die folgenden Methoden bei dieser Flussrate entwickelt. Nach erfolgreicher Methodenoptimierung sollte diese dann wieder auf 1.0 ml/min angepasst werden. Da die Auftrennung der PEGs mit kurzen bis mittleren Kettenlängen bereits passabel war, wurde zur weiteren Methodenentwicklung nun PEG 1000 herangezogen.

Aufbauend aus den vorhergehenden Erkenntnissen aus den Versuchen mit der XTerra-Säule (Kapitel **4.1.1** und **4.1.2**) wurden nun in den Methoden ein zweiter Gradient eingeführt (**Abb. 4-11**, YMC_007- YMC_011), welcher dazu diente die Oligomere mittlere und höherer Kettenlängen besser aufzutrennen. Variationen dieser Gradienten-Steilheiten, sowie den Intermediär⁶- bzw. Zielkonzentrationen zeigten, dass verschiedene Gradienten, abgestimmt auf die unterschiedlichen PEG-Kettenlängen (kurz, mittel, lang) zu einer deutlichen

⁶ Intermediärkonzentration: Zielkonzentration eines Gradienten, bevor dieser in ein isokratisches Schritt (=Plateauphase) oder einen nachfolgenden Gradienten übergeht

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Verbesserung der Peakaufösungen führen. Insbesondere flacher verlaufende Gradienten verbessern die Auflösung zwischen Peaks der größeren Oligomerketten deutlich (**Abb. 4-12, Tab. 8-11**; YMC_009 und YMC_010). Diese Modifikationen (YMC_012 bis YMC_014) wurden soweit optimiert, dass PEGs bis zu einer mittleren molaren Masse von 1000 in ihre enthaltenen Oligomere basisliniengetrennt werden konnten (**Abb. 4-13, Abb. 4-14, Tab. 8-12**).

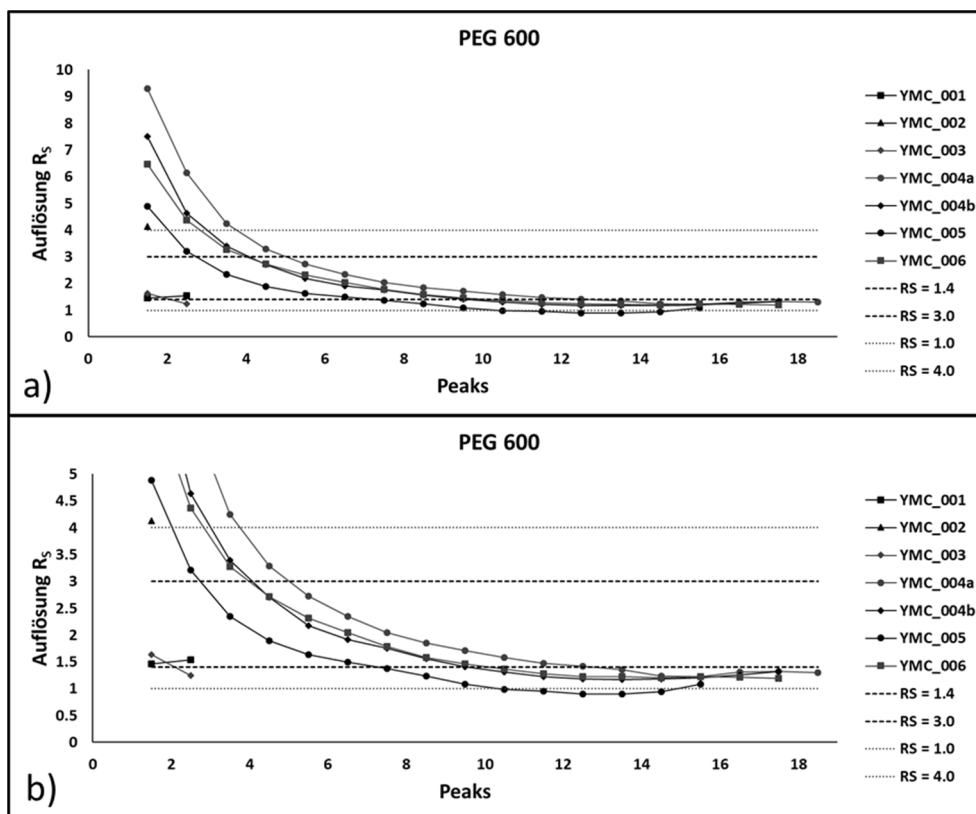


Abb. 4-10: Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 600 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_001 bis YMC_006 mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Bestimmung der optimalen ACN-Startkonzentration und der geeigneten Steilheit des einfachen Gradienten. ACN-Startkonzentrationen: 30 % (YMC_001 – 003) und 10 % (YMC_004 – 006). Steigende Steilheit resultierend aus sinkender Flussrate: YMC_004a (1.0 ml/min; flachster Gradient), YMC_004b (0.75 ml/min), YMC_005 (0.5 ml/min; steilster Gradient). Verlängerung der Gradientenzeit und dabei sinkende Steilheit (YMC_006). **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

Der Gradient der Methode YMC_012 eignete sich am besten für kurze bis lange Oligomerketten (PEG 300 – 1000). Aus dieser Methode ergab sich auch, dass zur Elution von PEG 1000 eine Zielkonzentration von 30 % ACN mehr als ausreichend ist, was ein deutlicher Unterschied zu der Ausgangsmethode (50 % ACN) ist. Aufgrund dieser Schlussfolgerungen wurde die Methodenentwicklung ausgehend von dieser Methode mit dem Ziel fortgeführt, eine dritte Gradientenstufe beginnend bei 30 % ACN einzuführen, um eine Trennung von PEGs größerer Kettenlängen (> PEG 1000) zu erzielen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

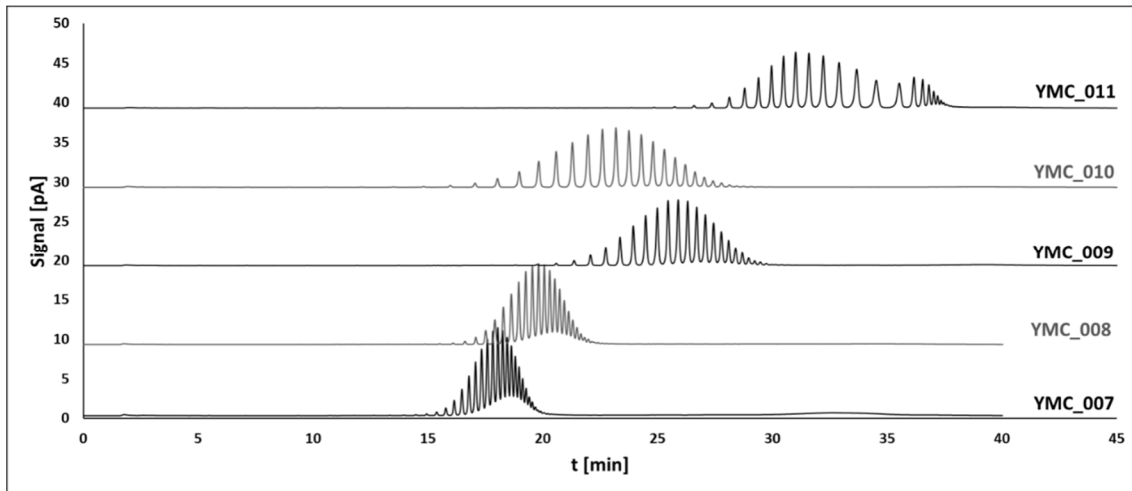


Abb. 4-11: Chromatogramme von PEG 1000 zum Vergleich der Methoden YMC_007 bis YMC_011. Verwendung 2-stufiger Gradienten mit Variation der Intermediärkonzentration, sowie der Startkonzentrationen, und damit gleichzeitige Änderung der Gradientensteilheit. ACN-Startkonzentrationen: 10 % (YMC_007 – 009), 15 % (YMC_010), 5 % (YMC_011). ACN-Intermediärkonzentrationen: 40 % (YMC_007), 35 % (YMC_008), 30 % (YMC_009 und YMC_010), 25 % (YMC_011).

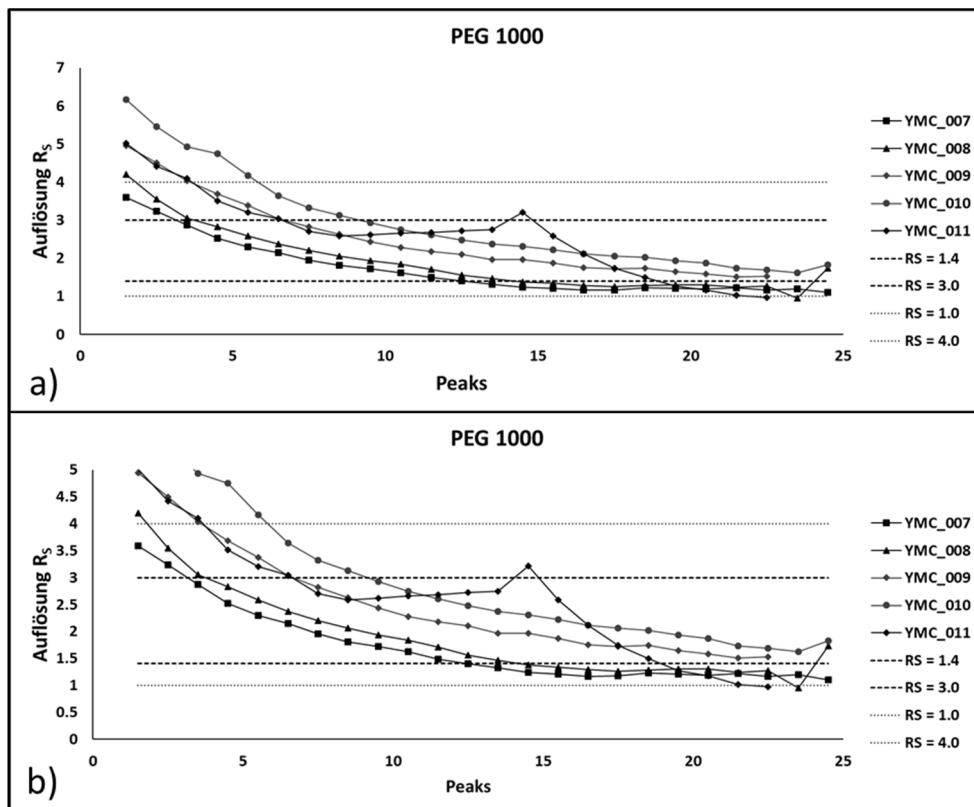


Abb. 4-12: Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 1000 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_007 bis YMC_011 mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Verwendung 2-stufiger Gradienten mit Variation der Intermediärkonzentration, sowie der ACN-Startkonzentrationen, und damit gleichzeitige Änderung der Gradientensteilheit. ACN-Startkonzentrationen: 10 % (YMC_007 – 009), 15 % (YMC_010), 5 % (YMC_011). ACN-Intermediärkonzentrationen: 40 % (YMC_007), 35 % (YMC_008), 30 % (YMC_009 und YMC_010), 25 % (YMC_011). **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

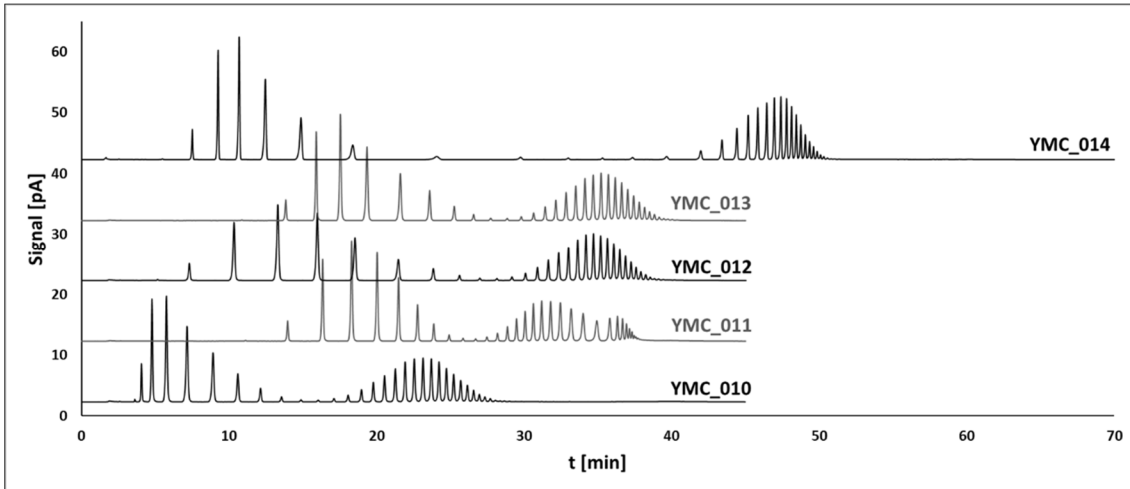


Abb. 4-13: Chromatogramme für die Probe „Mix 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden YMC_010 bis YMC_014. Variation der ACN-Startkonzentrationen: 15 % (YMC_010, YMC_013), 10 % (YMC_012, YMC_014) und 5 % (YMC_011). ACN-Zielkonzentrationen verringert auf 30 % (YMC_012 – 014). Erste Untersuchungen zu 3-stufiger Gradienteneinteilung (YMC_014).

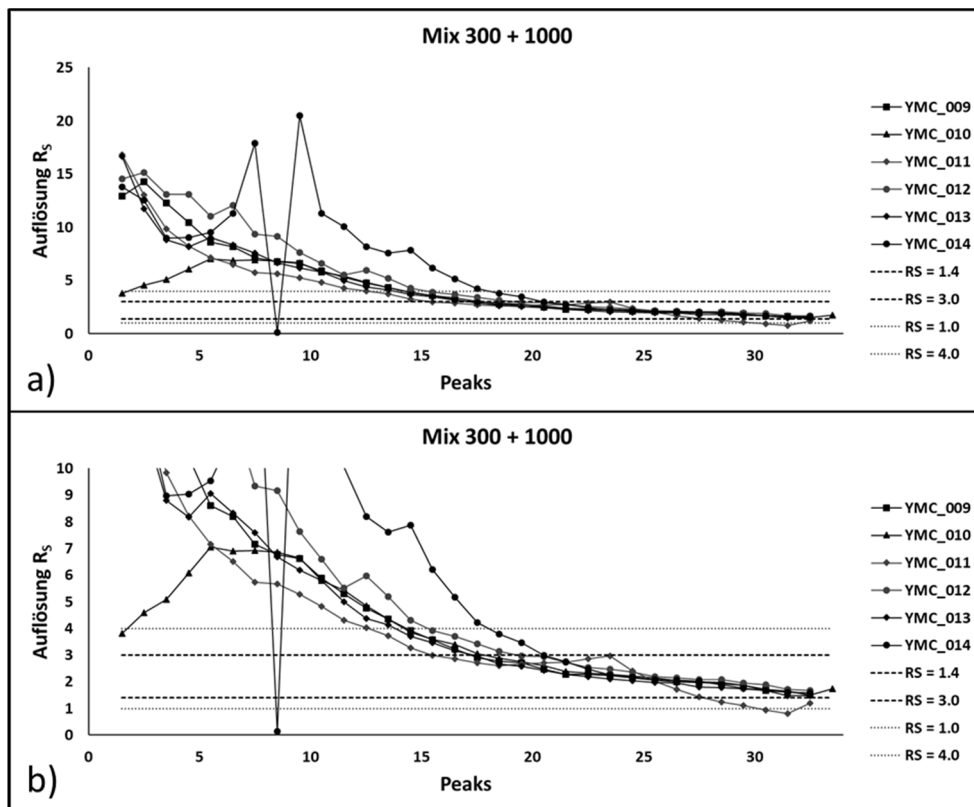


Abb. 4-14: Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_010 bis YMC_014 mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Variation der ACN-Startkonzentrationen: 15 % (YMC_010, YMC_013), 10 % (YMC_012, YMC_014) und 5 % (YMC_011). ACN-Zielkonzentrationen verringert auf 30 % (YMC_012 – 014). Erste Untersuchungen zu 3-stufiger Gradienteneinteilung (YMC_014). Bei der stark abweichenden Auflösung zwischen Peak 8 und 9 bei Methode YMC_014 handelt es sich vermutlich um einen Ausreißer aufgrund einer Peakaufspaltung. **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

4.1.4. Optimierung der gefundenen Methode YMC_012

In der ersten Phase der Methodenoptimierung wurde die geeignete Zielkonzentration an ACN für höhere Kettenlängen bis zu denen, die in PEG 3000 enthalten sind, bestimmt (M001 – M003). Hierzu dienten die Konzentrationen 35 % (M001), 32 % (M002) und 32.5 % ACN (M003), wobei sich 32.5 % als am geeignetsten herausstellte (**Abb. 4-15**), während 35 % ACN bereits zu einem Verlust an Peakauflösungen führte (**Abb. 4-16, Tab. 8-13**).

Im nächsten Optimierungsschritt wurde die geeignete Gradientensteilheit von 30 % ACN (Ausgangsbedingung der Trennung von PEG 300 – 1000) auf 32.5 % untersucht. Zunächst erfolgten diese Anpassungen noch bei einer Flussrate von 0.5 ml/min (**Abb. 4-17, M004 – M006**), wobei sich auch hier wieder die geringste Steilheit (M006) als am besten geeignet herausstellte und zu den besten Peakauflösungen führte (**Abb. 4-16, Tab. 8-13**).

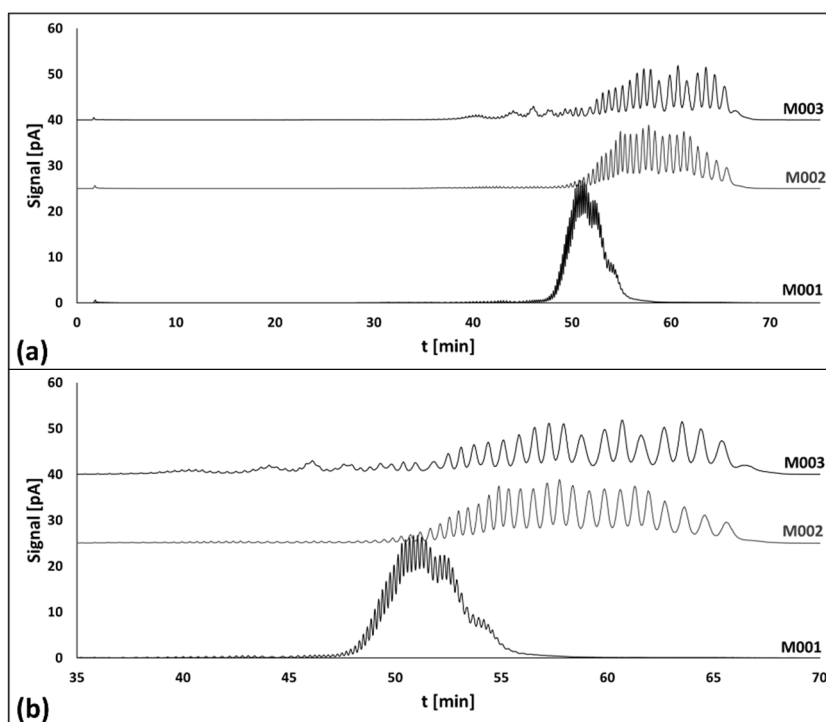


Abb. 4-15: Chromatogramme für PEG 3000 zum Vergleich der Methoden YMC_012_M001 bis YMC_012_M003 zur Bestimmung der optimalen Zielkonzentration an ACN für höhere Oligomere. M001 (35 % ACN), M002 (32 % ACN) und M003 (32.5 % ACN). **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

Um die Laufzeit zu verringern, wurden anschließend die Gradiententabellen auf eine Flussrate von 1.0 ml/min angepasst. Außerdem wurde die Steilheit des Gradienten durch Erhöhung der Gradientendauer auf bis zu 40 min weiterhin verringert (M007f – M010f). Es zeigte sich zwar eine Verbesserung gegenüber den vorhergehenden Methoden (M006f) im Hinblick auf die Selektivität (**Abb. 4-18**), jedoch verschlechterte sich gleichzeitig die Trennleistung, was sich durch Peakverbreiterungen äußerte. In Summe ergab sich keine Verbesserung der Peakauflösungen (**Abb. 4-19, Tab. 8-14; M007f – M010f**) trotz erheblicher Erhöhung der

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Analysendauern. Unter diesen Aspekten und in Hinblick auf die weitere Methodenentwicklung (Teil II und III) zeigte sich die Methode mit dem 10-minütigen Gradienten (M006f) als am besten geeignet. Hier befanden sich die Auflösungen zwischen den einzelnen PEG-Oligomeren – mit wenigen Ausnahmen – immer im Akzeptanz- oder Idealbereich. Eine Verringerung der Gradientendauer um 2.5 min (M005) führt bereits zu schlechteren Ergebnissen und eine Erhöhung um 2.5 min (M007f) erzielte gleichbleibende Ergebnisse. So wurde diese Methode als Teil I der Gesamtmethode gewählt.

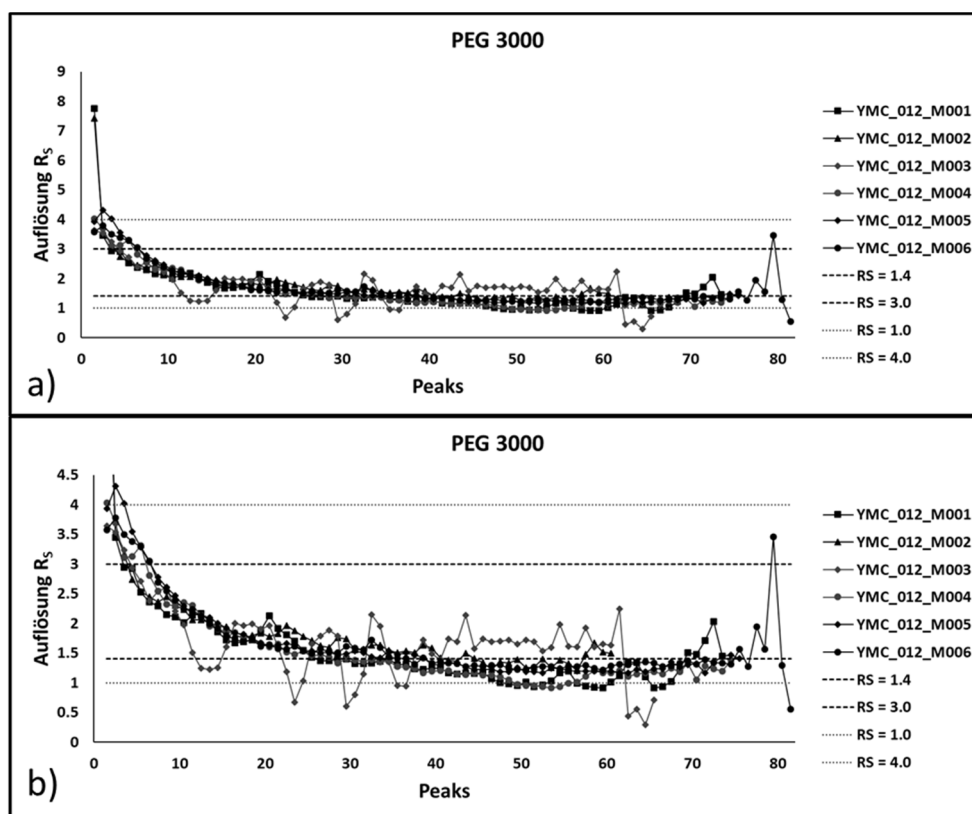


Abb. 4-16: Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 3000 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_012_M001 bis YMC_012_M006 mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Bestimmung der optimalen Zielkonzentration an ACN für höhere Oligomere. M001 (35 % ACN), M002 (32 % ACN) und M003 (32.5 % ACN). Modifikation der Gradientensteilheit über Variation der Gradientendauer: M004 (5 min; steilster Gradient), M005 (15 min) und M006 (20 min; flachster Gradient). **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

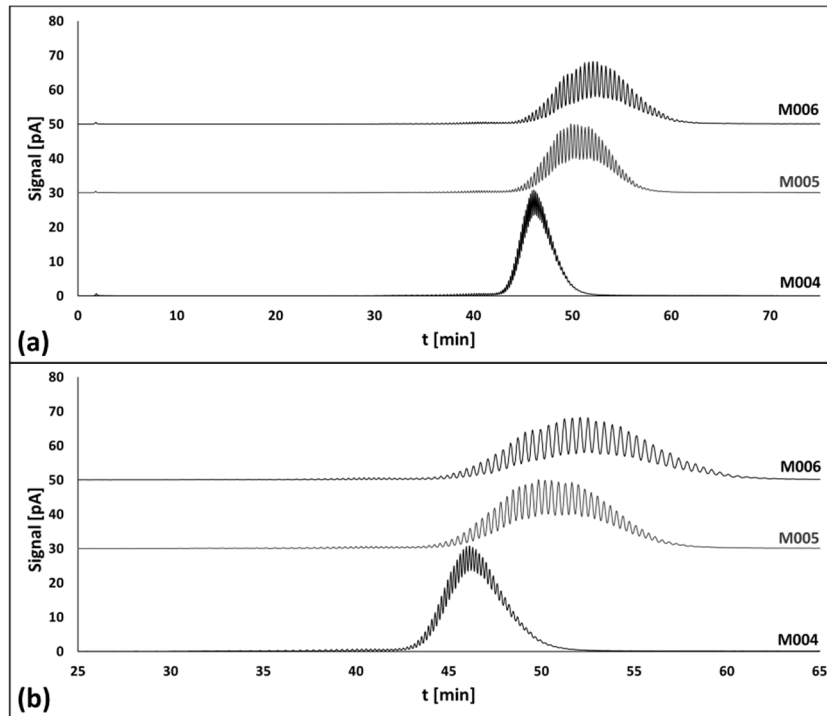


Abb. 4-17: Chromatogramme für PEG 3000 zum Vergleich der Methoden YMC_012_M004 (M004) bis YMC_012_M006 (M006) zur Bestimmung der optimalen Steilheit des Gradienten G3. Modifikation der Gradientensteilheit über Variation der Gradientendauer: M004 (5 min; steilster Gradient), M005 (15 min) und M006 (20 min; flachster Gradient). **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

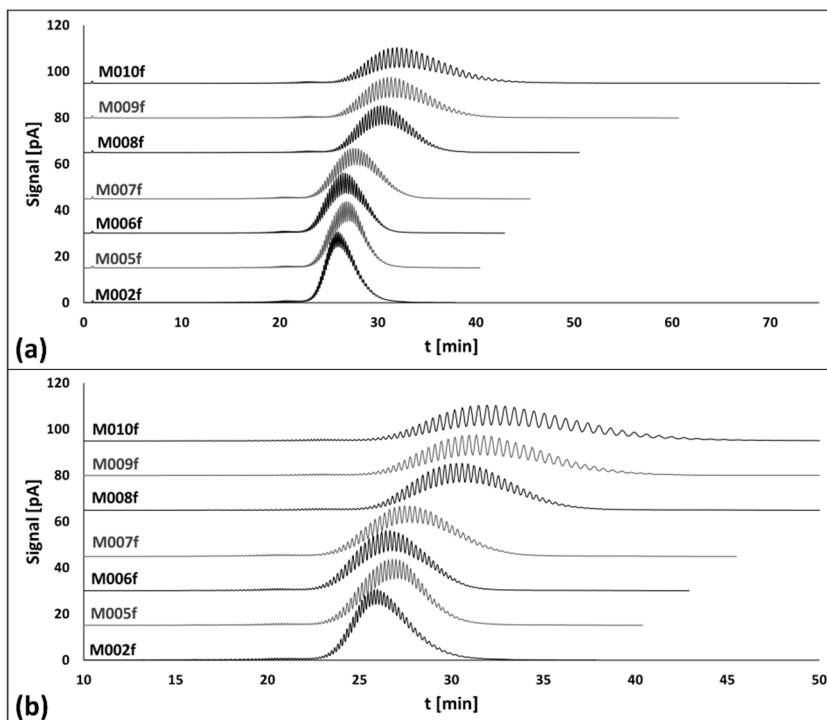


Abb. 4-18: Chromatogramme für PEG 3000 zum Vergleich der Methoden YMC_012_M002f (M002f) bis YMC_012_M010f (M010f) zur Bestimmung der optimalen Steilheit des Gradienten G3. Erhöhung der Flussrate auf 1.0 ml/min („f“). Modifikation der Gradientensteilheit des für höhere Oligomere relevanten Gradienten (30 % ACN auf 32.5 %) über Variation der Gradientendauer: 5 min (M002f), 7.5 min (M005f), 10 min (M006f), 12.5 min (M007f), 15 min (M008f), 25 min (M009f) und 40 min (M010f). **a)** Gesamtdarstellung. **b)** Relevanter Bereich.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

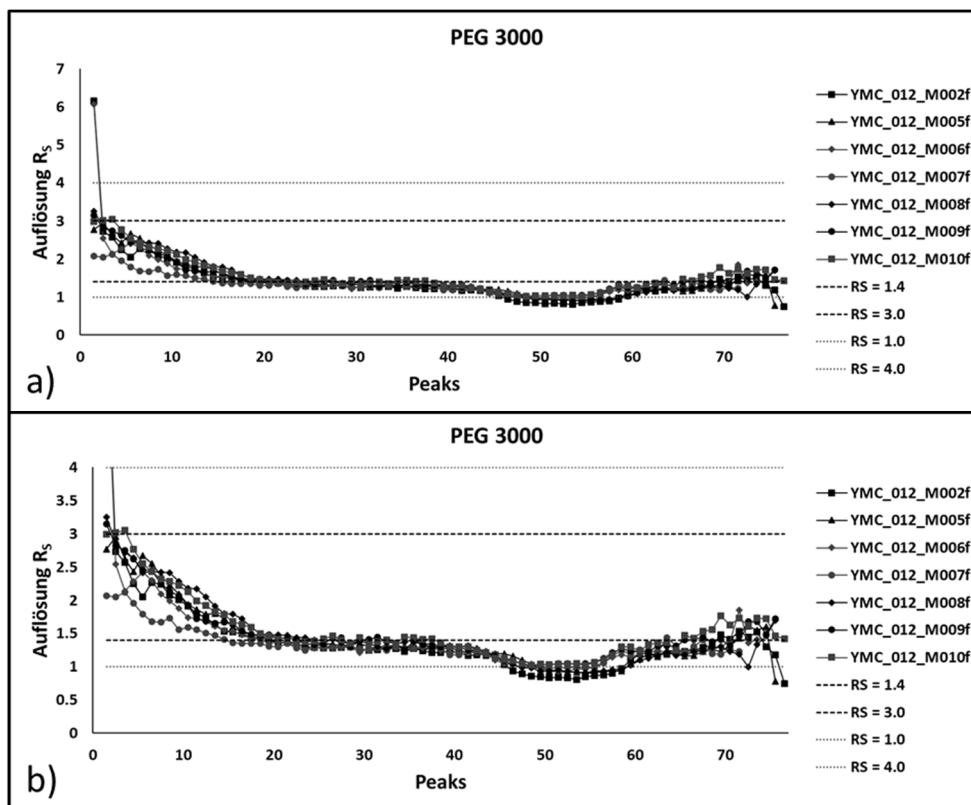


Abb. 4-19: Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 3000 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_012_M002f (M002f) bis YMC_012_M010f (M010f) mit Darstellung des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$) und des akzeptablen Bereiches ($1.0 < R_s < 4.0$). Erhöhung der Flussrate auf 1.0 ml/min („f“). Modifikation der Gradientensteilheit des für höhere Oligomere relevanten Gradienten (30 % ACN auf 32.5 %) über Variation der Gradientendauer: 5 min (M002f), 7.5 min (M005f), 10 min (M006f), 12.5 min (M007f), 15 min (M008f), 25 min (M009f) und 40 min (M010f). a) Gesamtdarstellung. b) Relevanter Bereich.

In **Abb. 4-20** ist der Gradient der Gesamtmethode grafisch dargestellt. Hier finden sich die einzelnen Gradienten und Plateaus veranschaulicht. So startet Teil I mit dem initialen Plateau (P1; 10 % B), das zur Abtrennung des Injektionspeaks und ggf. damit koelulierender hydrophiler Komponenten (Restionen der Lösungsmittel, Stabilisatoren, ...) von den kurzen PEG-Oligomeren dient. Anschließend folgt ein Gradient G1 auf 15 % B innerhalb von 5 min, gefolgt von einem 1.5-minütigen Plateau (P2), welches zur Elution der vorwiegend in PEG 300 und PEG 400 enthaltenen kurzen Oligomere sowie der Oligomere mittlerer Kettenlängen, welche den Hauptanteil von PEG 600 bilden, dient. Danach erfolgt die Elution der PEGs großer Kettenlängen, die den Hauptanteil von PEG 1000 und PEG 1500 bilden, durch den Gradienten G2, der innerhalb von 10 min auf 30 % B ansteigt. Durch den darauffolgenden Gradienten G3, der innerhalb von 10 min auf 32.5 % ansteigt, gefolgt von einem Plateau P3 über 7.5 min werden PEG 2000 und PEG 3000 getrennt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

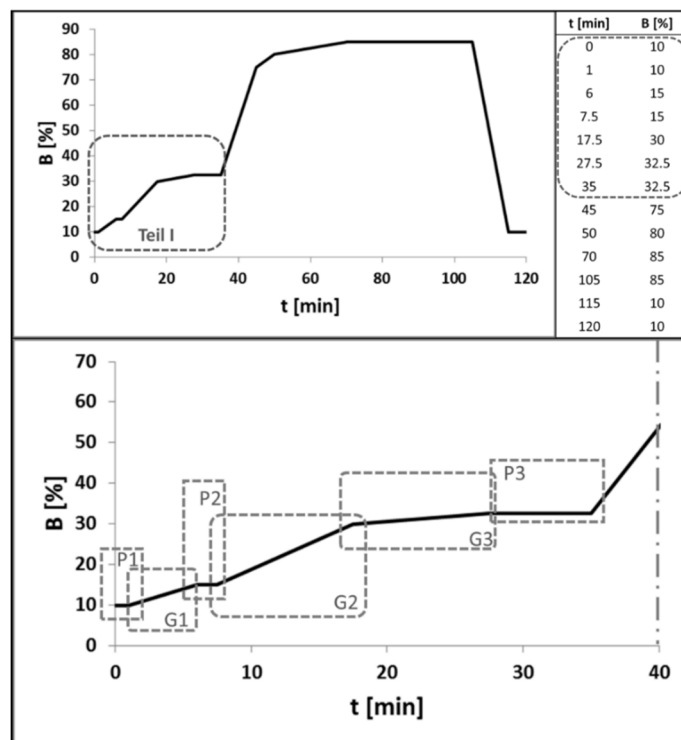


Abb. 4-20: Darstellung des ersten Teils der finalen Methode (YMC_D003_final) zur Trennung der hydrophilen Komponenten (PEGs) mit allen Subgradienten (G1 – G3) und Subplateaus (P1 – P3).

4.1.5. Verifizierung mittels LC/MS

Nachdem die Hauptmethode für die Trennung der PEGs optimiert war, wurde diese auf ein HPLC-System gekoppelt mit massenspektrometrischer Detektion (Ionenfalle) übertragen, um die vollständige Trennung der Oligomere zu überprüfen. Hierfür wurde nicht nur der finale Gradient von YMC_012_M006f (= LCMS_003), sondern auch die beiden Methoden YMC_009 (= LCMS_001) und YMC_012 (= LCMS_002) getestet, wobei diese beiden hauptsächlich dazu dienten in Voruntersuchungen die geeigneten Einstellungen für Parameter wie Probenstabilität, Vernebler- und Trocknungsgasstrom der Ionenfalle zu bestimmen. Die LC/MS-Messungen der PEGs zur Identifizierung der einzelnen Oligomere wurden dann mit der Methode LCMS_003 durchgeführt. Die Einstellungen zu den einzelnen Methoden finden sich in Kapitel **3.7.4**.

Es wurden lediglich die PEGs bis einschließlich PEG 1500 chromatographisch vermessen, um eine Kontamination der Ionenfalle durch die größten Polymere zu vermeiden. Da PEGs eine Oligomermischung sind, wurden die Proben mehrfach und mit unterschiedlichen Zielmassen vermessen, um möglichst den gesamten Messbereich der Oligomerverteilung mit ausreichender Detektorgenaugkeit abzudecken.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zur Berechnung der Sollwerte für m/z wurde eine Kalkulationstabelle in Excel erstellt, die eine Zusammenstellung verschiedener Kombinationen, wie die Ladungszahl z , sowie verschiedene Möglichkeiten der Adduktbildung, ermöglichte. Dem zugrunde lag folgende Gleichung **Gl. 9**:

$$m/z_{theor.} = \frac{(M_r(\text{term.}) + n(\text{EGE}) \times M_r(\text{EGE}) + n(\text{W}) \times M_r(\text{W}) + n(\text{Na}) \times M_r(\text{Na}) + n(\text{A}) \times M_r(\text{A}) + n(\text{AS}) \times M_r(\text{AS}))}{z} + z$$

Gl. 9

Die terminalen Enden der PEGs, bestehend aus einem verbleibenden H-Atom an einem Ende und einer OH-Gruppe am anderen, ergeben in Summe immer eine molare Masse von $M_r(\text{term.}) = 18.015 \text{ g/mol}$ (siehe auch Kapitel **1.1.1**). Die Anzahl (n) der anderen Komponenten ließen sich in der Kalkulationstabelle variieren: $n(\text{EGE})$ als Anzahl der Wiederholeinheiten mit einer molaren Masse von $M_r(\text{EGE}) = 44.03 \text{ g/mol}$ pro Einheit, $n(\text{W})$ als Anzahl der Wasser-Addukte mit $M_r(\text{W}) = 18.015 \text{ g/mol}$ pro Addukt, $n(\text{Na})$ als Anzahl der Natrium-Addukte mit $M_r(\text{Na}) = 22.99 \text{ g/mol}$ pro Addukt, $n(\text{A})$ als Anzahl der Acetonitril-Addukte mit $M_r(\text{A}) = 41.05 \text{ g/mol}$ pro Addukt und $n(\text{AS})$ als Anzahl der Ameisensäure-Addukte mit $M_r(\text{AS}) = 46.03 \text{ g/mol}$ pro Addukt. Dabei wurde zur Auswertung darauf geachtet, dass die einzelnen Addukte in ihrer jeweiligen Anzahl die Ladung z nicht überstiegen, d. h. $n(x) \leq z$, da dieser Fall ($n(x) > z$) deutlich seltener auftritt.

Die Ergebnisse sind in **Abb. 4-21** dargestellt. Im Anhang in den Tabellen **Tab. 8-15** bis **Tab. 8-19** sind die Zuordnungen der m/z zusammengefasst. Aufgrund der oft höheren Sensitivität der Ionenfalle im Vergleich zum verwendeten Corona[®] CAD [160, 161] wurden in den LC-MS-Messungen mehr Oligomere identifiziert als in den CAD-Messungen. Hauptsächlich wurden diese in den Randgebieten der Oligomerverteilung gefunden, d. h. die kürzesten und längsten Oligomere der jeweiligen Mischung, die nur noch in Spuren enthalten waren.

Des Weiteren wurden in manchen LC-MS-Messungen Peaks geringer Intensität zwischen den Hauptpeaks der einzelnen Oligomere identifiziert (siehe **Abb. 4-22**). Hierbei handelt es sich um den Vorgang der sogenannten „inneren Salzbildung“. Hierbei können Substanzen eines Gemisches gegenseitig in Wechselwirkung treten, sofern sie ähnliche Polaritäten aufweisen. Gleichzeitig beeinflussen sie sich dadurch gegenseitig in ihrer Wechselwirkung mit der stationären Phase, sodass diese „inneren Salze“ eine andere Retentionszeit aufweisen, als die beteiligten Komponenten im Einzelnen. Insbesondere zwischen Oligomeren, die sich nur in einer Wiederholeinheit unterscheiden, kann dies aufgrund ähnlicher Lipophilie auftreten. Die Identifikation dieser inneren Salze erfolgte ebenfalls unter Verwendung einer Excel-Kalkulationstabelle, der die Gleichung **Gl. 10** zugrunde lag.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

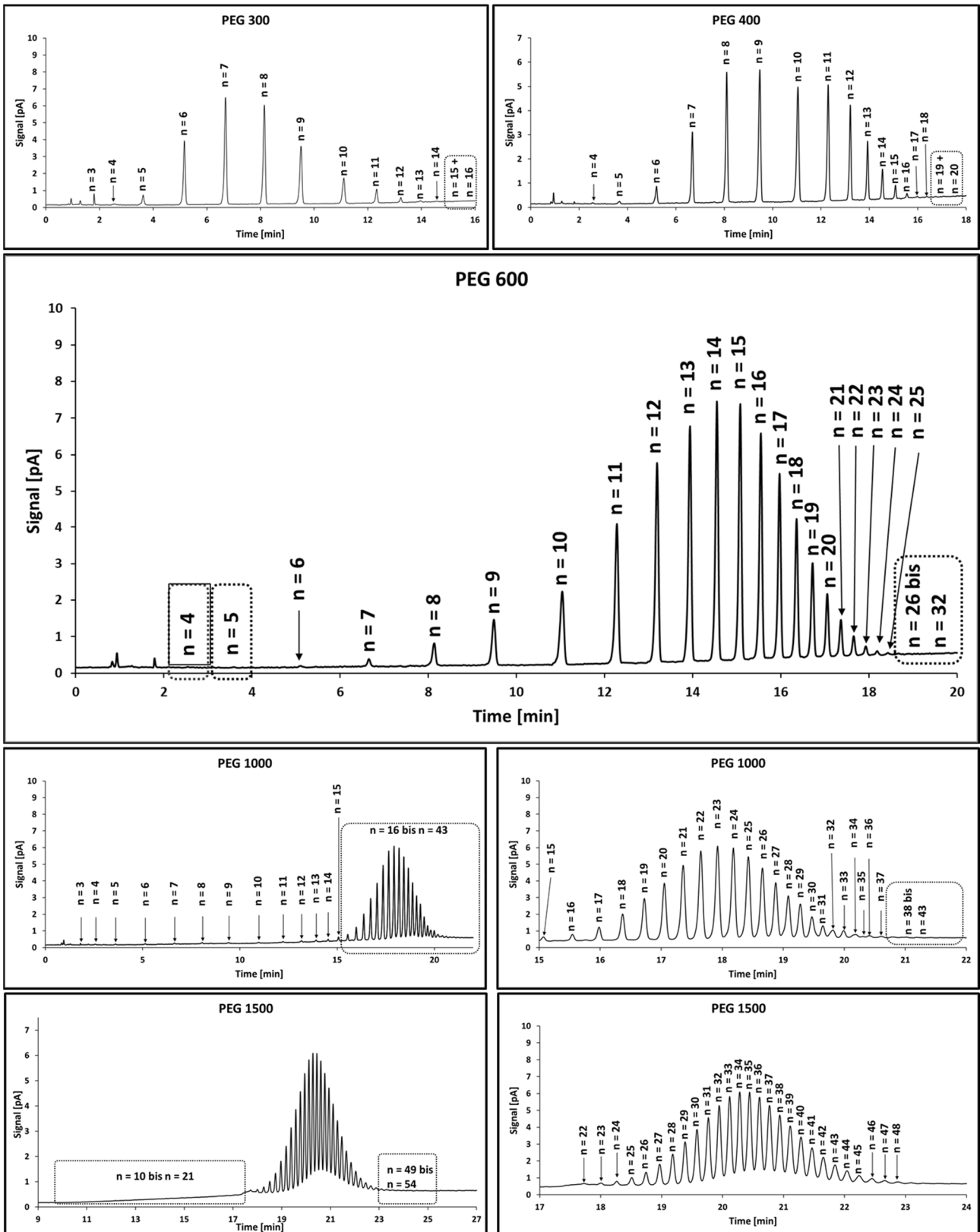


Abb. 4-21: Chromatogramme der LC/MS-Untersuchungen von PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1000 und PEG 1500. Zuordnung der PEG-Oligomere.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

$$m/z = \frac{2 \times M_r(\text{term.}) + M_r(\text{EGE}) \times (n_{(x)} + n_{(x+1)}) + n(\text{W}) \times M_r(\text{W}) + n(\text{Na}) \times M_r(\text{Na}) + n(\text{A}) \times M_r(\text{A}) + n(\text{AS}) \times M_r(\text{AS})}{z_{(x)} + z_{(x+1)}} + z_{(x)} + z_{(x+1)}$$

Gl. 10

Die Variablen $z(x)$ und $n(x)$ repräsentieren hierbei die Ladung und Kettenlänge des kürzeren Oligomers, sowie $z(x+1)$ und $n(x+1)$ entsprechend die des um eine Ethylenglycol-Einheit längeren Oligomers. Berechnet man nun anhand dieser Gleichung das theoretische m/z des inneren Salzes, das in **Abb. 4-22 (e)** dargestellt ist, so bestätigt sich ein inneres Salz aus den Kettenlängen $n = 8$ und $n = 9$ mit jeweils einfacher Ladung. Das theoretische Masse-zu-Ladungsverhältnis berechnet sich hierbei wie folgt:

$$\begin{aligned} m/z &= \frac{2 \times M_r(\text{term.}) + M_r(\text{EGE}) \times (n_{(x)} + n_{(x+1)}) + n(\text{W}) \times M_r(\text{W})}{z_{(x)} + z_{(x+1)}} + z_{(x)} + z_{(x+1)} \\ &= \frac{2 \times 18.015 \text{ g/mol} + 44.03 \text{ g/mol} \times (8 + 9) + 1 \times 18.015 \text{ g/mol}}{1+1} + 1+1 = 403.3 \end{aligned}$$

Der Vorgang der inneren Salzbildung ließ sich sehr gut im Bereich der kürzeren Kettenlängen beobachten, da hier die Selektivität und damit die Auflösung zwischen den einzelnen Kettenlängen ausreichend hoch ist. Bei PEGs mit größeren Kettenlängen ist anzunehmen, dass die Peaks der inneren Salze, sofern diese vorkamen, zumeist von den Hauptpeaks überlagert wurden.

Zusammenfassend lässt sich anhand der LC/MS-Bestimmungen sagen, dass die Methode dazu geeignet ist, die Oligomere im Bereich $n = 3 - 54$ sicher zu trennen. Innere Salzbildungen sind prinzipiell möglich, konnten aber nur in den LC/MS-Messungen in Spuren nachgewiesen werden. Insbesondere im Bereich der kurz- und mittelkettigen ($n = 3 - 16$) Oligomere waren sie sehr gut zu beobachten. Die Umstände ihres Auftretens wurden jedoch nicht weiter untersucht.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

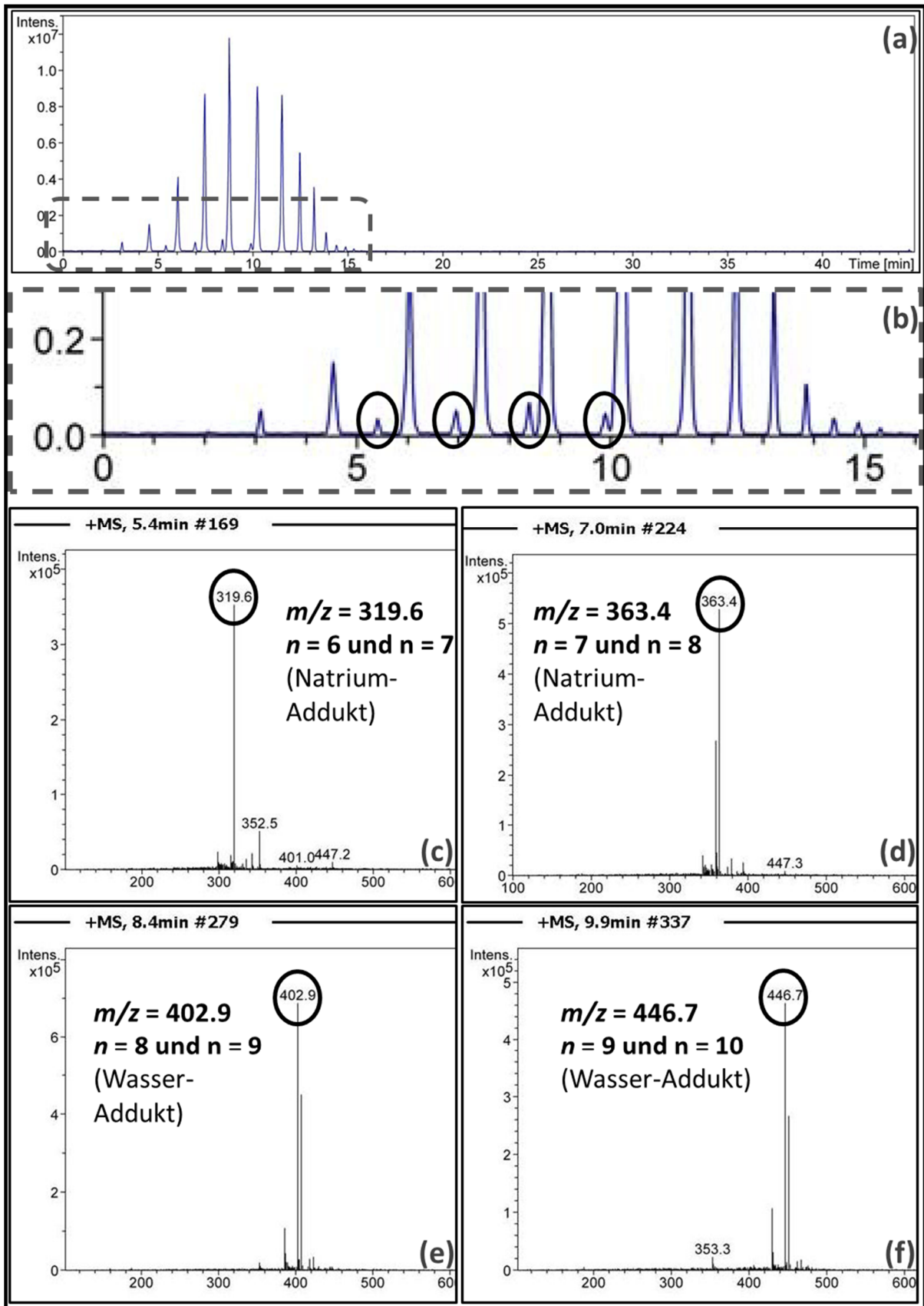


Abb. 4-22: Identifikation von inneren Salzen am Beispiel der Probe von PEG 400, vermessen bei der Zielmasse $t_m = 547$ g/mol. (a) Gesamtdarstellung. (b) Relevanter Ausschnitt. (c)–(f) Massenspektren der zusätzlichen Peaks mit den an der Salzbildung beteiligten Oligomer-Kettenlängen.

4.2. Teil 2: Methodenentwicklung zur Trennung der lipophilen Komponenten (FA und FAA)

Nach Abschluss der Methodenentwicklung für die hydrophilsten Komponenten wurden als nächstes Ziel die Trennung der Komponenten mit der am höchsten zu erwartenden Lipophilie, die Fettsäuren (FA) und die Fettalkohole (FAA), betrachtet. In dem Gesamtschema des finalen Gradienten ist dies als Teil II in **Abb. 4-23** dargestellt. Hierbei fällt auf, dass es sich lediglich um einen isokratischen Schritt handelt, der über sukzessive Annäherung bestimmt wurde.

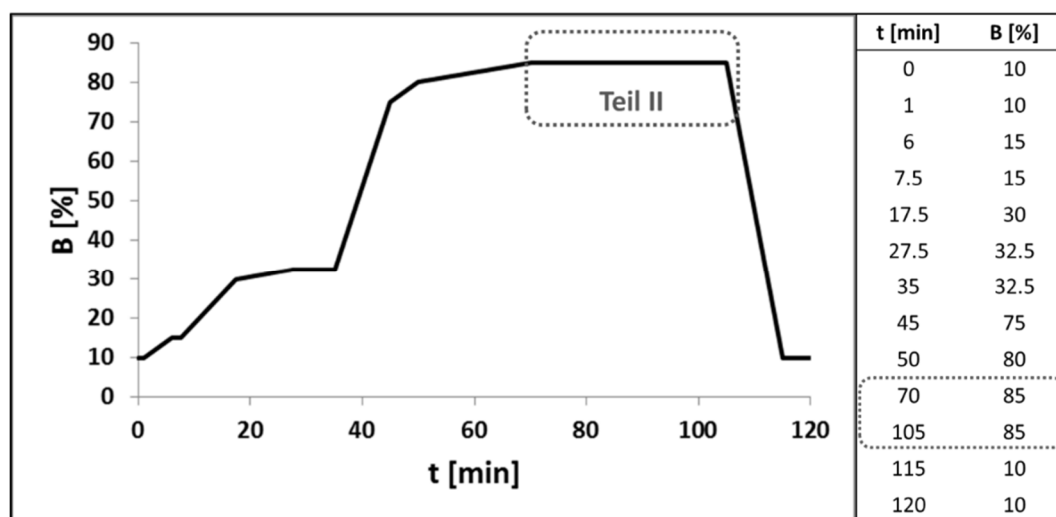


Abb. 4-23: Darstellung des zweiten Teils der finalen Methode (YMC_D003_final) zur Trennung der lipophilen Komponenten (FA und FAA). Isokratischer Bereich (85 % ACN bzw. mobile Phase B).

Zunächst war das Ziel über einen mehrstufigen Gradienten die Konzentration zu bestimmen, bei der die Fettsäuren größerer Kettenlängen eluiert werden, da anzunehmen war, dass diese stärker zurückgehalten werden. Hierfür wurde Stearinsäure Typ I verwendet, welche laut *Ph. Eur.* sowohl C18 FA als auch C16 FA enthält. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der höheren Fettsäuren ab C16 FA in ACN wurde MeOH als Lösungsmittel gewählt und dieser erste Bestimmungsschritt mit MeOH als organischem Fließmittel durchgeführt (MeOH_YMC_FA). Stufenweise wurde hier der MeOH-Anteil erhöht, jedoch wurde bis 70 % MeOH keine der beiden Substanzen eluiert, während es gleichzeitig zu einem deutlichen Anstieg des Grundrauschens kam, sodass die weitere Methodenentwicklung mit ACN erfolgte. Als Startbedingungen hierfür wurden 32.5 % ACN von Teil I gewählt. Durch Variation der Zielkonzentration (FA_YMC_001 – 003) und mit Hilfe nachfolgender Spülschritte, konnte eine Elution mit 80 – 90 % ACN beobachtet werden. Hieraus resultierte eine isokratische Methode bei 85 % ACN (FA_YMC_004), bei der alle betrachteten FA und FAA innerhalb von 40 min eluiert wurden (**Abb. 4-24**). Hierbei zeigten sich außerdem kleine, willkürliche Nebensignale, die vermutlich auf die vorhergehenden Injektionen zurückzuführen sind. Dabei handelte es sich vermutlich um auf der Säule verbliebene FA und FAA, die mit den ersten getesteten Gradienten nicht

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

eluiert wurden und erst später mit heruntergespült wurden. Da diese in späteren Läufen nicht mehr auftraten, wurden sie nicht weiter betrachtet.

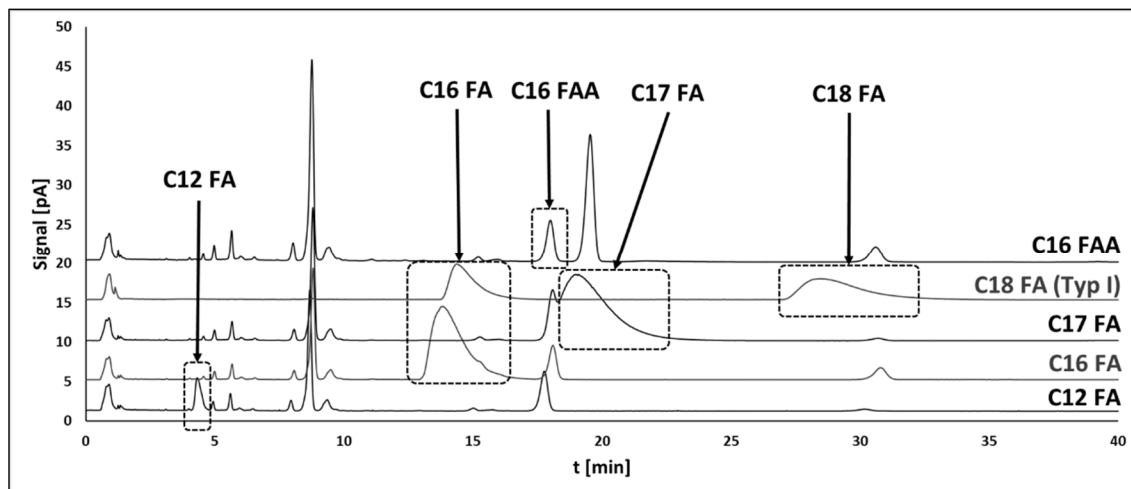


Abb. 4-24: Chromatographische Ergebnisse der einzelnen FA und FAA unter isokratischen Bedingungen (85 % ACN; FA_YMC_004). Das Auftreten zusätzlicher Peaks lässt sich vermutlich auf die unvollständige Elution der Substanzen aus vorhergehenden Entwicklungsschritten zurückführen.

Im Folgenden wurde dann ein geeigneter Gradientenverlauf von 32.5 % ACN auf den benötigten 85 % ACN-Anteil ermittelt (FA_YMC_005a – d). Des Weiteren wurde der Einfluss von Säurezugabe zu den Fließmitteln, in diesem Fall 0.025 % Ameisensäure (FA_YMC_005b und 005d), untersucht, da ohne Zusatz ein markantes *Tailing* der Fettsäuren zu beobachten war (**Abb. 4-25**). Dies ist auf eine partiellen Deprotonierung zurückzuführen, wobei beide Formen, protoniert und deprotoniert, unterschiedliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen können. Dadurch entstand das ausgeprägte *Peaktailing* bei den Fettsäuren, nicht aber beim Fettalkoholether (C16 FAA).

Um eine direkte Auswirkung des Säurezusatzes auf die PEGs ausschließen zu können, wurde eine Mischung aus C18 FA (Typ I) und PEG 3000 verwendet. Wie in **Abb. 4-26** zu sehen ist, beeinflusst der Säurezusatz ausschließlich die Fettsäuren. In **Abb. 4-27** zeigt sich sehr gut der Einfluss des Säurezusatzes auf Peakbreiten und Retentionszeiten der FA im Vergleich zu C16 FAA. So verringern sich die Peakbreiten und Halbwertszeiten der FA, während sie für C16 FAA konstant bleiben. Dies hatte zur Folge, dass die C17 FA ohne Säurezusatz nach und mit Säurezusatz vor C16 FAA eluiert wurde.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

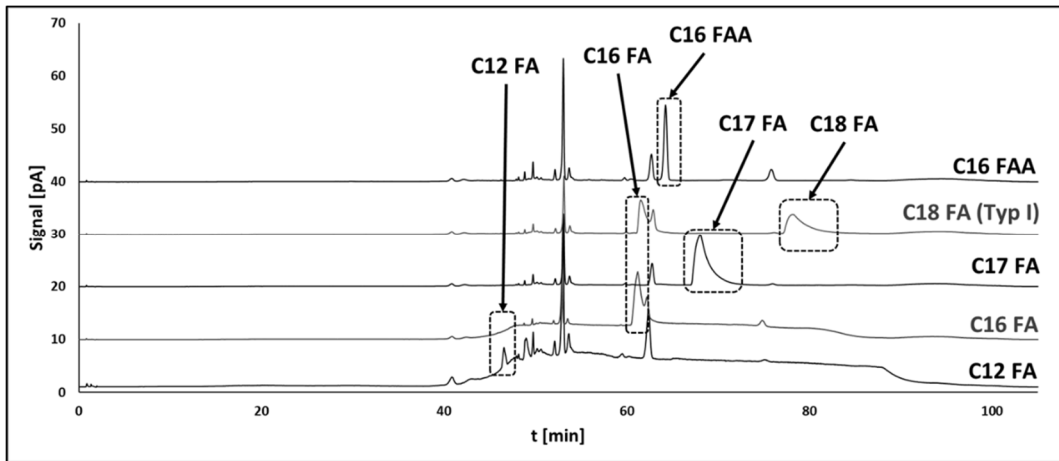


Abb. 4-25: Chromatogramme der Methode FA_YMC005a (Gradient von 32.5 % ACN auf 85 % in 10 min; kein Säurezusatz).

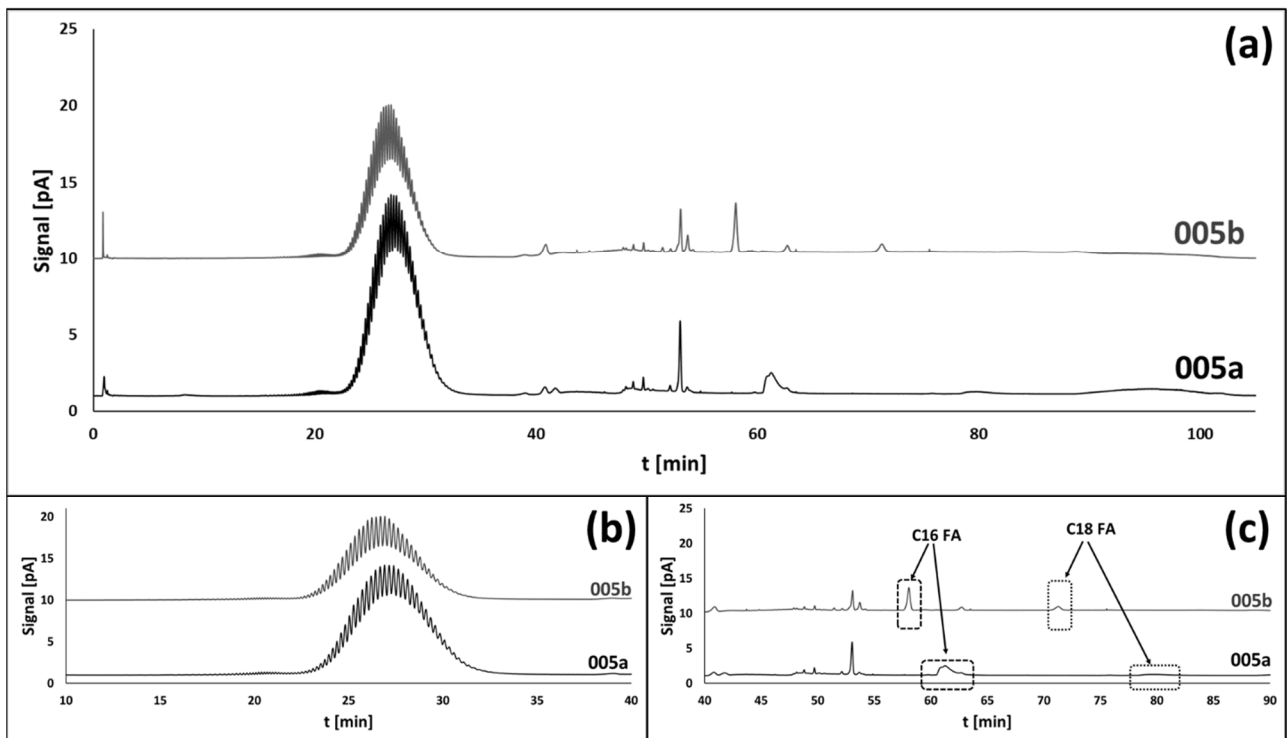


Abb. 4-26: Chromatogramme der Probe „PEG 3000 + C18 FA (Typ I)“ mit (005b) und ohne (005a) Säurezusatz. **(a)** Gesamtdarstellung **(b)** Ausschnitt PEG 3000. **(c)** Ausschnitt FA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

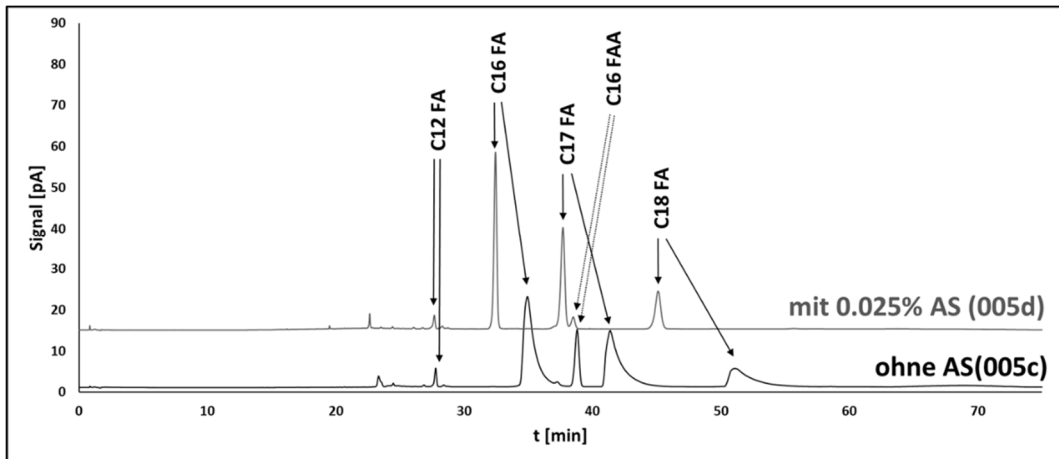


Abb. 4-27: Chromatogramme der gemischten Probe „Mix FA + FAA“ unter Verwendung der gekürzten Methoden (beginnend bei 32.5 % ACN) mit (005d) und ohne (005c) Säurezusatz (AS: Ameisensäure).

Die Gradientendauer der Gradientstufe von 32.5 % auf 85 % mobile Phase B (ACN mit 0.025 % AS) wurde weiterhin erhöht (006a – 007), jedoch ergaben sich hieraus keine weiteren Vorteile in Bezug auf die Trennung der FA und FAA (**Abb. 4-28**). Die Dauer von 10 min für diesen Teilschritt, wie in Methode 005d verwendet, war für die Trennung ausreichend.

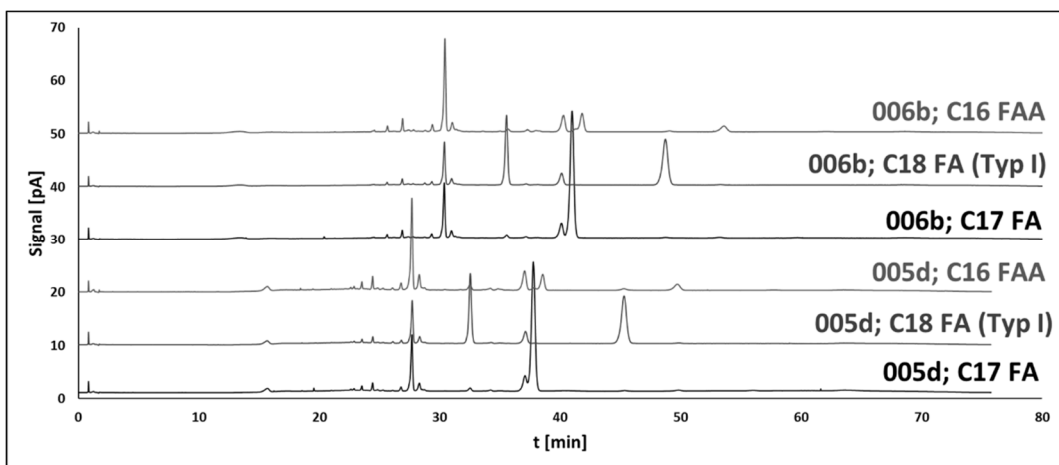


Abb. 4-28: Chromatogramme zum Vergleich der Methoden „005d“ (Gradientendauer 10 min) und „006b“ (Gradientendauer 20 min). Exemplarisch an drei Proben: C17 FA, C18 FA (Typ I) und C16 FAA.

Erwartungsgemäß bestätigte sich für alle Methoden, dass sich die Elutionsreihenfolge (**Tab. 4-2**) innerhalb der homologen Reihe nach der Anzahl an Kohlenstoffatomen richtet. Gesättigte FA zeigten eine, im Vergleich zu ungesättigten FA gleicher Kettenlänge, höhere Retention, welche sich darauf zurückführen lässt, dass die Interaktion der linearen gesättigten FA mit den „Borsten“ (Octadecylsilanolgruppen) der stationären Phase höher ist, als mit den gewinkelten Ketten der ungesättigten (Z)-Fettsäuren. Diese Vermutung wird dadurch

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

bestätigt, dass mit jeder weiteren, (Z)-konfigurierten Doppelbindung die Retentionszeit sinkt, wie C18 FA (ca. 75 min), C18:1 FA (ca. 65 min) und C18:2 FA (ca. 58 min) bewiesen.

Die FAA bestätigten ebenfalls den erwarteten Zusammenhang aus Kettenlänge und Retentionsverhalten. Außerdem wurden sie stärker retiniert, was sich aus der geringeren Polarität der Hydroxy-Gruppe im Vergleich zur Carbonsäure-Funktion erklären lässt. Dementsprechend sind die Retentionszeiten hier deutlich länger für C16 FAA (ca. 70 min) und C18 FAA (ca. 90 min) als bei den korrespondierenden Säuren C16 FA (ca. 64 min) und C18 FA (ca. 75 min). Aufgrund der geringeren Polarität interagieren die FAA auch intermolekular weniger, was, verglichen zu den entsprechenden FA, zu niedrigeren Schmelz- und Siedepunkten sowie einem höheren Dampfdruck führt (siehe **Tab. 1-1**). Daraus folgt eine vergleichsweise höhere Flüchtigkeit gegenüber den FA, die sich darin zeigte, dass die Laurinsäure (C12 FA) mittels CAD bereits detektierbar ist, während der entsprechende Laurylalkohol (C12 FAA) kein Detektorsignal erzeugte. Im Fall der FA waren alle betrachteten FA mit Kettenlängen < 12 (C6, C8 und C10 FA) nicht sichtbar.

Tab. 4-2: Retentionszeiten der FA und FAA unter Verwendung der finalen Methode (YMC_D003_final).

Substanz	Bezeichnung	durchschnittliche Retentionszeit [min]
Cetylalkohol	C16 FAA	70
Stearylalkohol	C18 FAA	90
Laurinsäure	C12FA	50
Myristinsäure	C14 FA	55
Palmitinsäure	C16 FA	64
Margarinsäure	C17 FA	69
Stearinsäure	C18 FA	75
Ölsäure	C18:1 FA	65
Linolsäure	C18:2 FA	58

4.3. Teil 3: Methodenzusammenführung zur Trennung der Ether und Ester

Die in 4.2 entwickelte Methode (FA_YMC_005b) wurde als Ausgangspunkt zur Trennung der Macrogolfettsäureester und -fettalkoholether verwendet. Da die Verwendung von 0.025 % Ameisensäure (AS) als Lösungsmittelzusatz bereits positiven Einfluss auf die Trennung der Fettsäuren zeigte, wurden im ersten Schritt verschiedene AS-Konzentrationen verwendet, um den optimalen AS-Zusatz zu bestimmen. Die verwendeten Konzentrationen waren 0.05 % (YMC_D001), 0.5 % (YMC_D002) und 0.1 % AS (DYMC_D003). Betrachtet wurden nun, neben den PEGs, FA und FAA, auch eine Auswahl Macrogol-basierter Stoffe: Myrj® 45, Myrj® 52, Myrj® 59, Cremophor® RH40 und Thesit®.

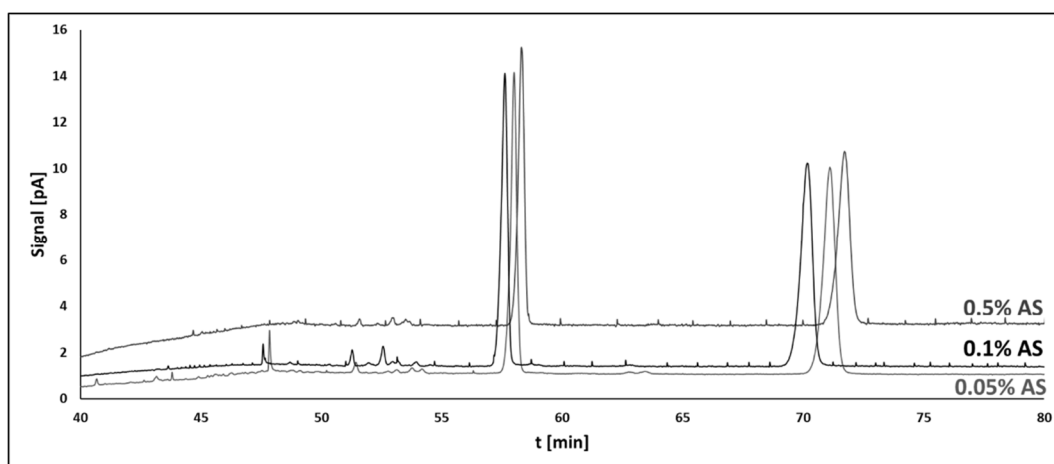


Abb. 4-29: Chromatogramm mit Originalskalierung von C18 FA (Typ I) mit verschiedenen Konzentrationen an Säurezusatz (YMC_D001 bis YMC_D003). Zusatz von 0.05 % (D001), 0.5 % (D002) und 0.1 % (D003) Ameisensäure (AS).

Für C18 FA (Typ I) kam es bei der Erhöhung von 0.05 % („D001“) auf 0.1 % („D003“) Ameisensäure (AS) zu der erwartenden Verkürzung der Retentionszeiten (**Abb. 4-29**); dies wurde bei der höchsten Konzentration nicht beobachtet. Ob ein Kausalzusammenhang der Konzentration zur erneuten Erhöhung der Retentionszeit besteht, wurde nicht untersucht. Für die Oligo- und Polymere, sowohl PEGs als auch die hier zunächst betrachteten Derivate, waren keine Veränderungen der Trennung aufgrund des Säurezusatzes zu beobachten (**Abb. 4-30**). Bei 0.5 % AS-Zusatz („D002“) wurde das höchste Grundrauschen beobachtet. Überraschenderweise zeigte sich für 0.1 % („D003“) AS-Zusatz in den meisten Proben das geringste Grundrauschen. In **Tab. 4-3** finden sich die Ergebnisse zu den jeweiligen Konzentrationen. Wie deutlich zu sehen ist, erhöht sich das Rauschen mit steigender Säurekonzentration, während die Peakbreiten relativ konstant bleiben. Eine AS-Konzentration von 0.05 % ist ausreichend um das *Peaktailing* aufgrund von Deprotonierungen der Fettsäuren einzuschränken. Die größte Verkürzung der Retentionszeiten erfolgte mit einem Zusatz von 0.1 % AS. Unter Berücksichtigung der Verkürzung der Retentionszeiten sowie des vergleichbaren Grundrauschens wurde der Zusatz von 0.1 % AS zu beiden Fließmitteln gewählt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auf die Verwendung der höchsten AS-Konzentration von 0.5 % wurde verzichtet, einerseits aufgrund des höheren Grundrauschens, welches sich vermutlich auf nicht-verdampfbare Rückstände der Ameisensäure zurückführen lässt. Andererseits liegt diese Konzentration bereits im Grenzbereich des pH-Bereiches der Säule (pH 2 – 8). Somit wurde zugunsten der Sensitivität, sowie zur Erhöhung der Lebensdauer der Säule, der Ansatz mit der höchste AS-Konzentration verworfen.

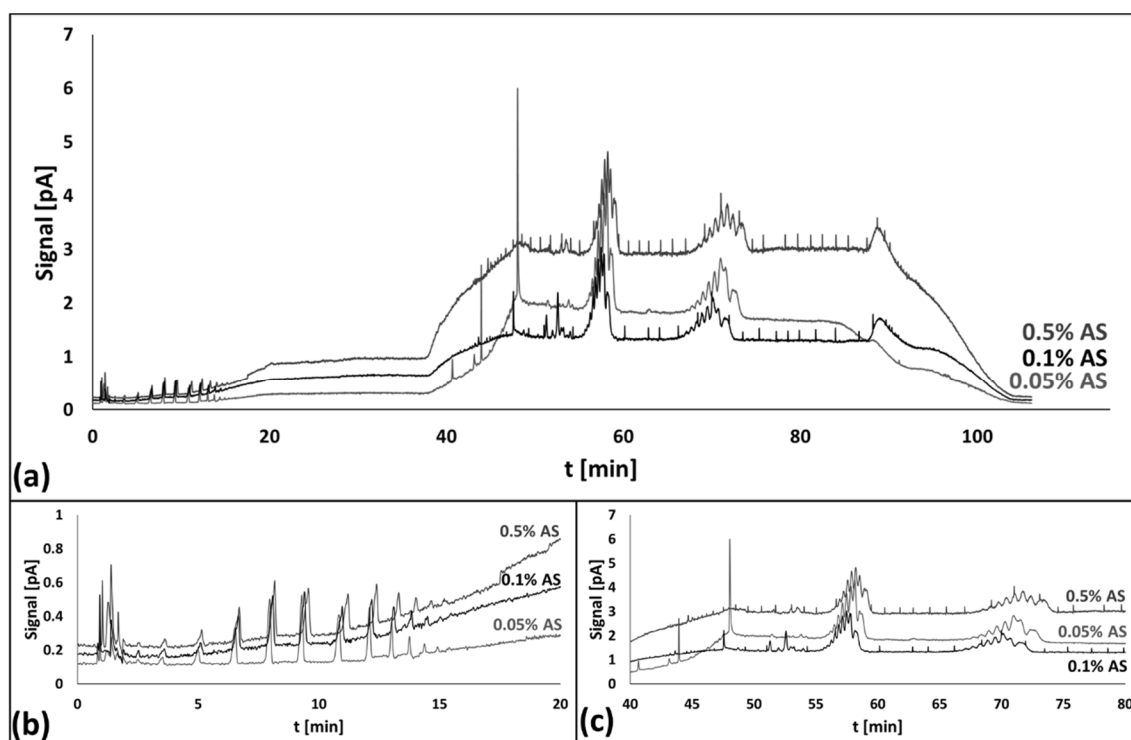


Abb. 4-30: Chromatogramm mit Originalskalierung von Myrj® 45 mit verschiedenen Konzentrationen an Säurezusatz (YMC_D001 bis YMC_D003). Zusatz von 0.05 % (D001), 0.5 % (D002) und 0.1 % (D003) Ameisensäure (AS). D002 und D003 wiesen vermehrt *Spike*-Peaks (= willkürlich auftretende Peaks, die keiner Substanz zugehörig sind) auf, welche sich auf die häufigen Fließmittelwechsel zurückführen lassen. **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Auswahlbereich PEGs. **(c)** Auswahlbereich Ester.

Ein Kritikpunkt dieser Methode bildet die lange Analysendauer von 105 min. Aus diesem Grund wurde für die zur ersten Untersuchung verwendeten Stoffe (Myrj® 45/52/59, Cremophor® RH40 und Thesit®) ein Ansatz zur stoffspezifischen Methodenverkürzung untersucht. So wurden die beiden Methoden YMC_D003_Low, für Derivate bestehend aus kürzeren PEG-Kettenlängen, und YMC_D003_High, für Derivate bestehend aus längeren PEG-Kettenlängen, entwickelt (im Weiteren als „Low“ bzw. „High“ abgekürzt). Hierbei richten sich die Methoden gezielt danach, in welcher Größenordnung die freien PEGs im Analyten vorliegen. Aufgrund der definierten Zusammensetzung sollten sich Myrj® 45 (Macrogol-8-Stearat) überwiegend kürzere PEG-Oligomere finden lassen, während in Myrj® 59 (Macrogol-100-Stearat) deutlich länger-kettige PEG-Oligomere maßgeblich sein sollten. Es wird in der Methode „Low“, mit dem Anwendungsbereich kurzkettiger Ester/Ether, auf die Gradientenstufe von 30 % auf 32.5 % mobile Phase B gänzlich verzichtet, da der Gradient zur Auftrennung höherer PEG-Kettenlängen nicht notwendig ist. Umgekehrt wird in der Methode „High“ auf

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

die erste Gradientenstufe von (10 % auf 15 % B) verzichtet, da in den Estern/Ethern mit längeren PEG-Ketten nicht mit kurzen PEG-Kettenlängen zu rechnen ist. Hier wurde der Gradient G1 direkt von 10 % auf 30 % B geführt. Für Ester/Ether mit mittleren PEG-Ketten wie beispielsweise Brij® S20 (Macrogol-20-stearylether) ist anzunehmen, dass der Gradient von YMC_D003 nicht verkürzt werden kann, sondern vollständig ablaufen muss. Generell ist eine einheitliche Methode zugunsten der Praktikabilität nach wie vor zu bevorzugen, womit sich YMC_D003 bislang als bester Kompromiss darstellte und die beiden Methoden „High“ und „Low“ nur als mögliche Zusatzoptionen zu bewerten sind.

Tab. 4-3: Übersicht zum Einfluss der Säurekonzentration auf verschiedene Messgrößen der Fettsäuren. Zusatz von 0.05 % (D001), 0.5 % (D002) und 0.1 % (D003) Ameisensäure.

	C12 FA	C16 FA	C17 FA	C 18 FA
YMC_D001 (0.05 % AS)				
t _R [min]	46.3	58.0	63.5	58.0 (C16) 71.1 (C18)
b _{0.5} [min]	0.18	0.25	0.30	0.27 (C16) 0.43 (C18)
Rauschen (Bereich) [pA]	0.1 – 1.1	0.1 – 1.1	0.1 – 1.1	0.1 – 1.1
<hr/>				
YMC_D002 (0.5 % AS)				
t _R [min]	48.0	58.2	63.8	58.3 (C16) 71.7 (C18)
b _{0.5} [min]	0.10	0.24	0.38	0.27 (C16) 0.43 (C18)
Rauschen (Bereich) [pA]	0.25 – 3.1	0.25 – 3.2	0.25 – 3.1	0.25 – 3.2
<hr/>				
YMC_D003 (0.1 % AS)				
t _R [min]	47.9	57.7	62.8	57.6 (C16) 70.2 (C18)
b _{0.5} [min]	0.10	0.24	0.32	0.28 (C16) 0.54 (C18)
Rauschen (Bereich) [pA]	0.2 – 1.4	0.2 – 1.4	0.2 – 1.4	0.2 – 1.4

Der direkte Gradient auf 85 % B (ACN mit 0.1 % AS) erwies sich insbesondere für die Trennung der FA und FAA als vorteilhaft, jedoch wurden einige der Ester und Ether nur schlecht getrennt. Aus diesem Grund wurde dieser einfache Gradient ähnlich zu Teil I (hydrophile Komponenten) in zwei Methoden (YMC_D003_S2M_001 und YMC_D003_S2M_002; im Weiteren S2M_001 bzw. S2M_002) auf drei einzelne Stufen aufgeteilt, wobei sich die beiden im ersten Gradientenschritt (75 % auf 80 % B) unterscheiden, welcher bei S2M_002 flacher verlief. Bei beiden Methoden handelte es sich wieder um Teilmethoden, die nur die

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

lipophilen Strukturen, FA, FAA, Ester und Ether, abdeckten und später mit dem Methodenteil für die hydrophilen Komponenten (Teil I) zusammengesetzt werden sollten. S2M_001 zeigte sich als beste Variante für das Kollektiv aus allen betrachteten Substanzen, weshalb diese dann mit dem Gradienten des hydrophilen Methodenteils zu der finalen Methode (YMC_D003_final) zusammengesetzt wurde.

Lediglich in der Auftrennung der FA und FAA war die finale Methode YMC_D003_final der Methode YMC_D003 unterlegen, da es zur verringerten Trennung zwischen C16 FAA und C17 FA kam (**Abb. 4-31**), jedoch ist ein gleichzeitiges Auftreten beider Substanzen in derselben Probe in den zur Bestimmung hier eingesetzten Mengen nicht zu erwarten, da C17 FA vorwiegend in tierischen Produkten von Wiederkäuern (z. B. Milch) in nennenswerten Mengen (< 1 %) vorkommt [162] und C16 FAA oft synthetisch, bspw. durch Reduktion von C16 FA, hergestellt wird [53, 163].

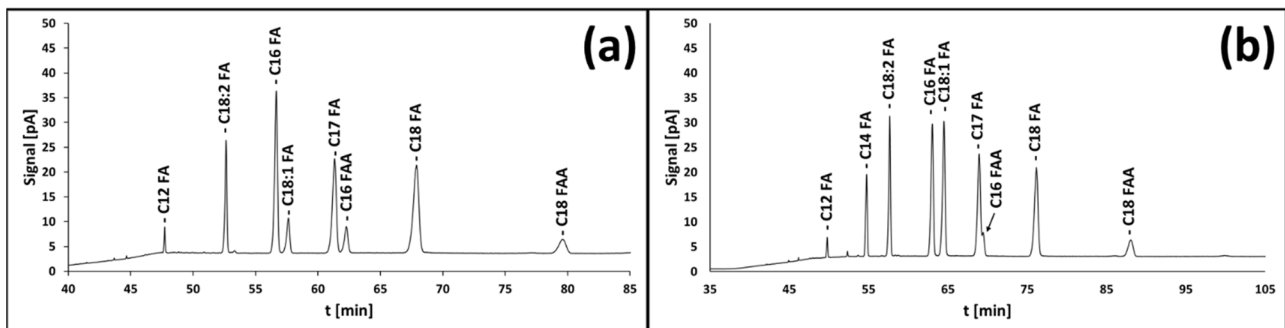


Abb. 4-31: Vergleich der Methoden **(a)** YMC_D003 (einstufiger linearer Gradient zwischen hydrophilem und lipophilem Methodenteil; 32.5 % → 85 % mobile Phase B) und **(b)** YMC_D003_final (dreistufiger Gradient als Verbindung; 32.5 % → 70 % → 80 % → 85 % B) für eine Mischung aus FA und FAA. (Anm.: C14 FA war bei den Untersuchungen zu YMC_D003 noch nicht als Referenz enthalten).

Die grafische Veranschaulichung des Gradienten der finalen Methode findet sich in **Abb. 4-32** dargestellt. Die im Folgenden betrachteten Methoden sind:

- die direkte lineare Verknüpfung aus Teil I und II (YMC_D003)
- die verkürzten Methoden zu speziellen Betrachtungen („Low“ und „High“)
- die separat für Teil III entwickelten Methoden (S2M_001 und S2M_002)
- die aus dem hydrophilen Teil (M006f) und S2M_002 zusammengesetzten finalen Methode (YMC_D003_final)

Die Ergebnisse hierzu finden sich in den nachfolgenden Unterkapiteln separat zu jeder Substanz. Anschließend wurde für die final gewählte Methode zu jedem Macrogol-basierten Hilfsstoffe eine Dreifachbestimmung einer stärker verdünnten Probe (0.1 mg/ml-Lösung) durchgeführt, um Faktoren wie Spezifität und Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Die Ergebnisse ließen sich zwar in Bezug auf die Ester und

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ether vergleichen, jedoch war die Probenkonzentration für die frei vorliegenden Bestandteile (PEGs, FA, FAA) in einigen Proben zu gering gewählt. Um diese mit zu erfassen, sollte die Konzentration der Proben im Bereich 1 mg/ml liegen, welche im Folgenden als Referenzmessung (R) mit dargestellt wurden.

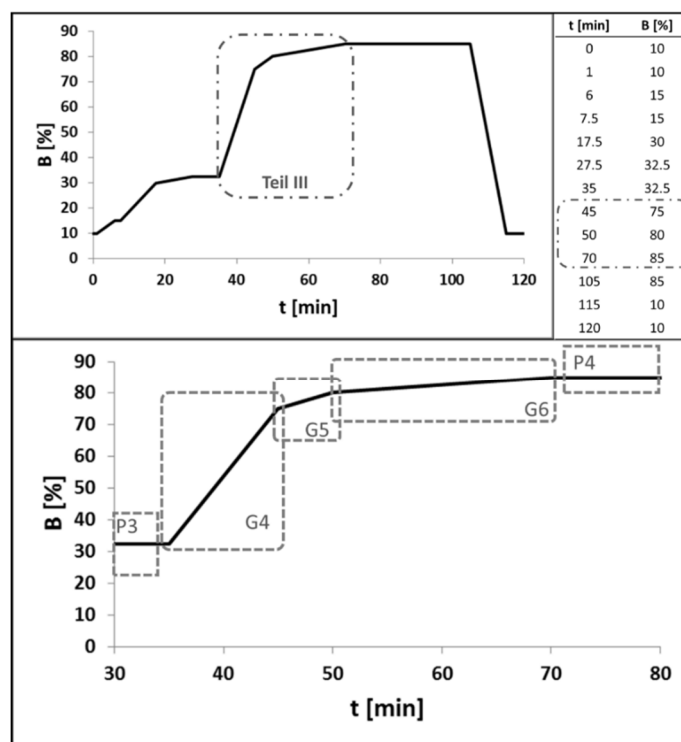


Abb. 4-32: Darstellung des dritten Teils der finalen Methode zur verbesserten Auftrennung der Ether und Ester mit allen Untergradienten (G4 – G6) und der finalen Plateauphase (P4; Teil II).

4.3.1. Ergebnisse: Fettalkoholether

4.3.1.1. Macrogol-4-laurylether (Brij® 30)

Nominell setzt sich Brij® 30 aus Laurylethern mit PEGs einer mittleren Kettenlänge von $n = 4$ (**Tab. 1-2**) zusammen. Außerdem können freie PEGs sowie freier Laurylalkohol (C12 FAA) vorliegen, wobei der Alkohol aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit nicht mit dem CAD detektierbar ist. Aufbauend auf den in Kapitel **4.2** erhaltenen Erkenntnissen war zu erwarten, dass die Alkohole deutlich höhere Retentionszeiten aufweisen als die korrespondierenden Säuren, sodass auch die Fettalkoholether länger retiniert werden als die korrespondierenden Fettsäureester.

In **Abb. 4-33 a** und **b** wurden die freien PEGs tatsächlich in Bereichen höherer Kettenlängen von $n = 8 - 16$ ($t_R = 6 - 19$ min) detektiert, was durch den Vergleich mit den verwendeten Referenzen von PEG 300 und PEG 400 klar zu erkennen ist. Es werden zwei separat getrennte Verteilungsmuster der Ether beobachtet. Die früher eluierende Verteilung (49 – 52 min) liegt im Retentionsbereich, der der Retentionszeit der C12 FA

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

entspricht, während die später eluierende Etherverteilung (55 – 60 min) eher in den Retentionsbereich der C18:2 FA fällt, wobei hier anzunehmen ist, dass dieser Retentionsbereich für den C12 FAA angenommen werden kann.

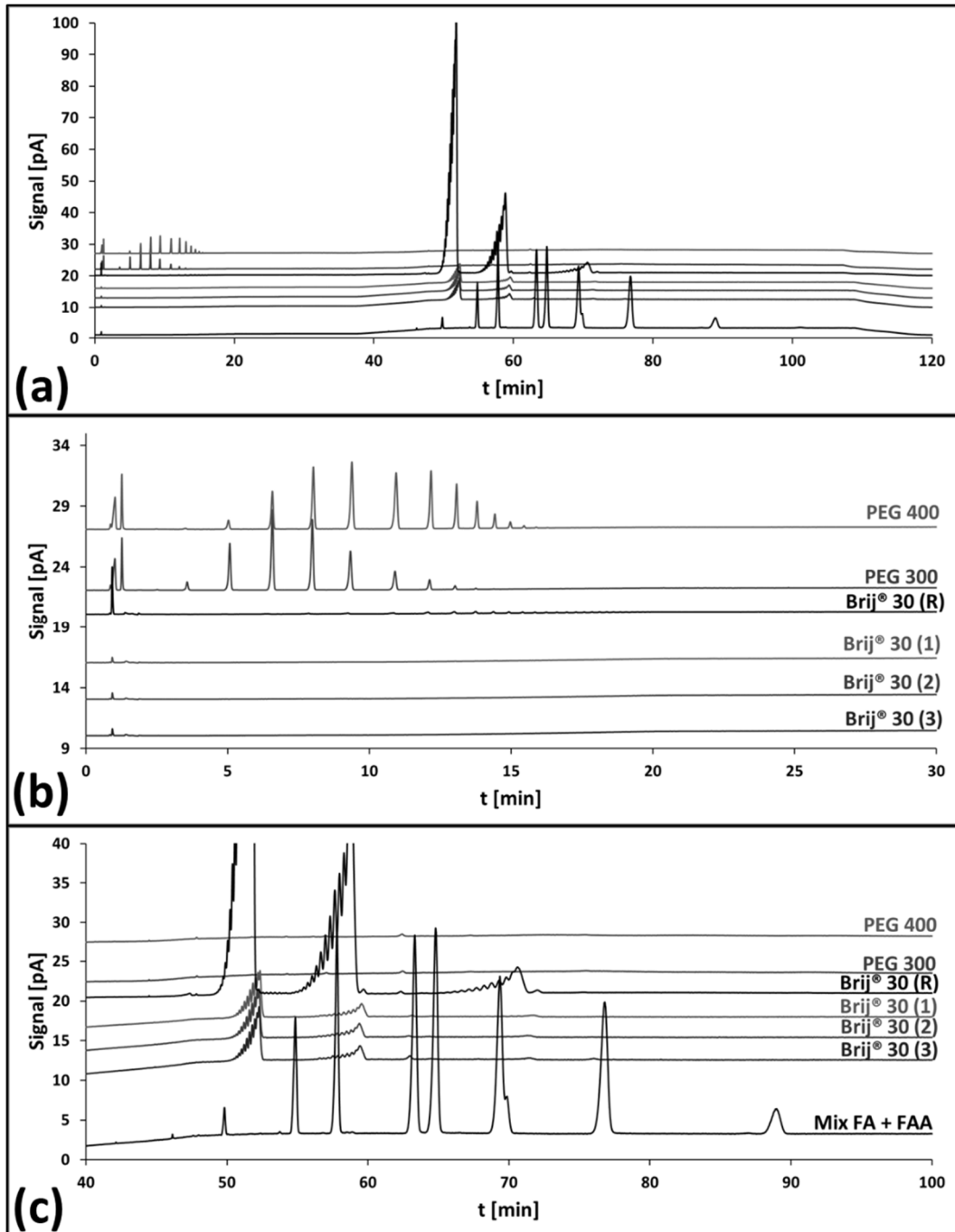


Abb. 4-33: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij[®] 30 (1.260 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (107.41 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 300 (96.01 µg/ml), PEG 400 (104.24 µg/ml) und „Mix FA + FAA“ (jeweils ca. 100 µg/ml von C12 FA, C14 FA, C16 FA, C17 FA, C18 FA, C18:1 FA, C18:2 FA, C16/18 FAA). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ether und FAA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Basierend auf der Vermutung, dass höhere PEG-Ketten bei der Veretherung den lipophilen Einfluss des FAA verringern, ist anzunehmen, dass die früher eluierende Etherverteilung aus Ethern mit höheren PEG-Ketten, wie etwa denen der gefundenen freien PEGs ($n = \text{ca. } 8 - 16$), bestehen, während die später eluierenden Ether weniger EGE aufweisen. Diese Vermutung wurde auch durch die noch folgenden Ergebnisse der Bestimmung von Thesit[®] gestützt.

Abb. 4-34 zeigt, dass die finale Methode YMC_D003_final im Vergleich zu YMC_D003 die Ether unterschiedlicher Kettenlängen besser trennt. YMC_D003_final setzt sich aus den Ausgangsbedingungen von YMC_D003 und den Modifikationen aus S2M_001 zusammen. Zwar zeigte S2M_002 marginale Verbesserungen im Bereich der Etherverteilung, jedoch waren diese nicht ausreichend um die um 15 min höhere Laufzeit zu rechtfertigen.

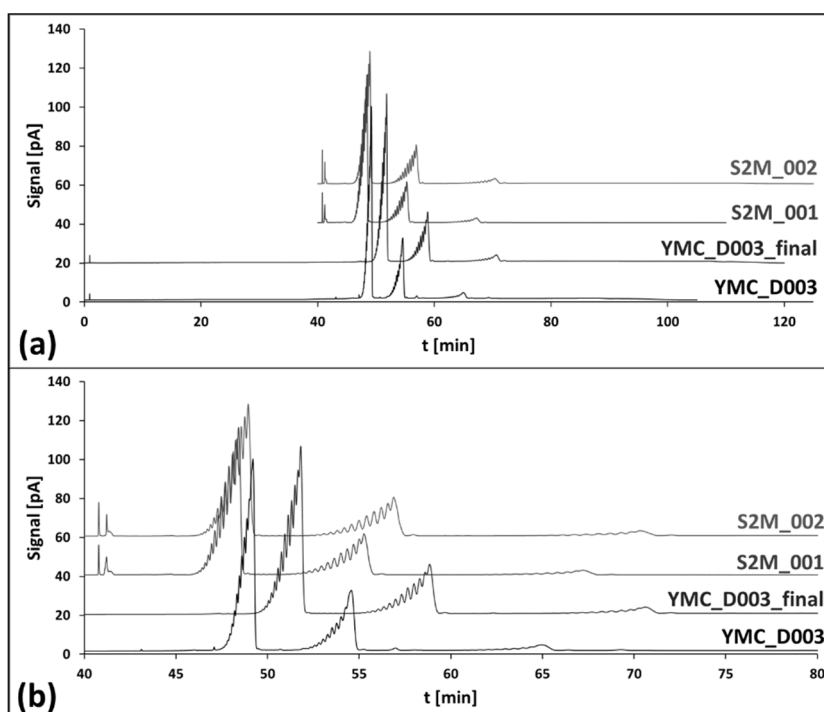


Abb. 4-34: Chromatogramme von Brij[®] 30 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassten, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.3.1.2. Macrogol-9-laurylether (Thesit[®])

Ähnlich wie bei Brij[®] 30 wurden in Thesit[®] freie PEGs beobachtet, welche in einem höheren Bereich ($n = \text{ca. } 10 - 35$; $t_R = 7 - 21$ min), als dem erwarteten von durchschnittlich $n = 9$ lagen. Sie wurden mittels Vergleich zu den Referenzen PEG 400 und PEG 600 bestimmt (**Abb. 4-35 b**) und wurden aufgrund ihrer geringen Menge ausschließlich in der höherkonzentrierten Referenzprobe detektiert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Betrachtet man die Ergebnisse in **Abb. 4-35 c**, dann ist hier nur eine einzelne Etherverteilung zu erkennen, deren Retentionszeiten im Bereich 49 – 52 min liegen. Dies bestätigt die Vermutung, dass es sich bei der früher eluierenden Etherverteilung aus Brij® 30 um Ether höherer PEG-Kettenlängen handeln muss.

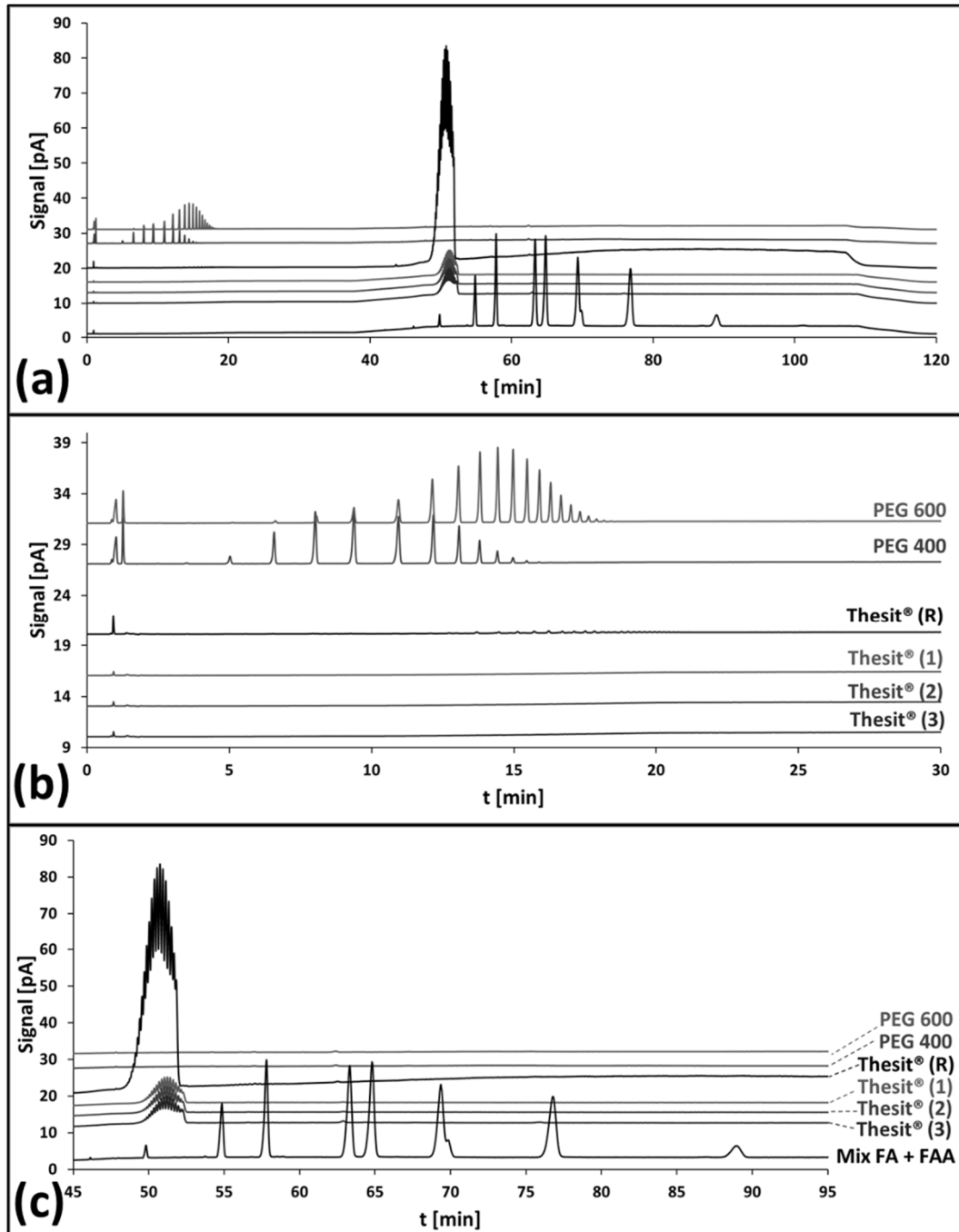


Abb. 4-35: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Thesit® (0.9894 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (105.42 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 400 (104.24 µg/ml), PEG 600 (102.73 µg/ml) und „Mix FA + FAA“ (jeweils ca. 100 µg/ml von C12 FA, C14 FA, C16 FA, C17 FA, C18 FA, C18:1 FA, C18:2 FA, C16/18 FAA). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ether und FAA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Betrachtet man die Ergebnisse der verschiedenen Methoden im Vergleich, so erkennt man aus **Abb. 4-36**, dass die äquivalenten Methoden S2M_001 und YMC_D003_final die Etherverteilung geringfügig besser trennte als YMC_D003, während S2M_002 keinen weiteren Vorteil bietet. Somit ist auch hier die Methode YMC_D003_final die beste Wahl.

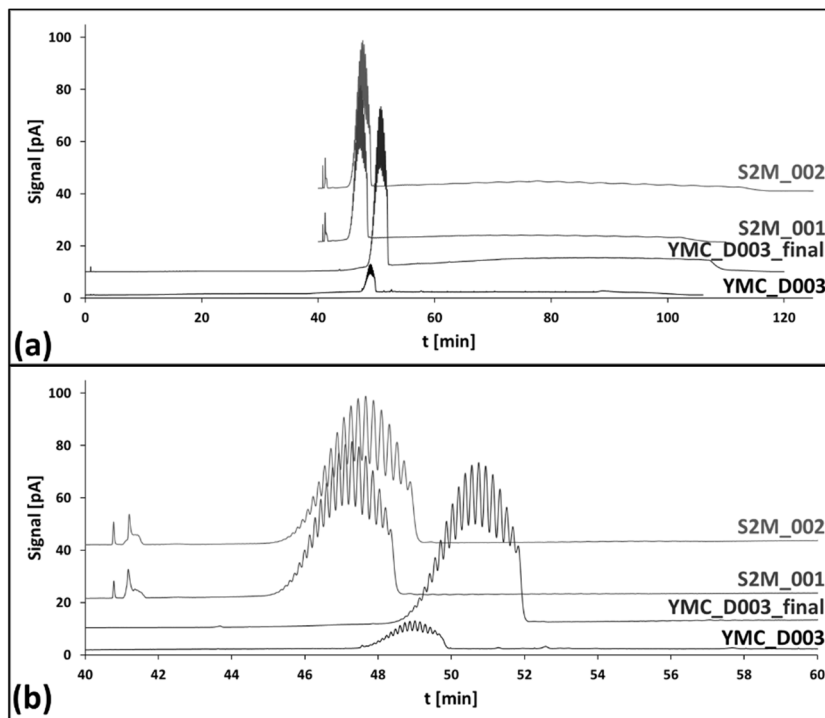


Abb. 4-36: Chromatogramme von Thesit[®] zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.3.1.3. Macrogol-2-cetylether (Brij[®] 52)

Im Gegensatz zu den vorhergehend betrachteten Laurylethern war für den Cetylether Brij[®] 52 eine Detektion des freien C16 FAA zu erwarten, welche bei einer Retentionszeit von ca. 70 min erfolgte. Da es sich bei Brij[®] 52 um Ether mit relativ kurzen PEG-Ketten von durchschnittlich $n = 2$ handelt, liegen die Retentionszeiten der Ether im Bereich $t_R = 70 - 75$ min (**Abb. 4-37 c**), welche dem C16 FAA entspricht. Dies folgt aus dem geringen Einfluss der kurzen PEG-Ketten, die die Lipophilie des C16 FAA kaum senken.

Freie PEGs (**Abb. 4-37 b**) wurden bei Retentionszeiten von 12 – 21 min detektiert, welche mit Hilfe der PEG 300- und PEG 400-Referenzen mittleren und höheren Oligomerketten von $n = \text{ca. } 10 - 35$ zugeordnet werden konnten. Die Detektion der freien PEGs erfolgte aufgrund ihrer geringen Menge ausschließlich in der höherkonzentrierten Referenzprobe.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aufgrund der engen Oligomerverteilung der Ether um den Bereich $n = 2$ zeigten sich in diesem Fall alle in **Abb. 4-38** betrachteten Methoden als gleichwertig. Da keine Verfeinerung des Gradienten zur Trennung dieser wenigen Kettenlängen notwendig ist, wäre hier die Methode YMC_D003 aufgrund ihrer kürzeren Laufzeit (105 min) und ihrer besseren Auflösung zwischen C16 FAA und C17 FA zu bevorzugen.

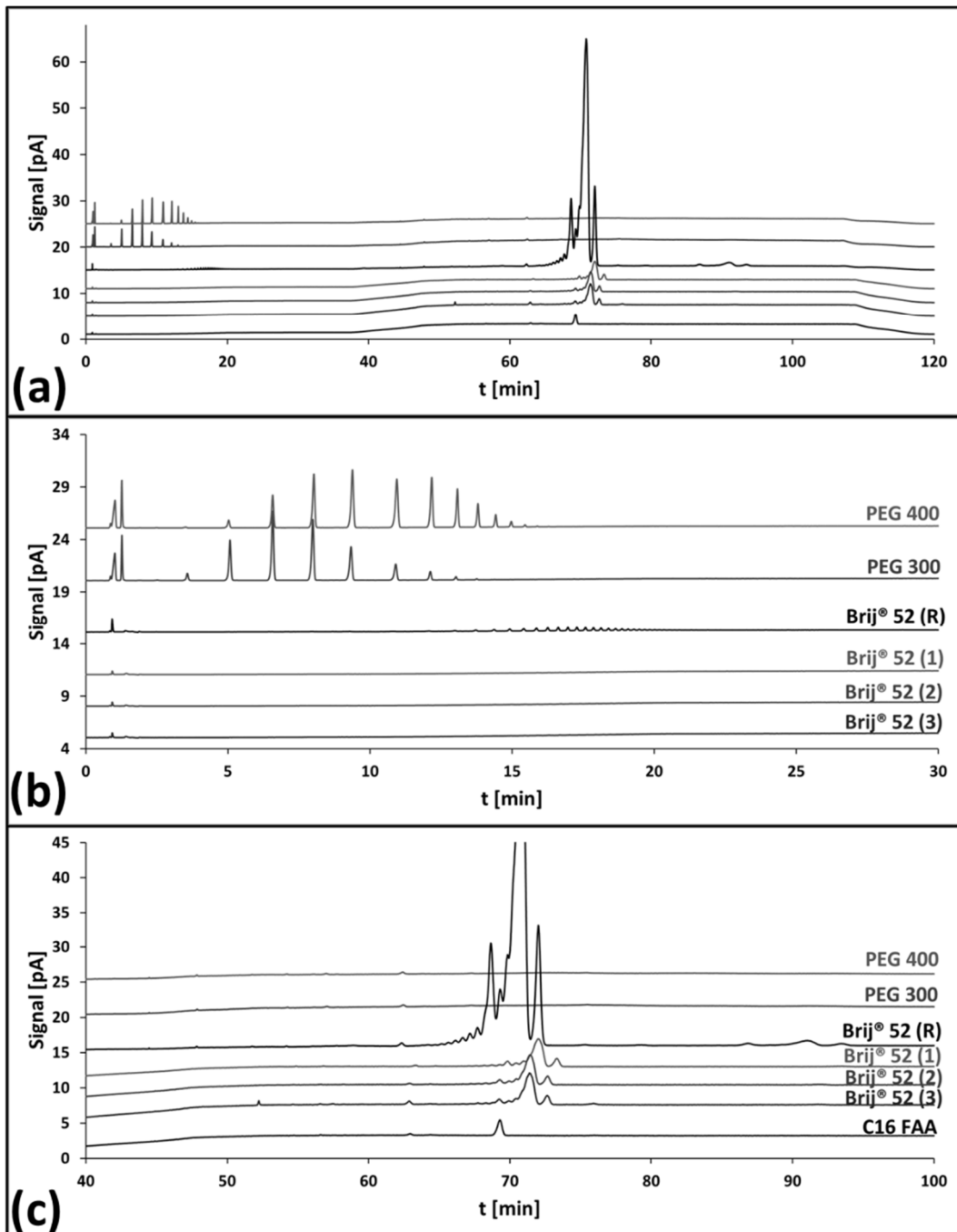


Abb. 4-37: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij[®] 52 (0.9560 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (107.59 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 300 (96.01 µg/ml), PEG 400 (104.24 µg/ml) und C16 FAA (97.71 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ether und FAA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

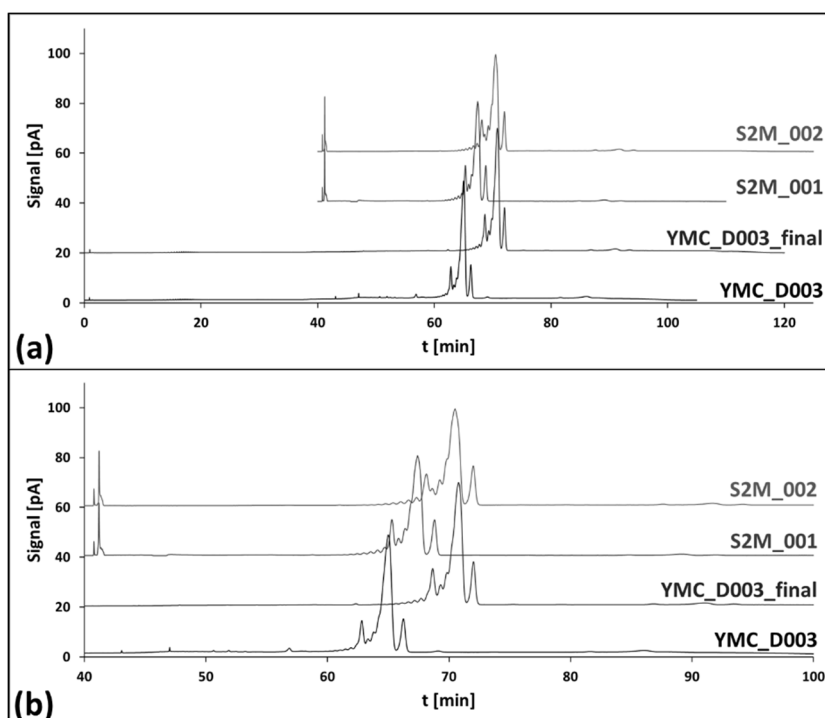


Abb. 4-38: Chromatogramme von Brij® 52 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.3.1.4. Macrogol-10-cetylether (Brij® C10)

Im Vergleich zu Brij® 52, welches eine mittlere PEG-Kettenlänge von $n = 2$ hat, setzt sich Brij® C10 aus Cetylethern mit PEGs höherer Kettenlängen von durchschnittlich $n = 10$ zusammen. Dies führte den Erwartungen entsprechend zu einer Verringerung der Retentionszeiten (60 – 72 min) der Ether im Vergleich zum nicht veretherten C16 FAA (70 min). Wie in **Abb. 4-39 c** zu erkennen ist, eluiert C16 FAA am Ende der Etherverteilung, was zu deutlich sichtbaren Peaküberlagerungen führt.

Freie PEGs wurden in geringen Mengen im Bereich von $n = \text{ca. } 17 - 35$ (16 – 21 min) gefunden, jedoch auch hier nur in der höherkonzentrierten Referenzprobe. Die Zuordnung erfolgte mittels der Referenzen PEG 400 und PEG 600.

Abb. 4-40 zeigt den Vergleich zur Ausgangsmethode YMC_D003, wobei die modifizierten Methoden zu einer gleichwertigen Auftrennung der Oligomere und Polymere führten. Zwischen S2M_001 bzw. YMC_D003_final und S2M_002 sind keine relevanten Unterschiede feststellbar, sodass hier YMC_D003 aufgrund der kürzeren Laufzeit zu bevorzugen ist.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

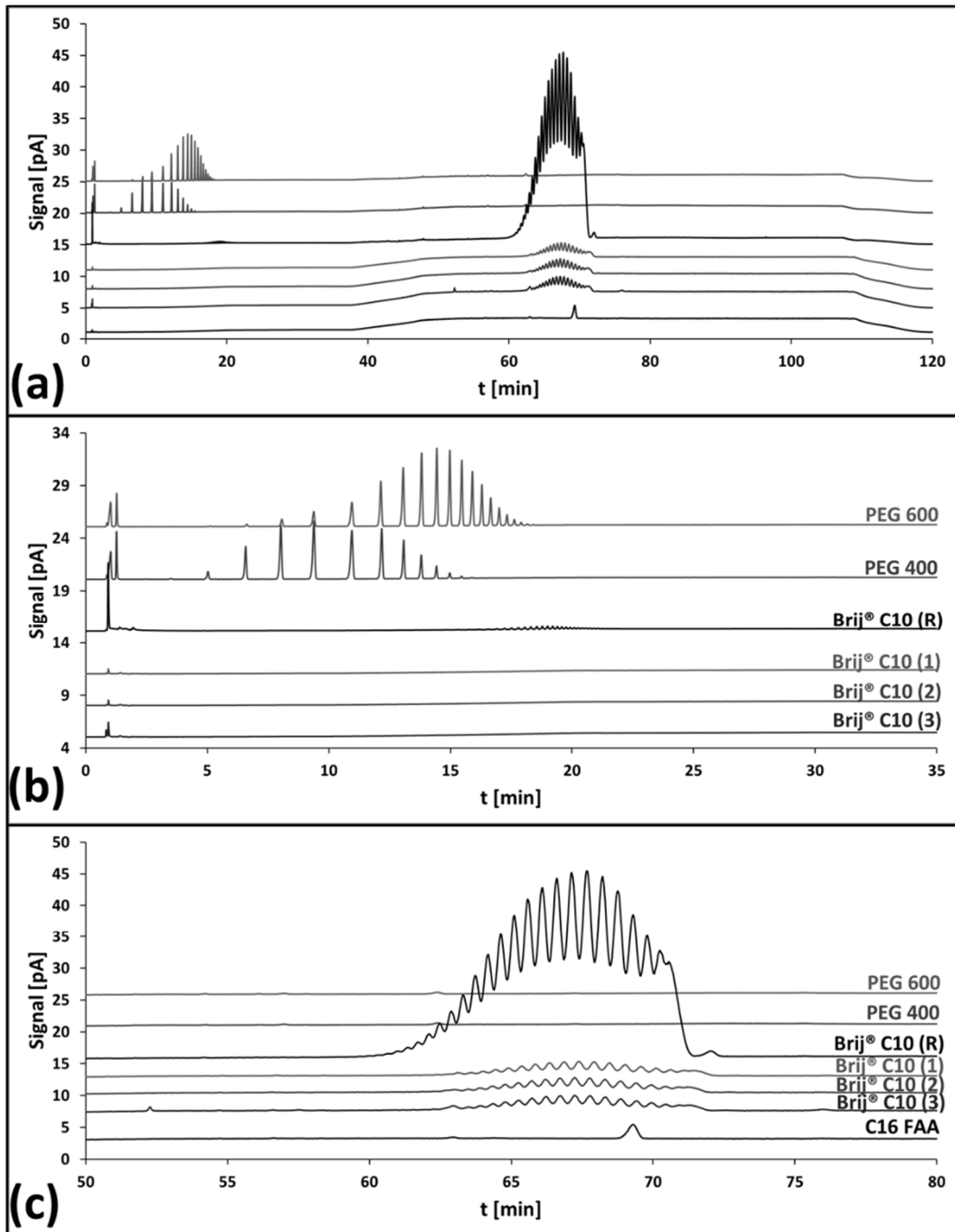


Abb. 4-39: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® C10 (0.9420 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (104.46 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 400 (104.24 µg/ml), PEG 600 (102.73 µg/ml) und C16 FAA (97.71 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ether und FAA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

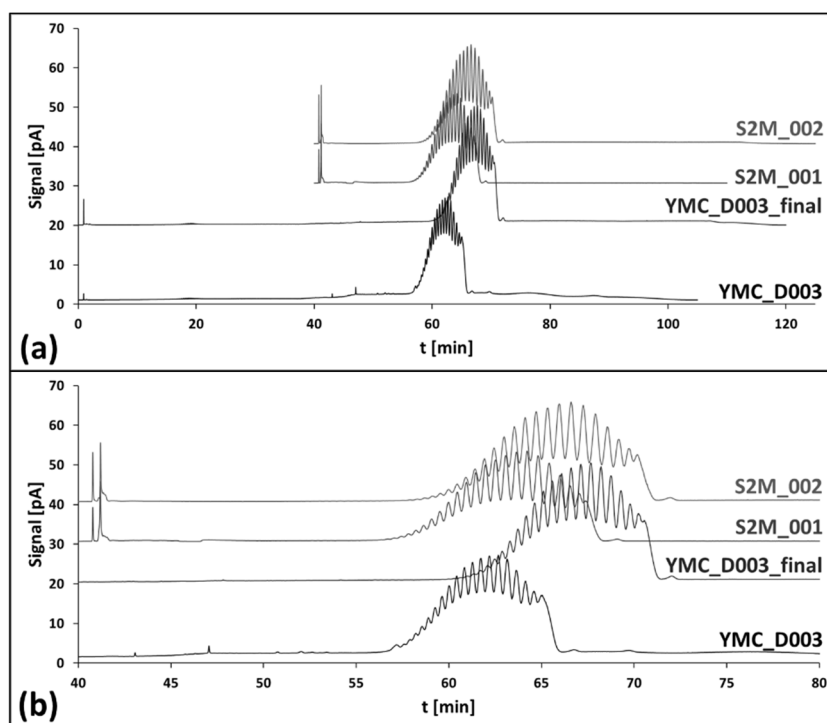


Abb. 4-40: Chromatogramme von Brij® C10 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.3.1.5. Macrogol-2-stearylether (Brij® 72)

Ähnlich dem Macrogolcetylether Brij® 52 besitzt auch der Macrogolstearylether Brij® 72 nur wenige Ether-Oligomere, was auf die mittlere PEG-Kettenlänge von $n = 2$ zurückzuführen ist. So verhalten sich die Stearylether genau wie die Cetylether und unterscheiden sich nur in ihrer höheren Retentionszeit (88 – 95 min), welche bei Brij® 72 im Bereich des C18 FAA liegt. Diesen Alkohol kann man in freier Form in **Abb. 4-41 c** deutlich bei einer Retentionszeit von 89 – 90 min als Schulter erkennen. Die Ether sind lipophil, da die kurzen PEG-Ketten kaum zu einer Verringerung der Lipophilie des veretherten C18 FAA führen.

Freie PEGs konnten nur in der höherkonzentrierten Referenzprobe (**Abb. 4-41 b**) in einem Bereich von $n = \text{ca. } 10 - 40$ (11 – 23 min) detektiert werden. Die Zuordnung erfolgte mittels der Referenzen PEG 300 und PEG 400.

Die Methode YMC_D003_final bzw. S2M_001 ist der Ausgangsmethode YMC_D003 in Bezug auf die Trennleistung der Ether deutlich überlegen (**Abb. 4-42**), was sich insbesondere in dem letzten Peak deutlich anhand der Peakbreite zeigt. Die Methode S2M_002 führt zu ähnlichen Ergebnissen, weswegen die Methode YMC_D003_final aufgrund der geringeren Laufzeit zu bevorzugen ist.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

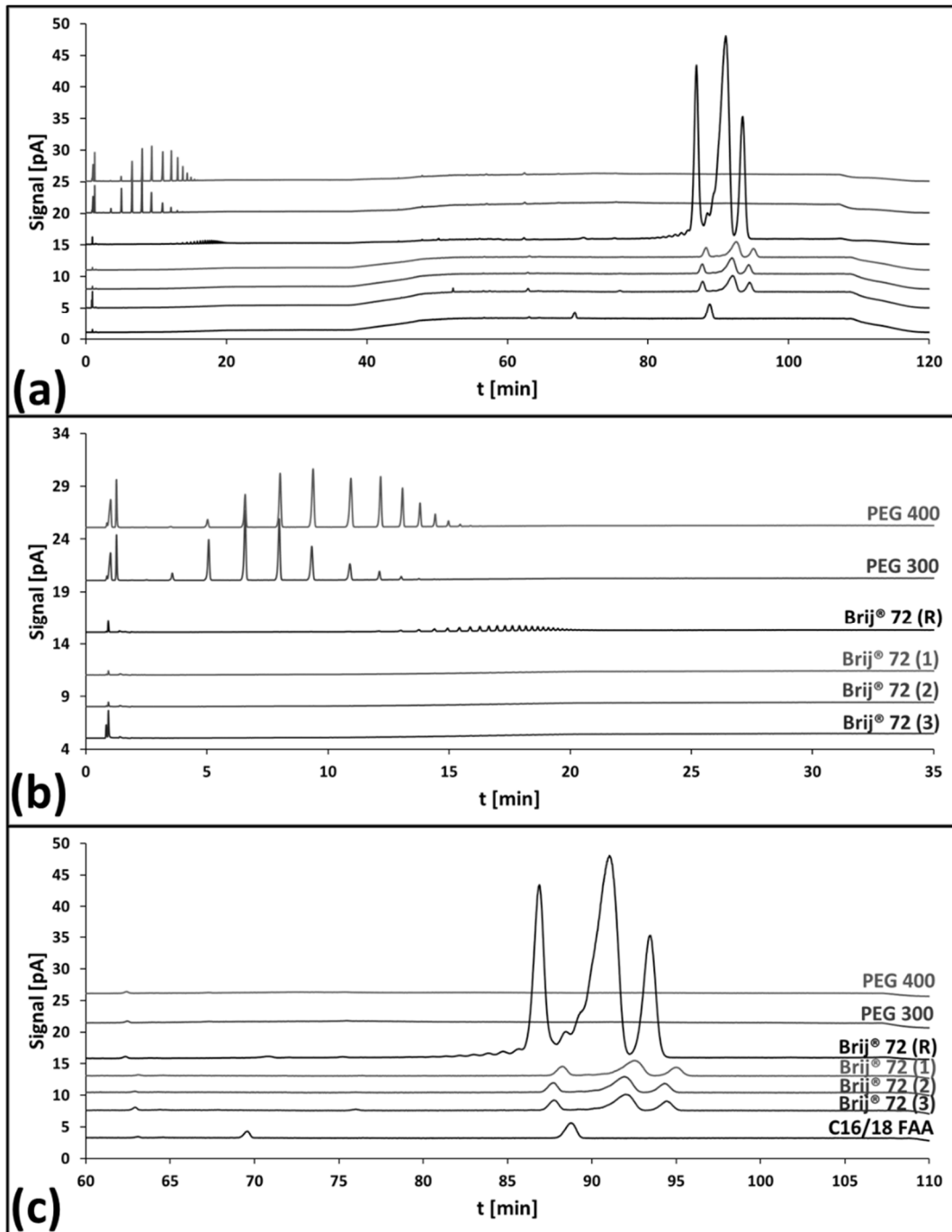


Abb. 4-41: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® 72 (1.000 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (106.12 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 300 (96.01 µg/ml), PEG 400 (104.24 µg/ml) und C16/18 FAA (98.62 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ether und FAA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

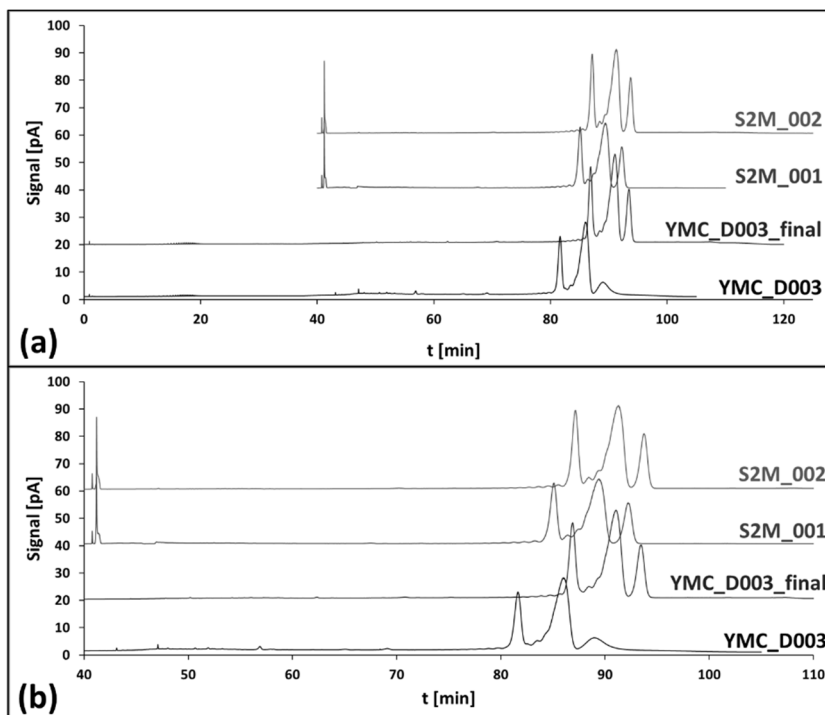


Abb. 4-42: Chromatogramme von Brij® 72 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.3.1.6. Macrogol-20-stearylether (Brij® S20)

Da der Macrogolstearylether Brij® S20 aus PEGs mit einer mittleren Kettenlänge von $n = 20$ und C18 FAA besteht, war anzunehmen, dass es zu einer Verringerung der Retentionszeiten der Polymere im Vergleich zum freien Alkohol kommt, wie es auch bei dem Macrogolcetylether Brij® C10 ($n = 10$) bereits der Fall war. Auch bei Brij® S20 ist dies zu beobachten (**Abb. 4-43 c**), jedoch kommt es weiterhin zu Überlagerungen der Ether (70 – 90 min) mit dem freien C18 FAA, welcher bei einer Retentionszeit von 89 – 90 min zu erwarten gewesen wäre. Anders als bei Brij® C10 kam es jedoch nicht zu Peakdeformierungen wie beispielsweise Schultern. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Charge von Brij® S20 möglicherweise keinen freien C18 FAA enthält, was auch durch die Tatsache verstärkt wird, dass die Charge auch keine detektierbare Menge freier PEGs enthält (**Abb. 4-43 b**). Stattdessen wurde eine weitere, deutlich kleinere Polymerverteilung im Bereich der Laurylether (48 – 52 min) gefunden, welche, je nach Reinheit des zur Synthese verwendeten C18 FAA, als Nebenprodukte enthalten sein können.

Betrachtet man **Abb. 4-44**, so stellt man fest, dass auch hier die Methode YMC_D003_final (bzw. S2M_001) wieder geringfügig bessere Trennergebnisse liefert als die Ausgangsmethode YMC_D003 und die Verbesserungen der Auflösungen in S2M_002 nur als marginal zu betrachten sind.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

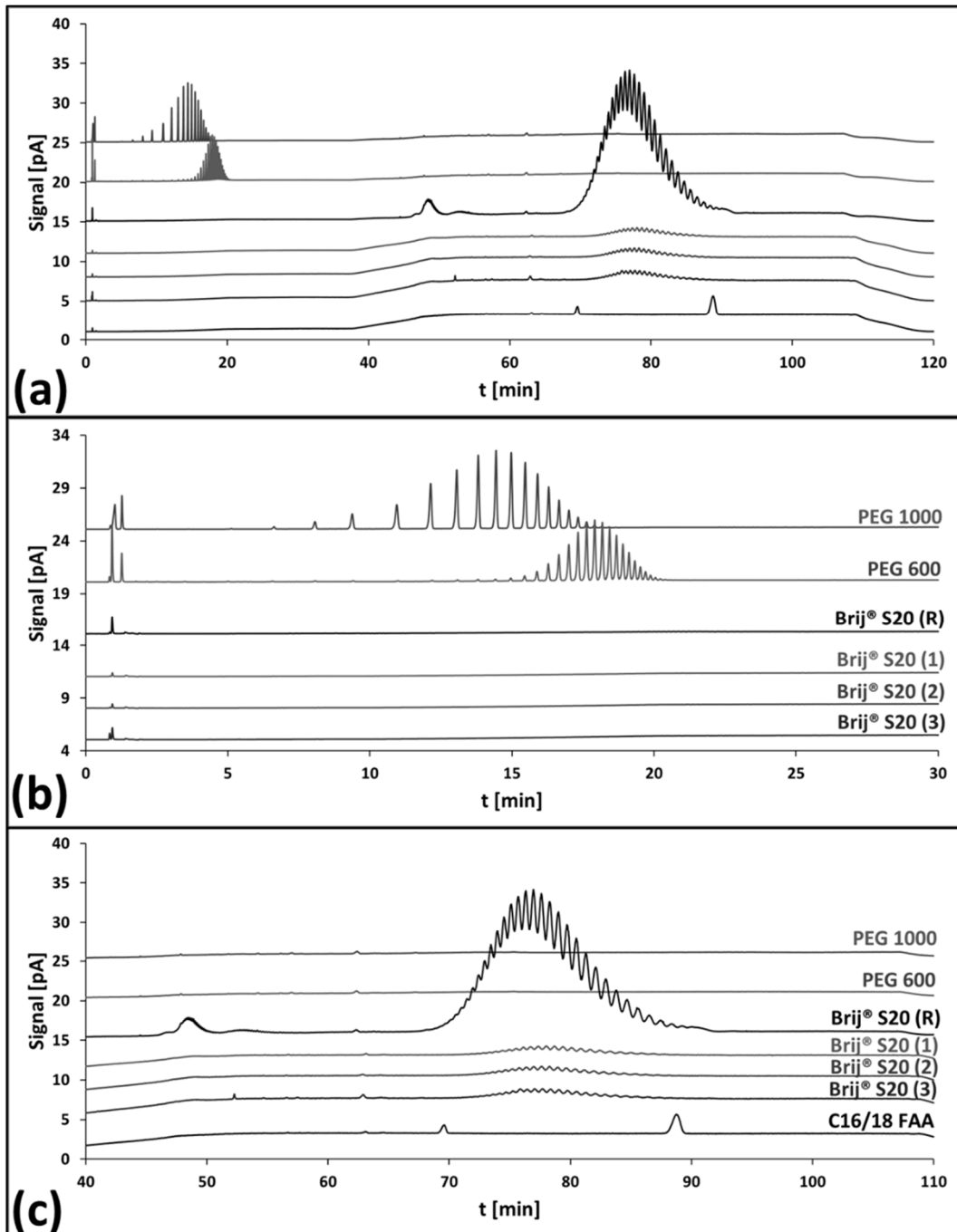


Abb. 4-43: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® S20 (1.448 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (95.74 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 600 (102.73 µg/ml), PEG 1000 (111.01 µg/ml) und C16/18 FAA (98.62 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ether und FAA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

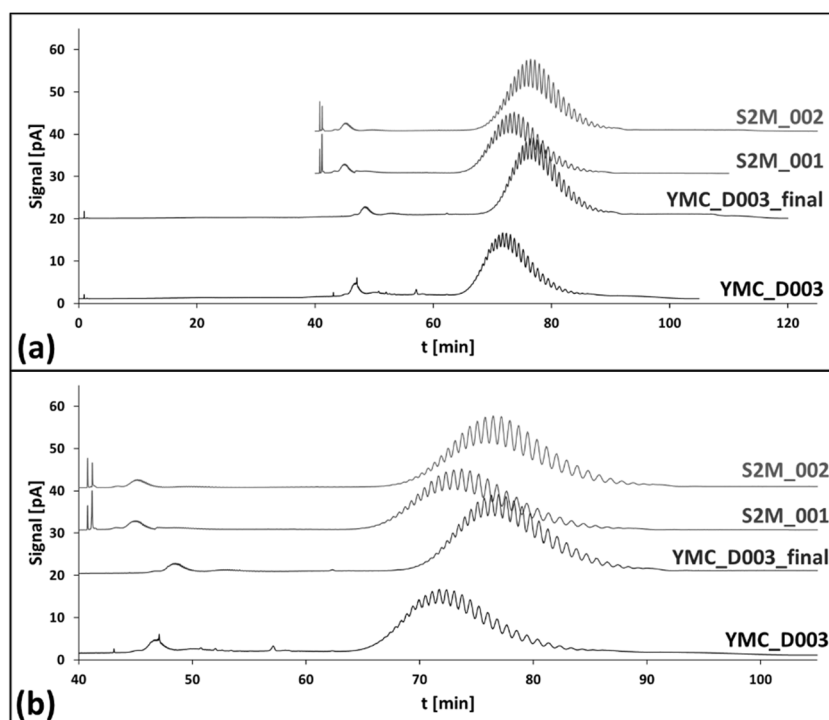


Abb. 4-44: Chromatogramme von Brij® S20 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassten, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.3.1.7. Macrogol-20-oleylether (Brij® O20)

Brij® O20 kann aufgrund der ungesättigten Struktur neben den Oleylethern mit PEG-Kettenlängen von durchschnittlich $n = 20$ auch diverse Oxidationsprodukte des Oleylethers enthalten, insbesondere bei längerer Lagerung. In **Abb. 4-45** sind nicht nur die Oligomer- und Polymerverteilungen der Oleylether (60 – 70 min), welche im Bereich der Ölsäure-Referenz (65 min) eluieren, sondern auch solche zu Neben- oder Abbauprodukten im Bereich 52 – 57 min und im Bereich der Stearylether (72 – 85 min) zu erkennen.

Freier C18:1 FAA konnte nicht detektiert werden, da er vermutlich von den Polymerverteilungen der Ether überdeckt wird. Aufgrund der Erkenntnisse in Kapitel 4.2 ist anzunehmen, dass der C18:1 FAA zwischen der entsprechenden Säure (C18:1 FA; 65 min) und dem gesättigten Alkohol (C18 FAA; 90 min) eluieren müsste. Dieser Bereich ist jedoch vollständig mit Oligo- und Polymeren überlagert.

Freie PEGs konnten nur in der höherkonzentrierten Referenzprobe im Bereich $n = \text{ca. } 3 - 50$ (3 – 26 min) detektiert werden und wurden mittels der Referenzen PEG 600 und PEG 1000 zugeordnet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

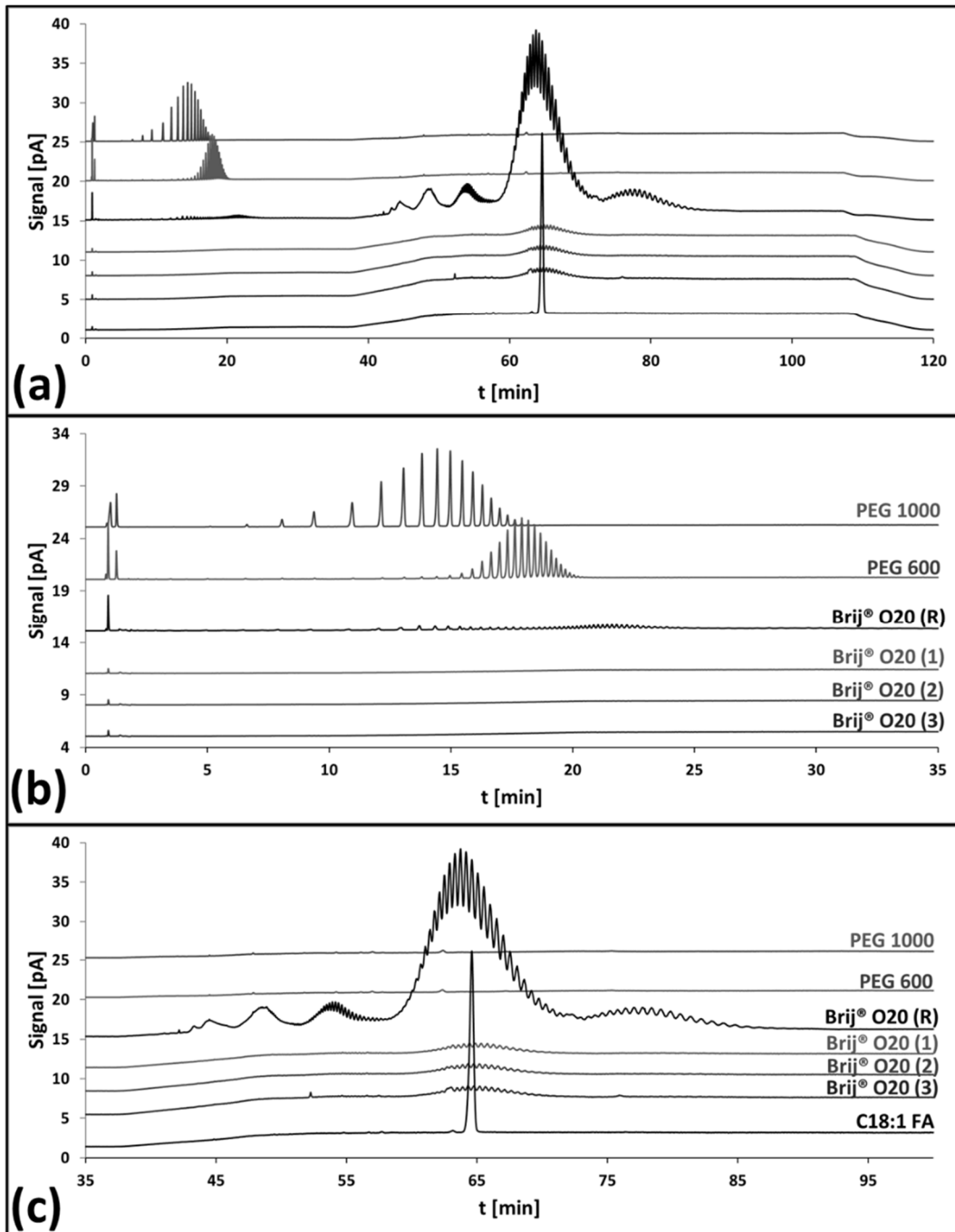


Abb. 4-45: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® O20 (0.988 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (108.79 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 600 (102.73 µg/ml), PEG 1000 (111.01 µg/ml) und C18:1 FA (106.30 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ether und FAA.

In **Abb. 4-46** ist deutlich zu erkennen, dass die Methode YMC_D003_final zum besten Trennergebnis führt, insbesondere im Vergleich zur Methode YMC_D003, bei der die Verteilung der Oleyl ether kaum zu erkennen ist. Die Modifikation S2M_002 ist wiederum gleichwertig und unterliegt dadurch der finalen Methode aufgrund ihrer höheren Laufzeit.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

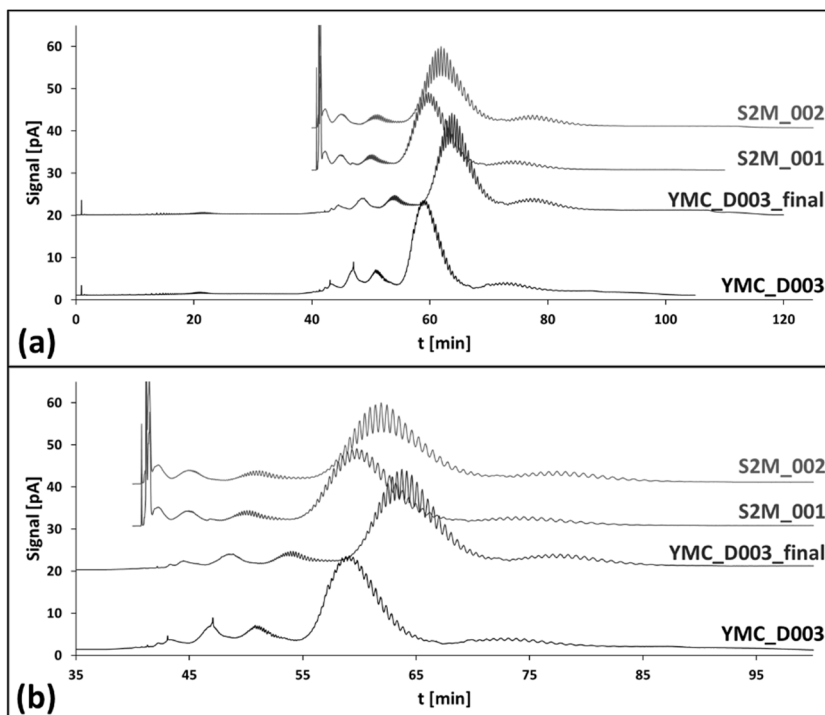


Abb. 4-46: Chromatogramme von Brij® O20 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.3.1.8. Zusammenfassung: Macrogolfettalkoholether

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die betrachteten Substanzen sich bei einer chromatographischen Trennung erwartungsgemäß verhalten: Die Oligomer- bzw. Polymerverteilungen der Ether richten sich nach der Kettenlänge des verwendeten Fettalkohols. So fanden sich die Ether immer im Retentionsbereiches des dazugehörigen FAA und konnten so diesen zugeordnet werden. Mit steigender Länge der PEG-Kette sinkt die Lipophilie und die gesamte Etherverteilung verschiebt sich zu kürzeren Retentionszeiten.

Der zugehörige freie FAA, sofern nicht-flüchtig, konnte meistens detektiert werden, allerdings wurde er in allen Fällen von den Macrogolfettalkoholethern partiell überlagert, was eine Quantifizierung erschweren würde.

Freie PEGs wurden nur in geringen Mengen gefunden. Diese wiesen eine hohe Variabilität der PEG-Kettenlängen auf und umfassten nicht nur die theoretischen Kettenlänge, sondern vor allem deutlich höhere. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Fettalkoholether ausschließlich über Ethoxylierung der Alkohole mit der entsprechenden Molmenge an Ethylenoxid hergestellt werden. So können überschüssige Ethylenoxid-

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Einheiten natürlich auch, neben den Fettalkoholen, untereinander Oligomere bilden, die sich in ihrer Länge stark von der mittleren molaren Masse unterscheiden können.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die final gewählte Methode (YMC_D003_final) gegenüber den anderen Methoden für die Macrogolfettalkoholether als bester Kompromiss betrachtet werden kann, wie die Übersicht in **Tab. 4-4** verdeutlicht.

Tab. 4-4: Methodenübersicht zur Gruppe der Fettalkoholether.

Substanz	Am besten geeignete Methode	Begründung
Brij® 30	YMC_D003_final	Bester Kompromiss aus Trennung der Ether und Laufzeit.
Thesit®	YMC_D003_final	Beste Trennung der Ether.
Brij® 52	YMC_D003	Vergleichbare Trennung für die Ether bei allen Methoden. Kürzeste Laufzeit.
Brij® C10	YMC_D003	Vergleichbare Trennung für die Ether bei allen Methoden. Kürzeste Laufzeit.
Brij® 72	YMC_D003_final	Beste Trennung der Ether.
Brij® S20	YMC_D003_final	Bester Kompromiss aus Trennung der Ether und Laufzeit
Brij® O20	YMC_D003_final	Beste Trennung der Ether.

4.3.2. Ergebnisse: Fettsäureester

4.3.2.1. Macrogol-8-stearat (Myrj® 45)

Die Gruppe der Macrogolstearate kann, wie in Kapitel **1.1.3.2.1** geschildert, je nach verwendeter Stearinsäure, einerseits nur aus Stearinsäureestern, und andererseits auch aus Mischungen von Stearin- und Palmitinsäureestern bestehen, was in verschiedenen gestalteten, komplexen Formulierungen Faktoren wie Löslichkeit oder Wirkstofffreisetzung beeinträchtigen kann. Des Weiteren kann diese Gruppe, im Gegensatz zu den Fettalkoholethern, auf zwei unterschiedlichen Wegen gewonnen werden. Einerseits kann, wie im Falle der Fettalkoholether, durch Ethoxylierung der Fettsäure mit der entsprechenden Molanzahl, hier 8 Mol, an Ethylenoxid der Ester gewonnen werden oder durch Veresterung des fertigen PEGs mit einer mittleren Kettenlänge, in diesem Fall von $n = 8$.

Betrachtet man nun die chromatographischen Ergebnisse zu Myrj® 45 in **Abb. 4-47**, so finden sich zwei klar voneinander getrennte Esterverteilungen bei ca. 59 – 63 min und ca. 70 – 77 min, welche mit den beiden Fettsäurereferenzen von C16 FA und C18 FA koeluiieren. Dies lässt vermuten, dass der Produzent dieses

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Macrogol-8-Stearates die günstigere Stearinsäure (Typ I), welche auch beträchtliche Mengen an Palmitinsäure enthalten kann, verwendet hat.

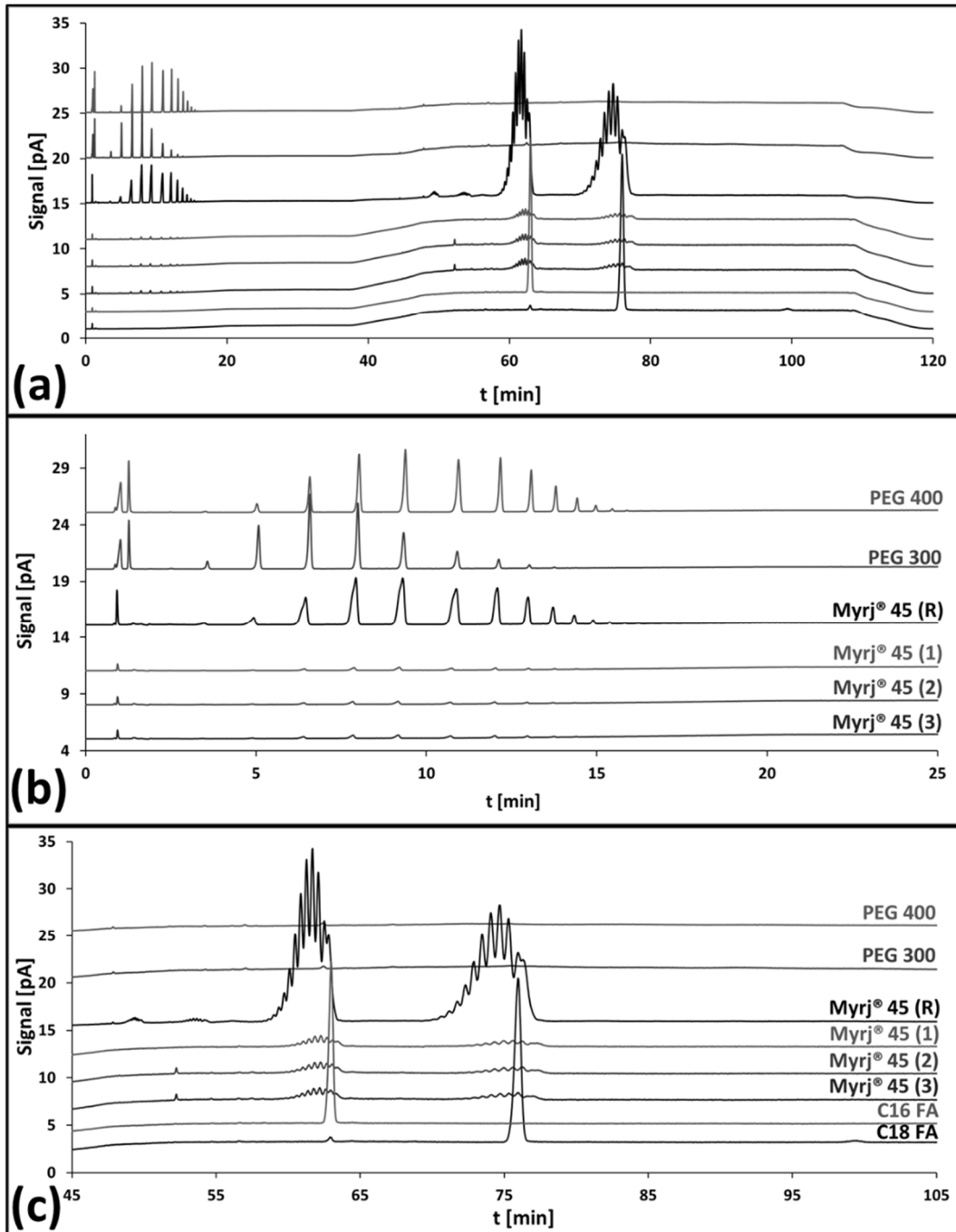


Abb. 4-47: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Myrj[®] 45 (1.1496 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (100.66 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 300 (96.01 µg/ml), PEG 400 (104.24 µg/ml), C16 FA (111.25 µg/ml) und C18 FA (100.5 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

Die freien PEGs wurden hier, anders als bei den Fettalkoholethern, tatsächlich auch in dem durchschnittlichen Größenbereich der veresterten Kettenlängen gefunden. So wurden hier PEGs der

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Kettenlängen $n = 5 - 17$ (4 – 16 min) gefunden, die außerdem bereits in den geringer konzentrierten Proben detektierbar waren. Da sich diese Ergebnisse deutlich von denen bei den Fettalkoholethern beobachteten unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um den zweiten Reaktionsweg, die Veresterung aus den PEGs der gewünschten Kettenlänge mit der entsprechenden Säure, handelt. Die Zuordnung der freien PEGs erfolgte mittels der PEG 400- und der PEG 600-Referenz.

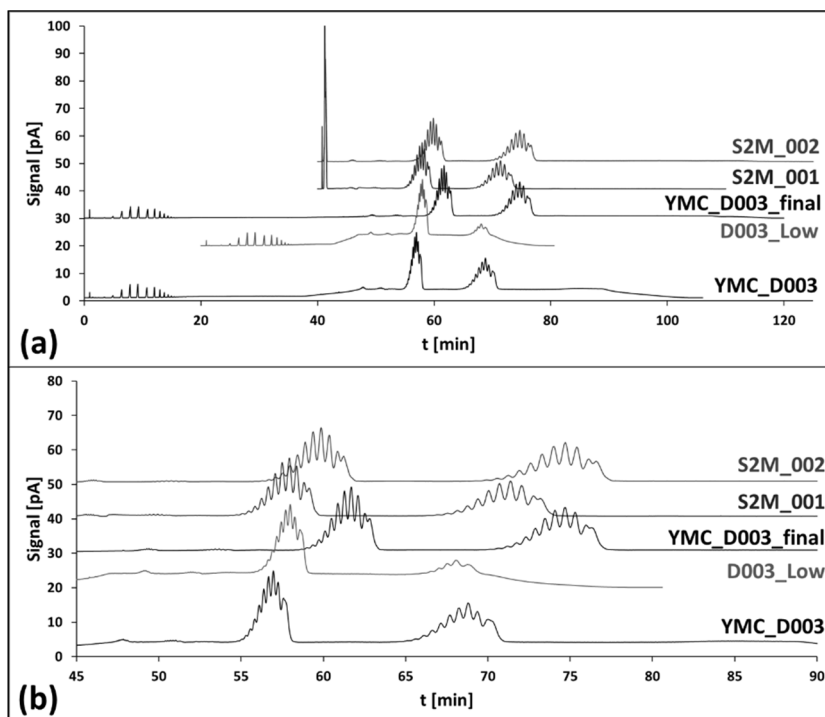


Abb. 4-48: Chromatogramme von Myrj® 45 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben. Die verkürzte Methode „D003_Low“ wurde ebenfalls zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 20 min verschoben.

Aus **Abb. 4-48** ergibt sich, dass die beiden Methoden YMC_D003 und die verkürzte Variante YMC_D003_Low zu vergleichbaren Ergebnissen führen, was sich im Bereich einer schnellen Routinemessung von Myrj® 45 anbieten würde. Die verkürzte Methode „Low“ zeichnet sich dadurch aus, dass sie den Teil des Gradienten der zur Elution der höheren Kettenlängen dient, ausspart. Allerdings bedeutet das auch, dass die Methode „Low“ nur dann sinnvoll ist, wenn die theoretische mittlere Kettenlänge der freien PEGs vorhersehbar ist, d. h. wenn die Veresterung mit PEGs einer definierten mittleren Kettenlänge vorausgesetzt werden kann. Im Falle der Ethoxylierung der FA können die Kettenlängen variieren und eine Verkürzung birgt hierbei die Gefahr höhere Kettenlängen zu früh und zu schlecht getrennt zu eluieren.

Die Methoden mit verlängertem Gradienten, S2M_001, S2M_002 und YMC_D003_final, sind gleichwertig. Sie führen zu einer besseren Auftrennung der Ester als in der Ausgangsmethode (YMC_D003) und der verkürzten Variante („Low“). Auch sind in diesen Methoden die freien Fettsäuren C16 FA und C18 FA gut als

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Peakverformungen am Ende der jeweiligen Esterverteilung zu erkennen. So fanden sich diese in YMC_D003_final bei ca. 63 min (C16 FA) und ca. 77 min (C18 FA). Da sich in dem längeren Gradienten von S2M_002 keine Verbesserung zeigt, ist auch hier die auf S2M_001 basierende Methode YMC_D003_final die beste Option.

4.3.2.2. Macrogol-40-stearat (Myrj[®] 52)

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus Myrj[®] 45 fällt die Interpretation der in **Abb. 4-49** abgebildeten Chromatogramme von Myrj[®] 52 leicht. Auch hier sind deutlich zwei separate Polymerverteilungen der Ester zu beobachten. Die früher eluierende Polymerverteilung (50 – 57 min) ist den Palmitinsäureestern zuzuordnen, während die später eluierenden Ester (60 – 70 min) den Stearinsäureestern zuzuordnen sind. Auffällig hierbei sind die im Vergleich zu Myrj[®] 45 deutlich geringeren Retentionszeiten, welche sich auf Grund der größeren Hydrophilie erklären lassen. So wirkt sich in einem Fettsäureester mit $n = 40$ im Vergleich zu $n = 8$ der PEG-Anteil deutlich stärker aus als der FA-Anteil, woraus eine reduzierte Retention resultiert. Dies hat zur Folge, dass beide Esterverteilungen deutlich vor ihren jeweiligen freien Fettsäuren C16 FA (ca. 64 min) und C18 FA (ca. 75 min) eluiert werden, was wiederum den positiven Effekt hat, dass die freie C18 FA nicht von der Esterverteilung überlagert wird, sondern frei detektierbar ist. Jedoch wird die C16 FA durch die C18 FA-Ester überlagert.

Aufgrund des Vorhandenseins zweier separater Esterverteilungen, die in etwa vergleichbaren Mengen vorliegen, ist auch hier anzunehmen, dass Stearinsäure Typ I zur Herstellung verwendet wurde. Dieser Schluss wird durch die Tatsache unterstützt, dass beide Macrogolstearate von demselben Hersteller stammen. Berücksichtigt man diesen Aspekt, ist anzunehmen, dass die Herstellungsweise identisch war, also die Ester durch Veresterung der Stearinsäure Typ I mit PEGs der entsprechenden Kettenlänge gewonnen wurden.

In diesem Fall sollten auch hier die freien, nicht veresterten PEGs im erwarteten Bereich von $n = 40$ detektiert werden, d. h. in einer Größenordnung um PEG 1500 bis PEG 2000. Dies wird in den Chromatogrammen (**Abb. 4-49**) bestätigt, da freie PEGs in einem Bereich von $n = 17 – 54$ (16 – 24 min) beobachtet werden. Somit ist von einem Herstellungsverfahren mittels Veresterung auszugehen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

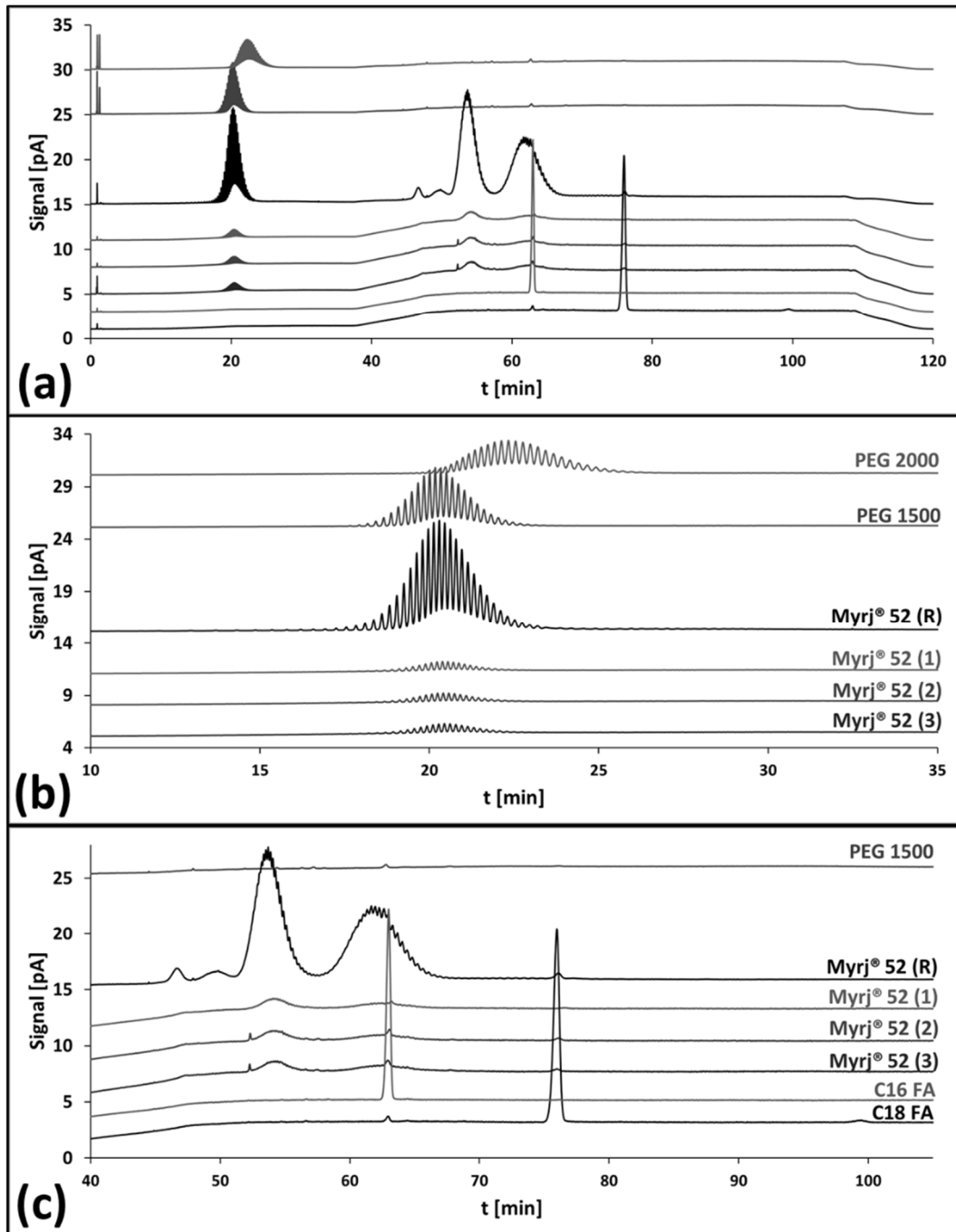


Abb. 4-49: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Myrj[®] 52 (0.9574 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (101.03 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 1500 (96.27 µg/ml), PEG 2000 (98.20 µg/ml), C16 FA (111.25 µg/ml) und C18 FA (100.5 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

Aus **Abb. 4-50** ergibt sich, dass die beiden Methoden YMC_D003 und die verkürzte Variante YMC_D003_High („High“) zu vergleichbaren Ergebnissen führen, was sich im Bereich einer schnellen Routinemessung von Myrj[®] 52 anbieten würde. Die auf YMC_D003 basierende, verkürzte Methode „High“ unterscheidet sich von dieser darin, dass hier auf den initialen Gradienten zur Elution der kürzeren Kettenlängen verzichtet wird. Dies lässt sich nutzen, wenn zu erwarten ist, dass nur mittlere und größere PEG-Kettenlängen ab $n \geq 10$

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

enthalten sind. Dies bietet für die Veresterung von PEGs der mittleren Kettenlänge $n = 40$ mit Stearinsäure Typ I oder II, eine geeignete Alternative zur vollständigen Methode. Unter Betrachtung der Ergebnisse aus den Fettalkoholethern, welche ausschließlich über die Ethoxylierung der Fettalkohole mit der entsprechenden Molanzahl hergestellt werden, kann die Methode „High“ ggf. auch bei Macrogol-40-Stearaten, die nach dieser Herstellungsweise synthetisiert wurden, eingesetzt werden, da bei diesen meist die freien PEGs deutlich größere Kettenlängen beinhaltet haben, als anzunehmen war. Jedoch handelt es sich hierbei nur um Vermutungen, die aufgrund des Mangels an Macrogolstearaten anderer Hersteller nicht belegt werden konnten.

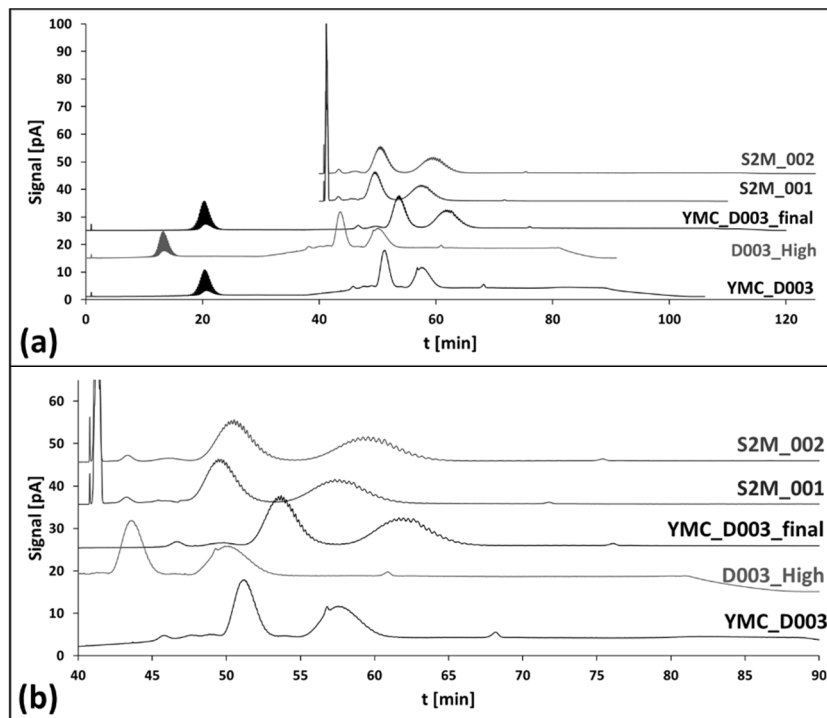


Abb. 4-50: Chromatogramme von Myrj[®] 52 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassten, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

Betrachtet man die Methoden mit verlängertem Gradienten S2M_001 bzw. YMC_D003_final und S2M_002, so zeigten sich diese untereinander als gleichwertig. Die Ester-Oligomere wurden insgesamt besser getrennt als in YMC_D003 und „High“, jedoch bot S2M_002 keinen Vorteil gegenüber S2M_001 bzw. YMC_D003_final. Aus diesem Grund ist auch hier die final gewählte Methode am geeignetsten.

4.3.2.3. Macrogol-100-stearat (Myrj® 59)

Da es sich bei Myrj® 59, dem Ester aus Stearinsäure und PEGs einer mittleren Kettenlänge von $n = 100$, um denselben Hersteller handelte wie bei Myrj® 45 und Myrj® 52, war auch hier zu erwarten, dass sich im Fall der Ester zwei Verteilungsmuster abzeichnen werden und die freien PEGs sehr lange Ketten aufweisen sollten.

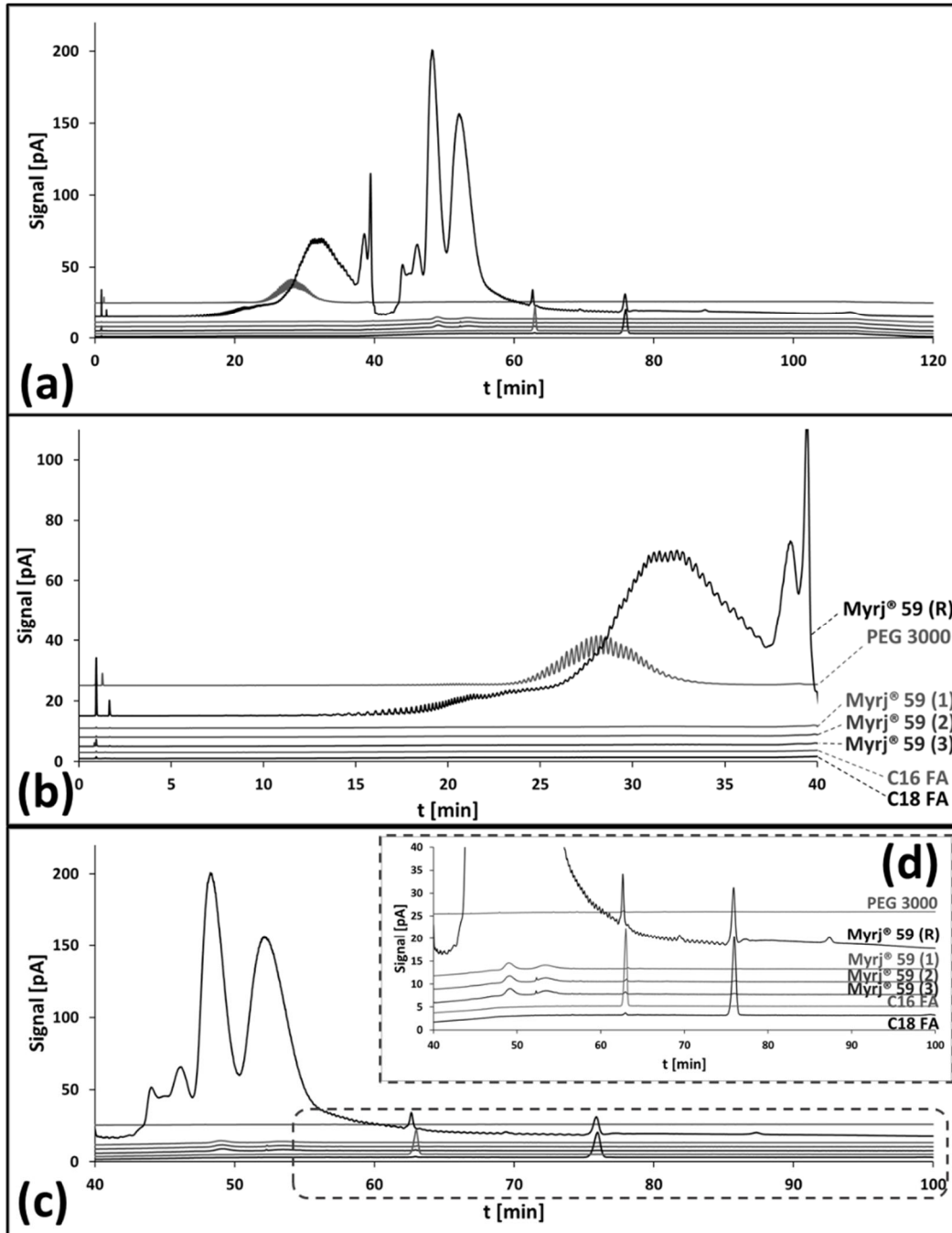


Abb. 4-51: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Myrj® 59 (19.776 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (94.55 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 3000 (101.14 µg/ml), C16 FA (111.25 µg/ml) und C18 FA (100.5 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aufgrund der langen PEG-Ketten von Myrj[®] 59 wurden die Ester deutlich vor den Fettsäuren C16 FA (ca. 63 min) und C18 FA (ca. 74 min) eluiert (**Abb. 4-51 c und d**). Außerdem wurden die freien PEGs recht spät eluiert (**Abb. 4-51 b**).

Die beiden Esterverteilungen sind als zwei voneinander getrennte Peakgruppen im Bereich 42 – 75 min zu erkennen, jedoch ist eine Polymerverteilung hier nicht zu beobachten. Dies lässt sich durch die verringerte Lipophilie der Ester gegenüber der freien FA erklären: Durch die langen PEG-Ketten und den dadurch resultierenden hohen Anteil an EGE nähert sich der Gesamtcharakter des Esters immer mehr dem der PEGs an, sodass die Retention am C₁₈-Material verringert ist. Dies hat zur Folge, dass die Ester verschiedener PEG-Kettenlängen aufgrund des relativ steilen Gradienten von 32.5 % auf 75 % mobiler Phase B nahezu gleichzeitig eluierten. Einzig durch die Länge der veresterten Fettsäure bildete sich ein ausreichender Unterschied aus, sodass zwei Hauptpeakgruppen resultierten. Auch ist es möglich, dass Ester besonders langer PEG-Ketten bereits in dem „hydrophilen Teil“ der Methode eluiert wurden, was die Peakverformungen im Bereich von ca. 25 – 38 min erklären könnte.

Betrachtet man die freien PEGs im Vergleich zur PEG 3000-Referenz, so ist klar, dass sich diese in einem sehr weiten Bereich von $n = \text{ca. } 10$ bis > 100 , welcher sich mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von $n = 100$ deckt, bewegen. Eine Polymerverteilung ist erkennbar, jedoch wird diese gegen Ende deutlich überlagert, was vermutlich eine Folge des steilen Gradienten (32.5 % auf 75 % B) ist. Diese Verformungen können einerseits von den Macrogolstearaten sehr großer Kettenlängen stammen, die durch ihre höhere Hydrophilie früher eluiert werden, andererseits von freien PEGs sehr hoher Kettenlängen, die aufgrund des steilen Gradienten nicht mehr getrennt, sondern zusammen eluiert werden.

Um hier eine ausreichende Selektivität zu erzielen, müsste wahrscheinlich eine weitere, flache Gradientenstufe zwischen 32.5 % und 75 % B eingefügt werden, was zum einen jedoch die Methode noch zeitintensiver machen würde und zum anderen für die übrigen betrachteten Substanzen mit geringeren Kettenlängen unnötig wäre. Daher wurde dieser Ansatz zugunsten einer möglichst universell einsetzbaren Methode in diesem Fall (Myrj[®] 59) nicht mehr weiter verfolgt. Betrachtet man den Methodenvergleich in **Abb. 4-52**, so stellt man fest, dass alle betrachtete Methoden zu gleichwertigen Ergebnissen geführt haben. Zugunsten des Ziels einer möglichst auf alle Substanzen anwendbaren Methode stellt auch hier die Methode YMC_D003_final den besten Kompromiss dar.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

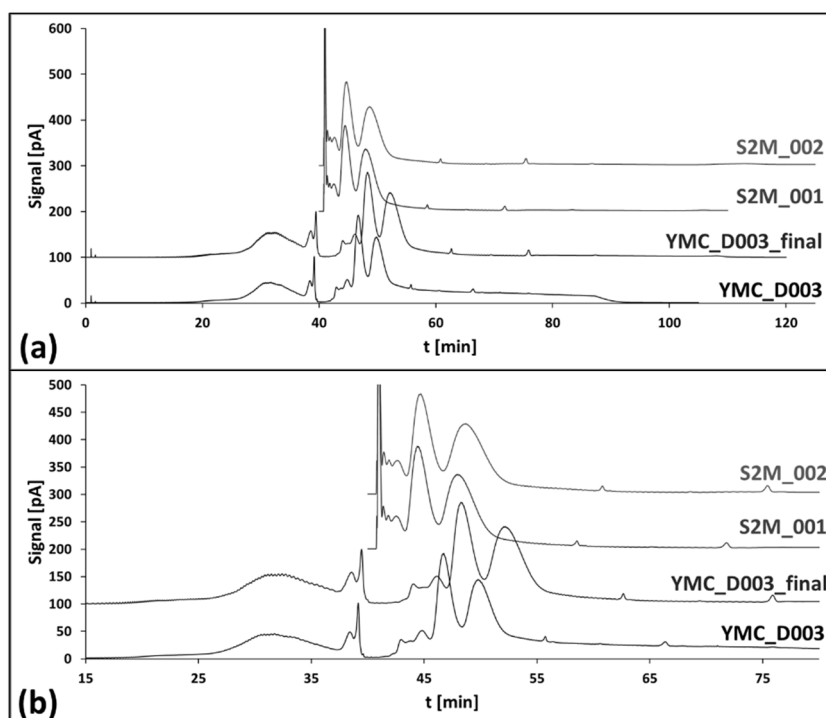


Abb. 4-52: Chromatogramme von Myrj® 59 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassten, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

Tab. 4-5: Ergebnisse zur Löslichkeit von Myrj® 59.

Lösungsmittel	Löslichkeit			
	nach Zugabe des Lösungsmittels	nach Ultraschallbad (60 min)	nach 12 h	nach 3 d
Wasser	trüb	trüb	trüb	trüb
Acetonitril (ACN)	Schlieren	klar	Präzipitate	Präzipitate
Wasser : ACN (1:1)	Schlieren	trüb	trüb	trüb
Methanol (MeOH)	trüb	klar	klar	Präzipitate
Wasser : MeOH (1:1)	trüb	trüb	trüb	Präzipitate
MeOH : ACN (1:1)	Rückstände	klar	klar	Präzipitate
ACN + 0.1 % TFA	Schlieren	klar	klar	Präzipitate
Wasser + 0.1 % TFA	trüb	trüb	trüb	Präzipitate
Wasser + 0.1 % FA (mob. Phase A)	trüb	trüb	trüb	Präzipitate
ACN + 0.1 % FA (mob. Phase B)	Schlieren	klar	klar	klar
mob. P. A : mob. Ph. B (1:1)	Schlieren	trüb	Präzipitate	Präzipitate
mob. P. A : mob. Ph. B (10:90)	Schlieren	klar	klar	Präzipitate
mob. P. A : mob. Ph. B (90:10)	Schlieren	trüb	Präzipitate	Präzipitate

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zusätzlich zu der deutlich schlechteren Selektivität ist Myrj[®] 59 als einzige Substanz nur gering in Methanol löslich. Aus diesem Grund wurde die Löslichkeit in verschiedenen CAD-kompatiblen Lösungsmitteln untersucht (siehe **Tab. 4-5**). Hierzu wurden ca. 100 mg/ml der Substanz jeweils in einem Rundgläschen mit Schnappdeckelverschluss in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst, 60 min im Ultraschallbad behandelt und dann über Nacht stehen gelassen. Die Proben, die nach 12 h keine Präzipitate oder Schlieren zeigten, wurden injiziert und mittels der Methode YMC_D003 vermessen. Wie in **Abb. 4-53** gezeigt ergeben sich zwar keine wahrnehmbaren Unterschiede in den Chromatogrammen, jedoch wurde bei einigen Proben nach wenigen Tagen ebenfalls eine Ausfällung beobachtet. Lediglich die in der mobilen Phase B gelöste Probe (**Abb. 4-53 (4)**) blieb auch langfristig klar, weshalb dieses Lösungsmittel als Lösungsmittel der Wahl verwendet wurde.

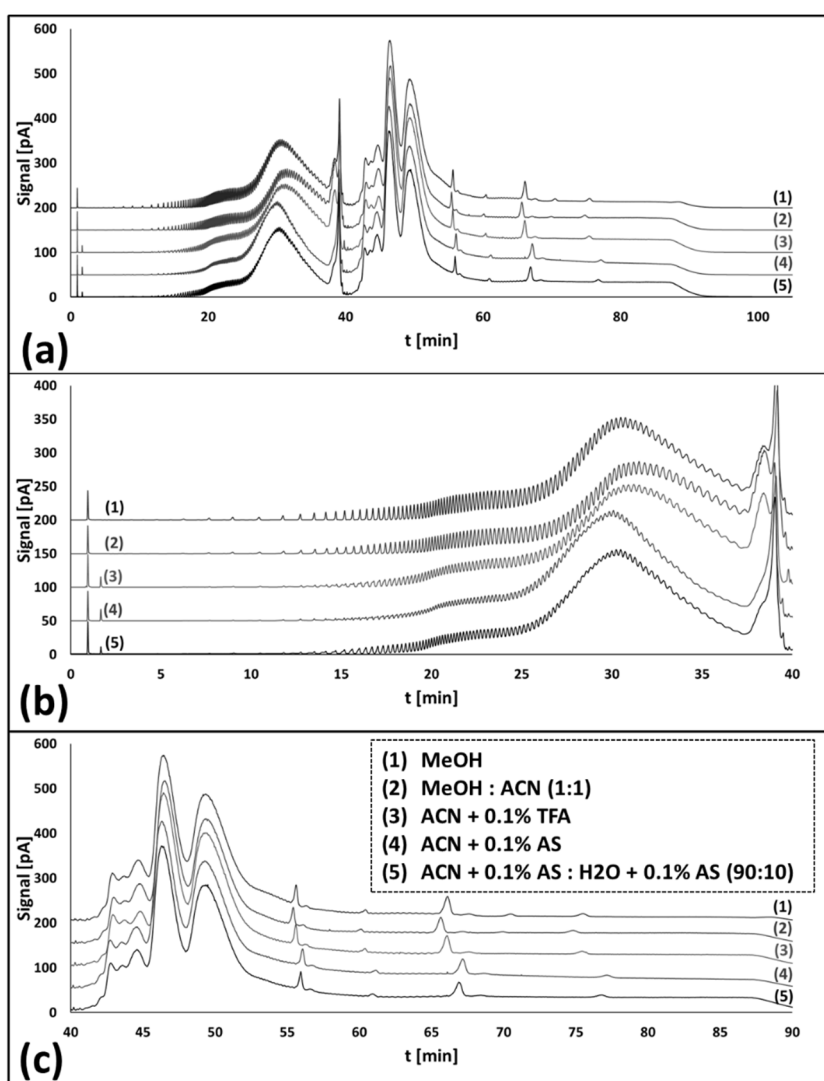


Abb. 4-53: Chromatogramme zu Myrj[®] 59 in verschiedenen Lösungsmitteln. (a) Gesamtdarstellung. (b) Relevanter Ausschnitt PEGs. (c) Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

4.3.2.4. Zusammenfassung: Macrogolstearate

Für alle analysierten Macrogolstearate lässt sich feststellen, dass sie durch Veresterung der Fettsäure mit PEGs der gewünschten Kettenlängen hergestellt wurden. Dieser Schluss stützt sich darauf, dass anders als bei den ausschließlich durch Ethoxylierung hergestellten Fettalkoholethern, hier die freien PEGs immer im erwarteten Größenbereich vorlagen, während bei den Fettalkoholethern überwiegend PEGs mit deutlich größeren Kettenlängen zu finden waren. Des Weiteren wurden bei allen Stearaten sowohl Ester im Bereich der C16 FA als auch der C18 FA gefunden, was auf die Verwendung von Stearinsäure Typ I zur Herstellung hinweist. Mit steigender Kettenlänge der PEGs wiesen die Ester ein sinkendes Retentionsverhalten auf, wodurch bei Myrj[®] 52 ($n = 40$) die Trennung der freien C18 FA von den Estern möglich war und was bei Myrj[®] 59 sogar zur Trennung beider FA von den Estern führte.

4.3.2.5. Macrogolglycerolhydroxystearat (Cremophor[®] RH40)

Cremophor[®] RH40 ist eine Substanz aus dem Bereich der komplexeren Macrogol-basierten Emulgatoren. Hauptkomponenten sind Glyceroltriester, die durch Ethoxylierung von Tris(12-hydroxystearyl)glycerol mit 40 Molekülen Ethylenoxid synthetisiert werden. Durch Umsetzung freier 12-Hydroxystearinsäure (12-OH FA) können als Nebenprodukte in kleinen Mengen auch lineare Macrogolhydroxystearate entstehen. Außerdem können auch freie PEGs vorliegen. Nach den bisherigen Erkenntnissen aus den Macrogolfettalkoholethern und Macrogolstearaten müssen die freien PEGs nicht zwangsläufig im Größenbereich $n = 40$ liegen; da hier die Herstellung *per definitionem* ausschließlich über Ethoxylierung erfolgt, sind auch PEGs mit längeren Ketten ($n > 40$) denkbar.

Vergleicht man die Ergebnisse in **Abb. 4-54 b** und **Abb. 4-56 b**, so fällt auf, dass es insbesondere am Ende der PEG-Verteilungen (ab ca. 18 – 23 min; **Abb. 4-54**) zu Peakauftreibungen und Überlagerungen kommt. Dies legt den Schluss nahe, dass aufgrund der geringeren Lipophilie der 12-OH FA im Vergleich zur C18 FA die entsprechenden linearen Macrogolester deutlich früher eluierten und mit den freien PEGs koeluierten. Dies konnte durch LC-MS-Messungen im Positivmodus (LC-MS_004, Bedingungen 1; siehe **Abb. 4-57**) bestätigt werden.

Bei Retentionszeiten von ca. 45 – 50 min wurden zwei prominente Peaks detektiert, deren Ursprung nicht ganz geklärt werden konnte. Erwartungsgemäß könnte die Retentionszeit der 12-OH FA aufgrund ihrer geringeren Lipophilie in diesen Bereich fallen, jedoch war dies in LC-MS-Messungen im Negativmodus (LC-MS_004, Bedingungen 2) nicht zu verifizieren. Auch wäre es denkbar, dass es sich hierbei um die Hauptkomponenten von Cremophor[®] RH40, die Glyceroltriester, handeln könnte. Auch dies war durch LC-MS-Messungen, weder im Positiv- noch im Negativmodus, eindeutig verifizierbar.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

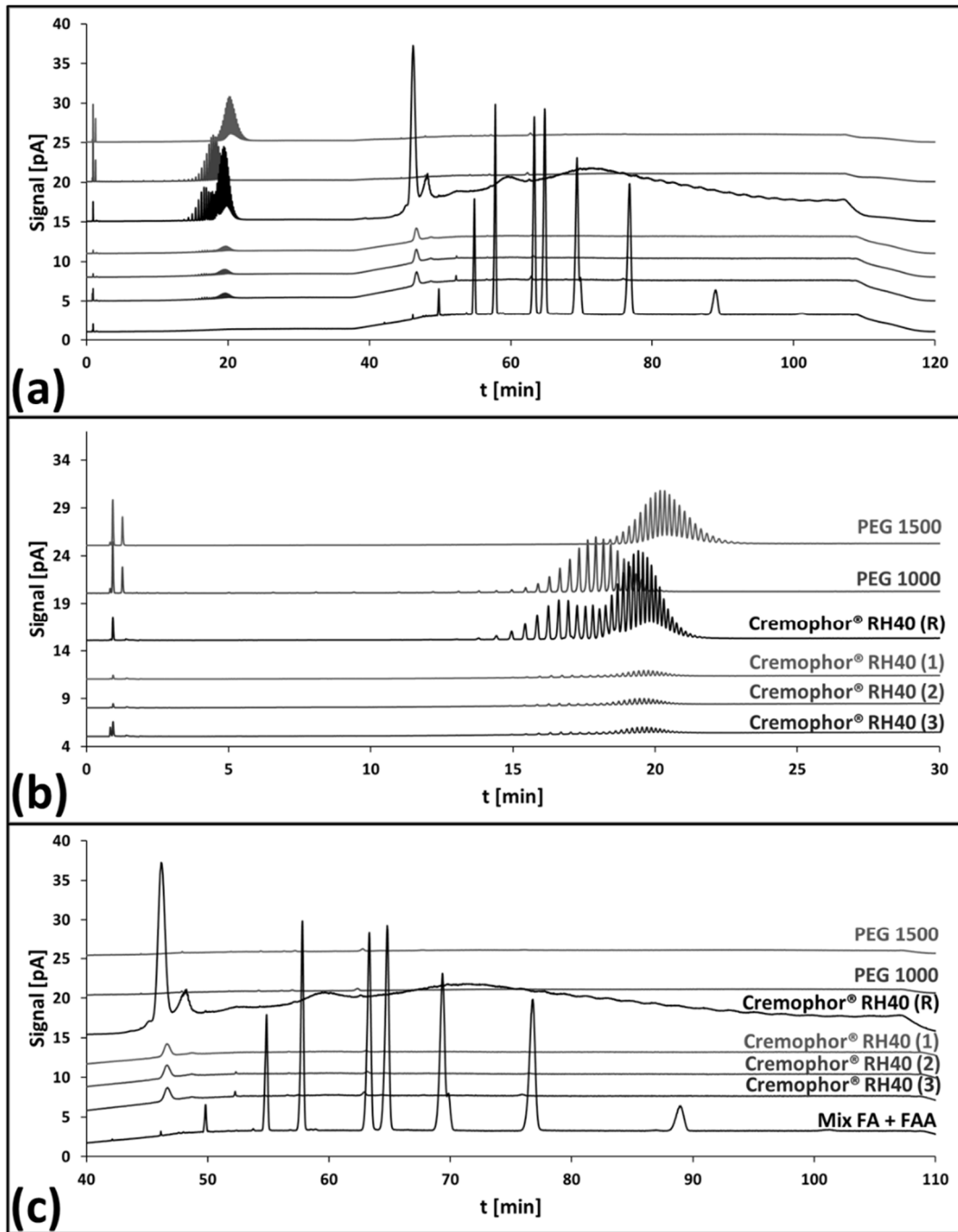


Abb. 4-54: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Cremophor® RH40 (1.1513 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (98.31 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 1000 (111.01 µg/ml), PEG 1500 (96.27 µg/ml) und „Mix FA + FAA“ (jeweils ca. 100 µg/ml von C12 FA, C14 FA, C16 FA, C17 FA, C18 FA, C18:1 FA, C18:2 FA, C16/18 FAA). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

Außerdem konnte der erste der beiden Peaks unter Verwendung der Methode YMC_D003_final nicht in eine entsprechende Polymerverteilung aufgetrennt werden. Auch die Methodenvariation S2M_002 und die Ausgangsmethode YMC_D003 sowie die verkürzte Methode D003_High erbrachten keinerlei Auftrennung (**Abb. 4-55**), weshalb es an dieser Stelle keinen Unterschied macht, welche Methode zur Analyse gewählt wird. Der zweite Peak zeigte bei genauerer Betrachtung (**Abb. 4-57 b**) bei der Methode YMC_D003_final in

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

geringem Maße eine Polymerverteilung, jedoch konnte diese mit keiner der anderen Methoden verbessert werden.

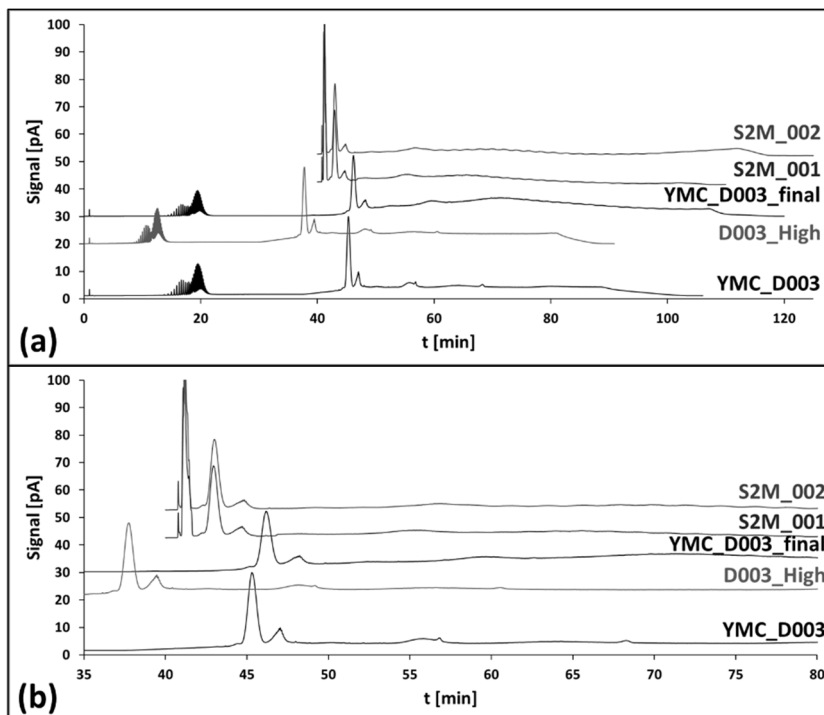


Abb. 4-55: Chromatogramme von Cremophor® RH40 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassten, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

Um den breiten Peak und die darauffolgende schwache Polymerverteilung im lipophilen Bereich weiter zu untersuchen, wurden zwei spezielle Methoden entwickelt, die sehr langsam ansteigende Gradienten nutzten. Die Methode YMC_D003_RH40_001 beruht dabei noch auf der Methode YMC_D003_final, lediglich der Gradient G4 von 32.5 % auf 75 % B wurde in seiner Dauer deutlich erhöht (statt über 10 min über 100 min), sodass ein sehr langsamer Anstieg erreicht wurde. Jedoch führte auch dies, wie in **Abb. 4-56 c** zu sehen, zu keinerlei Auftrennung. Betrachtet man die Retentionszeit des einzelnen Peaks und rechnet sie unter Berücksichtigung des Verzögerungsvolumens ($V_{\text{dwell}} = 1.051 \text{ ml}$) auf die Gradiententabelle um, dann beginnt die Elution bei einer Konzentration von ca. 53 % B. Es war anzunehmen, dass sich bei langsameren Gradienten in diesem Konzentrationsbereich möglicherweise noch eine Auftrennung trotz starker struktureller Ähnlichkeit der Moleküle andeuten könnte. Ansonsten liegt der Verdacht nahe, dass es zu Größenausschlusseffekten kommen könnte, da die Möglichkeit besteht, dass sich diese Glyceroltriestere möglicherweise verknäueln oder untereinander zusammengelagert haben, sodass sie deutlich größere Konstrukte gebildet haben, die in die 12 nm-Poren des Säulenmaterials nicht eindringen können und dadurch

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

nur mit der Oberfläche der Partikel interagieren. Dadurch wäre es möglich, dass beim Überschreiten einer Grenzkonzentration (ca. 53 % B) die gesamte Substanz unmittelbar eluiert wird.

Aus diesem Grund wurde in der Methode YMC_D003_RH40_002 ein steiler Gradient von 32.5 % auf 45 % gewählt und im Anschluss in langgezogenen 5 %-Schritten fortgeführt. Diese Konzentrationserhöhung wurde immer um 5 % über einen Zeitraum von 20 min durchgeführt und das Plateau dann für 10 min konstant gehalten, um eine Auftrennung zu erzielen. Aufgrund der Vermutung der Koelution der freien PEGs und der linearen Macrogolhydroxystearate wurde außerdem der Gradient von 15 % auf 30 % um 10 min verlängert (Gesamtdauer 20 min), um diese Trennung zu verbessern.

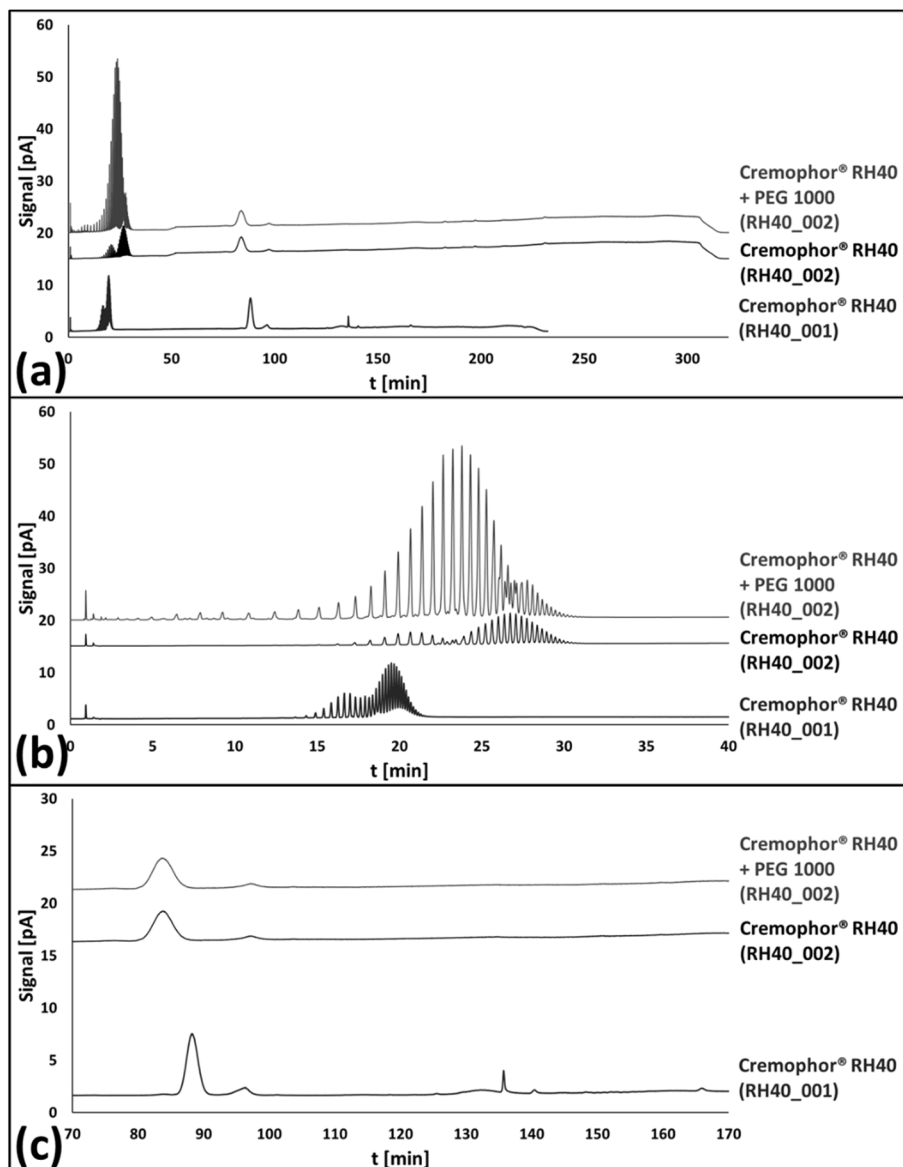


Abb. 4-56: Chromatogramme der Methodenmodifikationen zur weiteren Untersuchung von Cremophor® RH40. Probenkonzentrationen: Cremophor® RH40 (98.31 µg/ml), sowie die gemischte Probe aus Cremophor® RH40 (0.9831 mg/ml) und PEG 1000 (1.1101 mg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In **Abb. 4-56 c** ist zu erkennen, dass auch unter diesen Bedingungen nicht einmal ansatzweise eine weitere Auftrennung der einzelnen Peaks erreicht werden konnte, was zu mehreren Schlüssen führt. Zum einen könnte man annehmen, dass die Struktur monodispers vorlag, d. h. es gab keine unterschiedlichen Polymere, sondern nur ein einziges Monomer. Diese Vermutung wird jedoch einerseits dadurch widerlegt, dass hierfür die Substanz vom Hersteller aufwändig hätte gereinigt werden müssen, um die Monodispersität wiederzuerlangen. In diesem Fall würden sich aber keine linearen, polydispersen Macrogolhydroxystearate und polydispersen PEGs mehr finden, da diese dann mit entfernt werden würden. Diese sind jedoch klar erkennbar, insbesondere mit Hilfe der gemischten Probe aus Cremophor® RH40 und PEG 1000 (**Abb. 4-56 b**) lassen sich die Überlagerungen im hydrophilen Bereich bei $t_R = \text{ca. } 25 - 28 \text{ min}$ gut erkennen. Auch die nachfolgende, ansatzweise erkennbare Polymerverteilung widerlegte die Hypothese der Monodispersität, ebenso wie die bereits erwähnten Ergebnisse der LC-MS-Messungen (**Abb. 4-57 a**). Somit bleibt nur die Vermutung, dass die verwinkelte Triglycerid-artige Struktur oder andere intermolekulare Interaktionen dazu geführt haben könnten, dass die Moleküle agglomerierten und dadurch ein Eindringen in die Poren nicht oder nur eingeschränkt möglich war. Nach Überschreiten einer gewissen Fließmittelzusammensetzung wurde dann die gesamte Substanzmenge eluiert. Diese Hypothese ließe sich dadurch stützen, dass für diese Peaks unterschiedlichste m/z bestimmt wurden, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen. Da die Zusammensetzung dieser „Knäuel“ immer hochvariabel ist und auch die Ladung sich unterscheiden kann, sind die resultierenden m/z äußerst willkürlich und dadurch keiner bestimmten Struktur zuzuordnen. Bei der später eluierenden schwach-erkennbaren Polymerverteilung (ca. 47 – 50 min) handelt es sich hingegen um verbleibende, „unverknäuelte“ Polymere, die sich jedoch nur so gering unterschieden, dass sie kaum aufgetrennt werden konnten.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

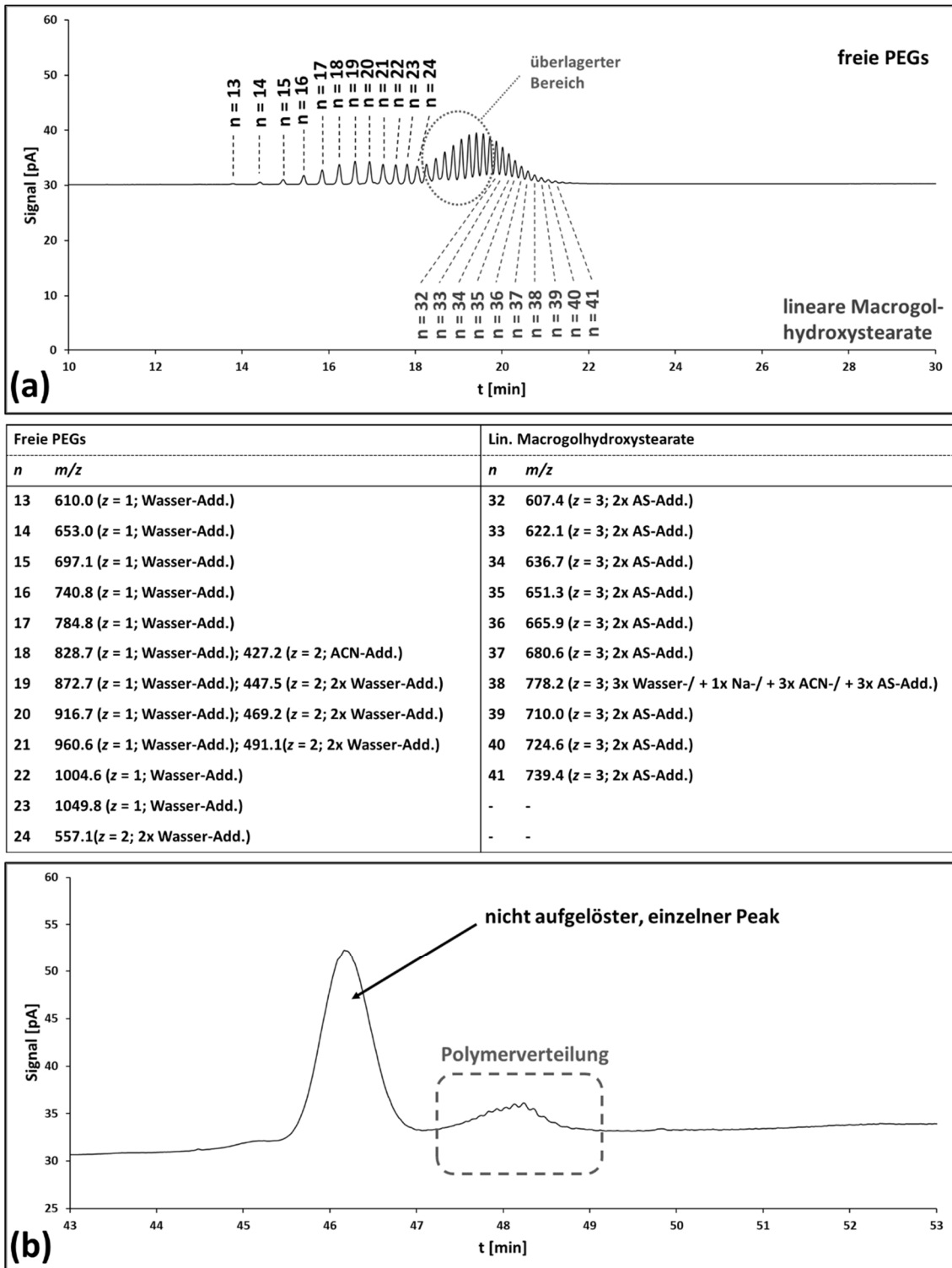


Abb. 4-57: Chromatographische Ergebnisse (LC-MS) zu Cremophor® RH40 unter Verwendung der Methode YMC_D003_final. **(a)** Zusammen gefasste Peakzuordnung und Tabelle nach Bestimmung mittels LC-MS. **(b)** Vergrößerter Ausschnitt des lipophilen Bereichs. (ACN-Add. = Acetonitril-Addukt; AS-Add. = Ameisensäure-Addukt; Na-Add. = Natrium-Addukt)

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.3.3. Ergebnisse: Polysorbate

4.3.3.1. Polyoxyethylen-sorbitan-laurat (Tween® 20)

Die Gruppe der Polysorbate weicht von den bisher betrachteten, vorrangig linearen Molekülen ab. So bestehen sie aus einem Sorbitan-Grundgerüst, welches mit PEG-Ketten mit einer Gesamtanzahl von $n = 20$ EGE verethert ist. An einer dieser Ketten ist eine Fettsäure verestert.

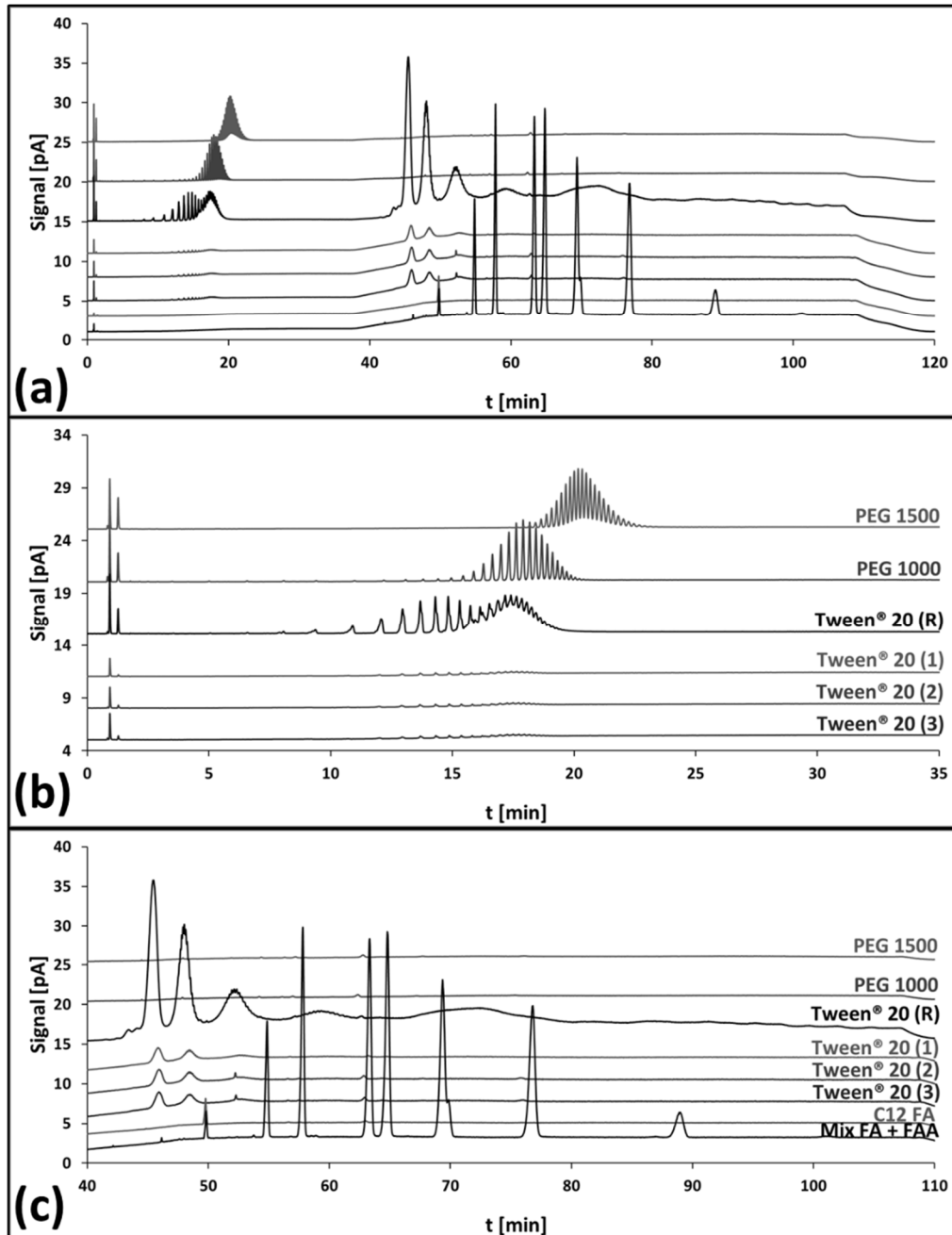


Abb. 4-58: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Tween® 20 (1.026 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (97.98 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 1000 (111.01 µg/ml), PEG 1500 (96.27 µg/ml) und „Mix FA + FAA“ (jeweils ca. 100 µg/ml von C12 FA, C14 FA, C16 FA, C17 FA, C18 FA, C18:1 FA, C18:2 FA, C16/18 FAA). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Trotz struktureller Unterschiede des Grundgerüsts war auch hier eine der Lipophilie folgende Elutionsreihenfolge zu erwarten, sodass die bislang erwähnten Methoden angewendet werden konnten.

Tween® 20 ist der Partialester aus überwiegend Laurinsäure (C12 FA). Diese FA bildet, wie bereits geschildert (Kapitel 4.2), die Untergrenze der Detektierbarkeit der Fettsäuren bei Verwendung der "Charged Aerosol"-Detektion. Wie jedoch in **Abb. 4-58** zu sehen ist, wurde die in der Referenzprobe bei etwa 50 min eluierende FA vermutlich von den Polysorbaten überlagert. Außerdem ist diese Fettsäure semi-flüchtig, was sich dadurch bestätigte, dass sie unter isokratischen Bedingungen und gleicher Probenkonzentrationen zu deutlich geringeren Peakflächen geführt hat, als die FA längerer Ketten. So würde sie auch in Randbereichen der Polymerverteilungen nur schwer erkennbar sein, wie z. B. als Peakverformung. Die Polymerverteilungen ließen sich als drei separate Verteilungen im Bereich 45 – 60 min beobachten. Dies könnte auf das Auftreten von verschiedenen Mono-, Di- und Triestern zurückzuführen sein.

Die freien PEGs wurden in der Größenordnung von ca. $n = 7 - 40$ (6 – 21 min) gefunden, was den Erwartungen von einer mittleren PEG-Kettenlänge von $n = 20$ EGE entspricht. Als Referenzen dienten PEG 1000 und PEG 1500.

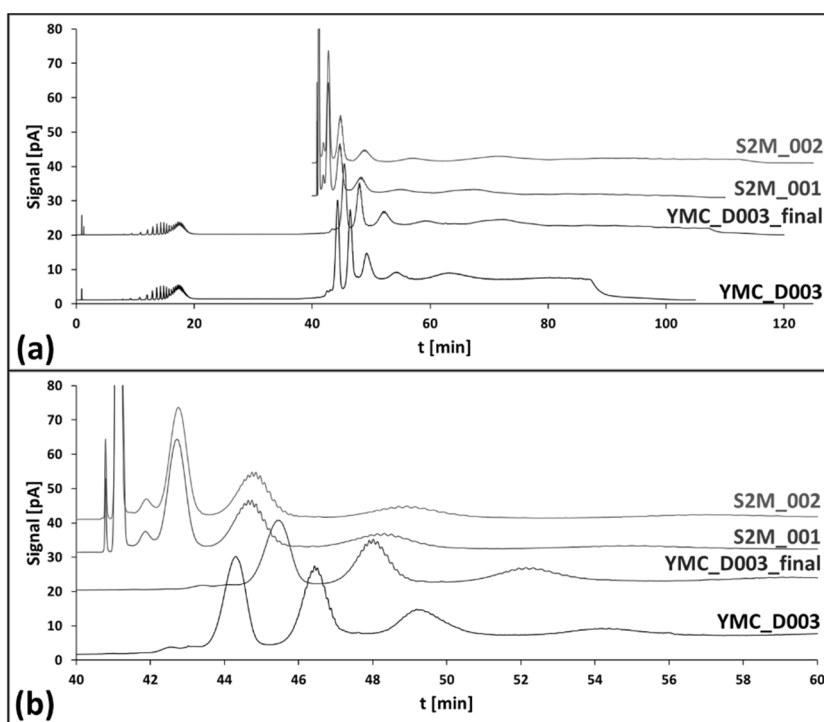


Abb. 4-59: Chromatogramme von Tween® 20 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassten, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

Betrachtet man den Methodenvergleich in **Abb. 4-59**, so ist festzustellen, dass die Methoden mit dem verlängerten Gradienten von 32.5 % auf 75 % B (S2M_001, YMC_D003_final, S2M_002) untereinander vergleichbare Ergebnisse erzielten und die Ester-Verteilung besser aufgelöst darstellten als die ursprüngliche Methode YMC_D003. Dadurch ist auch hier die final gewählte Methode YMC_D003_final zu bevorzugen.

4.3.3.2. Polyoxyethylen-sorbitan-oleat (Tween® 80)

Tween® 80 ist ein Polysorbat das als lipophile Komponente überwiegend Ölsäure (C18:1 FA) enthält und zudem andere Fettsäuren enthalten kann. In **Abb. 4-60** fällt zunächst die Ester-Verteilung bei 58 – 63 min und ein vorher eluierender Peak bei einer Retentionszeit von 50 – 57 min auf. Bei der Ester-Verteilung scheint es sich um das entsprechende Oleat zu handeln, da diese kurz vor der Retentionszeit der Ölsäurereferenz (65 min) eluiert wurde. Auch ist hier die freie C18:1 FA klar abgetrennt, was auf den Lipophilie-senkenden Einfluss der PEG-Ketten ($n = 20$) zurückzuführen ist.

Berücksichtigt man die Beobachtungen aus Tween® 20, dann könnte es sich bei dem prominenten Peak (bei 50 – 57 min) ebenfalls um eine, in diesem Fall schlecht aufgelöste, Oligomerverteilung der Di- oder Triester handeln. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es sich hierbei um Ester von Abbauprodukten handelt. So ist die C18:1 FA, wie alle ungesättigten Verbindungen, anfällig gegenüber Autoxidationen. Diese führen meist zu zahlreichen Stereoisomeren, die zusätzliche Hydroxylgruppen an den C-Atomen in Allylstellung addieren. Die dabei entstehenden Diastereomere und Enantiomere der hydroxylierten Polysorbate unterscheiden sich hierbei nicht mehr in einem zur Trennung ausreichenden Maße und könnten in einem relativ breiten Peak gemeinsam eluiert werden.

Auch hier wurden freie PEGs in der Größenordnung von ca. $n = 7 - 40$ (6 – 21 min) detektiert, was den Erwartungen von einer mittleren Kettenlänge von $n = 20$ EGE entspricht. PEG 1000 und PEG 1500 dienen als Referenzen zur Zuordnung.

Betrachtet man den Methodenvergleich in **Abb. 4-61**, so zeigt sich auch hier, dass die Methoden mit dem verlängerten Gradienten von 32.5 % auf 75 % B (S2M_001, YMC_D003_final, S2M_002) untereinander vergleichbare Ergebnisse erzielen und die Ester-Verteilung besser auftrennen konnten als die ursprüngliche Methode YMC_D003. Dadurch ist auch in diesem Fall die final gewählte Methode YMC_D003_final zu bevorzugen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

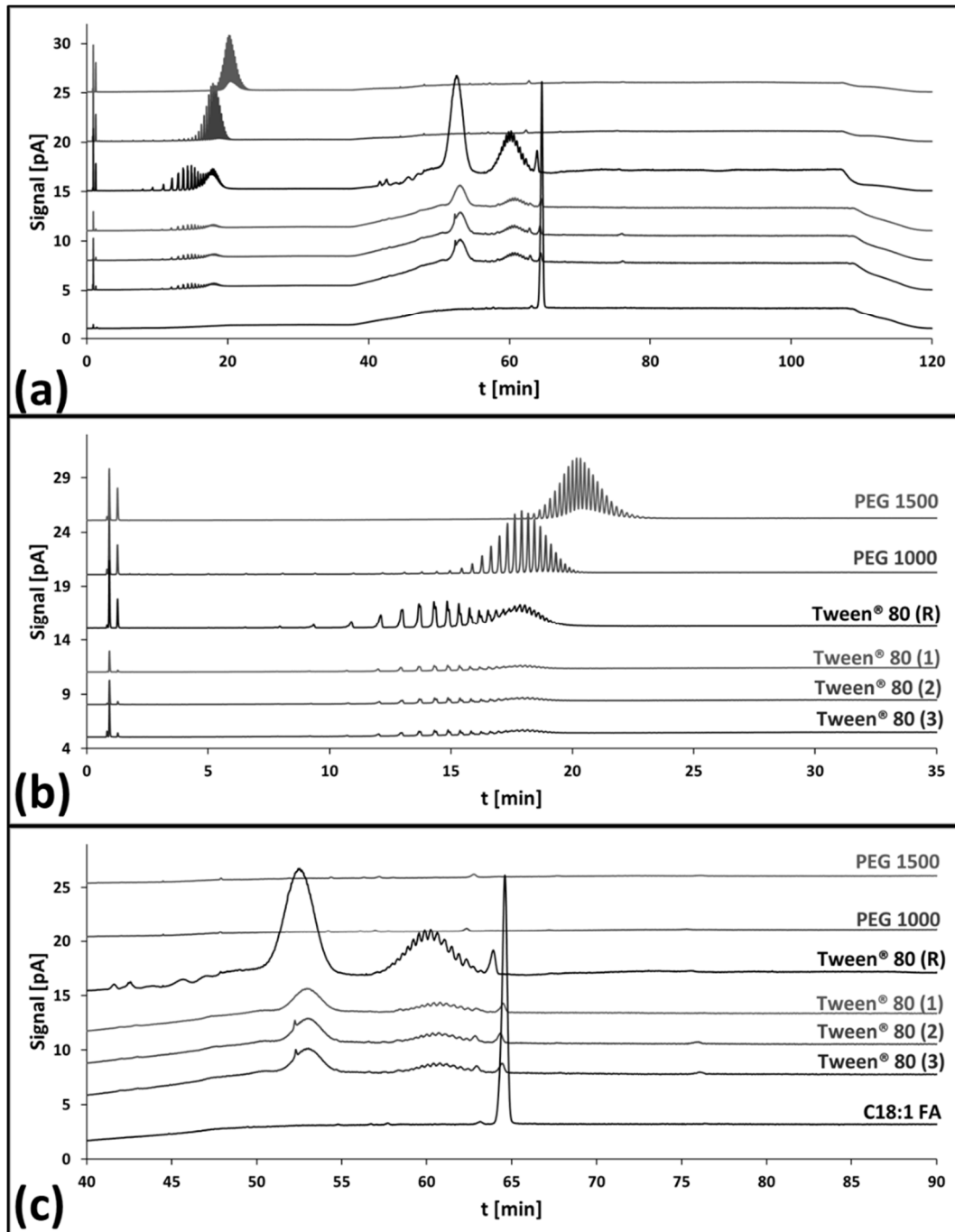


Abb. 4-60: Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Tween® 80 (1.129 mg/ml), sowie der Dreifachbestimmung (1) – (3) bei niedrigerer Konzentration (109.05 µg/ml), und den entsprechenden Referenzen PEG 1000 (111.01 µg/ml), PEG 1500 (96.27 µg/ml) und C18:1 FA“ (106.30 µg/ml). **(a)** Gesamtdarstellung. **(b)** Relevanter Ausschnitt PEGs. **(c)** Relevanter Ausschnitt Ester und FA.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

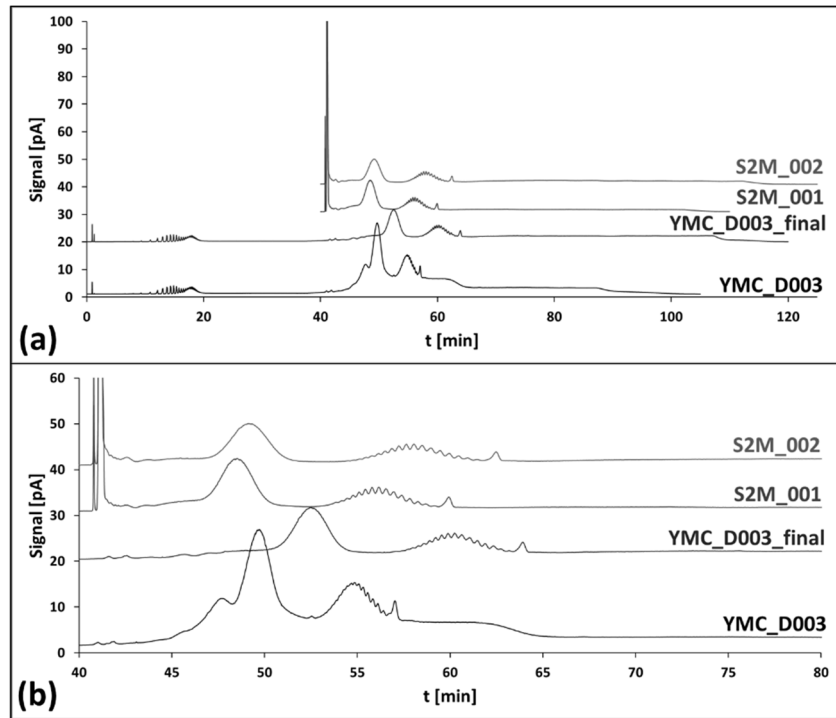


Abb. 4-61: Chromatogramme von Tween[®] 80 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III. Die verkürzten Methoden S2M_001 und S2M_002, die sich nur mit dem Übergang von Teil I (Trennung der PEGs) auf Teil II und III (Trennung der FA, FAA, Ether und Ester) befassten, wurden zur besseren Vergleichbarkeit um ein Zeitintervall von 40 min verschoben.

4.4. Besondere Betrachtungen: Oxidativer Abbau ungesättigter Fettsäuren

Zwei Beobachtungen führten zu diesen weiterführenden Betrachtungen: zum einen wurden während der Methodenentwicklung ältere Chargen der ungesättigten FA Ölsäure (C18:1 FA) und Linolsäure (C18:2 FA) verwendet. Hierbei traten neben den Hauptpeaks weitere Peaks von beträchtlicher Intensität auf, welche sich vermutlich auf das Alter der Substanzen und den damit verbundenen oxidativen Verderb zurückführen lassen. Des Weiteren spielten natürlich die Beobachtungen aus Brij® O20 und Tween® 80 eine große Rolle, bei denen die lipophile Komponente, der Oleylalkohol für Brij® O20 und die Ölsäure für Tween® 80, eine ungesättigte Verbindung ist. So traten bei beiden Hilfsstoffen Nebenprodukte auf, die sich in Form von eigenständigen Oligomer- und Polymerverteilungen zeigten.

Diese Nebenprodukte können oft auf Autoxidationen an C-Atome in Allylstellung zurückgeführt werden, wobei es sich meist um die entsprechenden Hydroperoxide und die daraus entstehenden Aldehyde bzw. Ketone, Alkohole oder Carbonsäuren handelt. Dies birgt zusätzliche Risiken, einerseits durch die veränderten physikochemischen Eigenschaften des Emulgators wie beispielsweise pK_s , Lipophilie und Löslichkeit, welche die Formulierung destabilisieren können, und andererseits können die Abbauprodukte, insbesondere die Peroxide, mit den enthaltenen Arzneistoffe reagieren. Durch die Peroxidzahl erhält man zwar eine Größenordnung an enthaltenen Peroxiden, jedoch sind diese nicht die einzigen Abbauprodukte. In **Abb. 4-62** ist ein Teil der möglichen oxidativen Abbauprodukte der Ölsäure dargestellt, in **Tab. 8-20** und **Tab. 8-21** im Anhang finden sich Übersichten zu den Strukturen der potentiellen Abbauprodukte von Öl- und Linolsäure. Entstehen kann hier eine Vielzahl an Stereo- und Positionsisomeren an Peroxiden, aus welchen dann über verschiedene Mechanismen wie die Russell-Eliminierung und die β -Spaltung die entsprechenden Folgeprodukte (Aldehyde, Ketone, Alkohole und Carbonsäuren) entstehen können. Die Linolsäure bietet aufgrund ihrer zweiten Doppelbindung zusätzliches Potential zum oxidativen Verderb. So gibt es hier statt zwei C-Atomen in Allylstellung vier. Außerdem neigen mehrfach ungesättigte Verbindungen zu Dimerisierung und Oligomerisierung, was die Anzahl an Nebenprodukten weiter erheblich erhöht [164-166].

In einem ersten Probendurchlauf wurden die älteren Substanzen (C18:1 FA „alt“ und C18:2 FA „alt“) mit einer finalen Konzentration von 1 % Wasserstoffperoxid gestresst und zu bestimmten Zeitpunkten injiziert. Die Trennung erfolgte mittels der Methode YMC_D003. Diese Substanzen waren jedoch bereits so stark abgebaut, dass sich keine weitere Veränderung feststellen ließ, was aber auch gleichzeitig an der geringen Konzentration H_2O_2 gelegen haben kann.

Um nun eine Eignung der Methode YMC_D003_final für die Erfassung dieser Abbauprodukte zu überprüfen, wurden neue, d. h. frische Ölsäure- und Linolsäureproben mit 3.5 %-igem Wasserstoffperoxid mit und ohne Inkubation bei 60 °C (über 24 h) gestresst und zu bestimmten Zeitpunkten vermessen. Da Carbonsäuren und insbesondere Peroxide im Wellenlängenbereich von 210 nm absorbieren, wurde hier zusätzlich die UV-Detektion vorgeschaltet. Mittels LC-MS wurden die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Peaks der

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Verunreinigungen bestimmt. Um keine Verunreinigungen bzw. Abbauprodukte zu vernachlässigen, wurden die Proben einerseits im Positivmodus (nach 63 d) und andererseits im deutlich interessanteren Negativmodus (nach 190 d) vermessen.

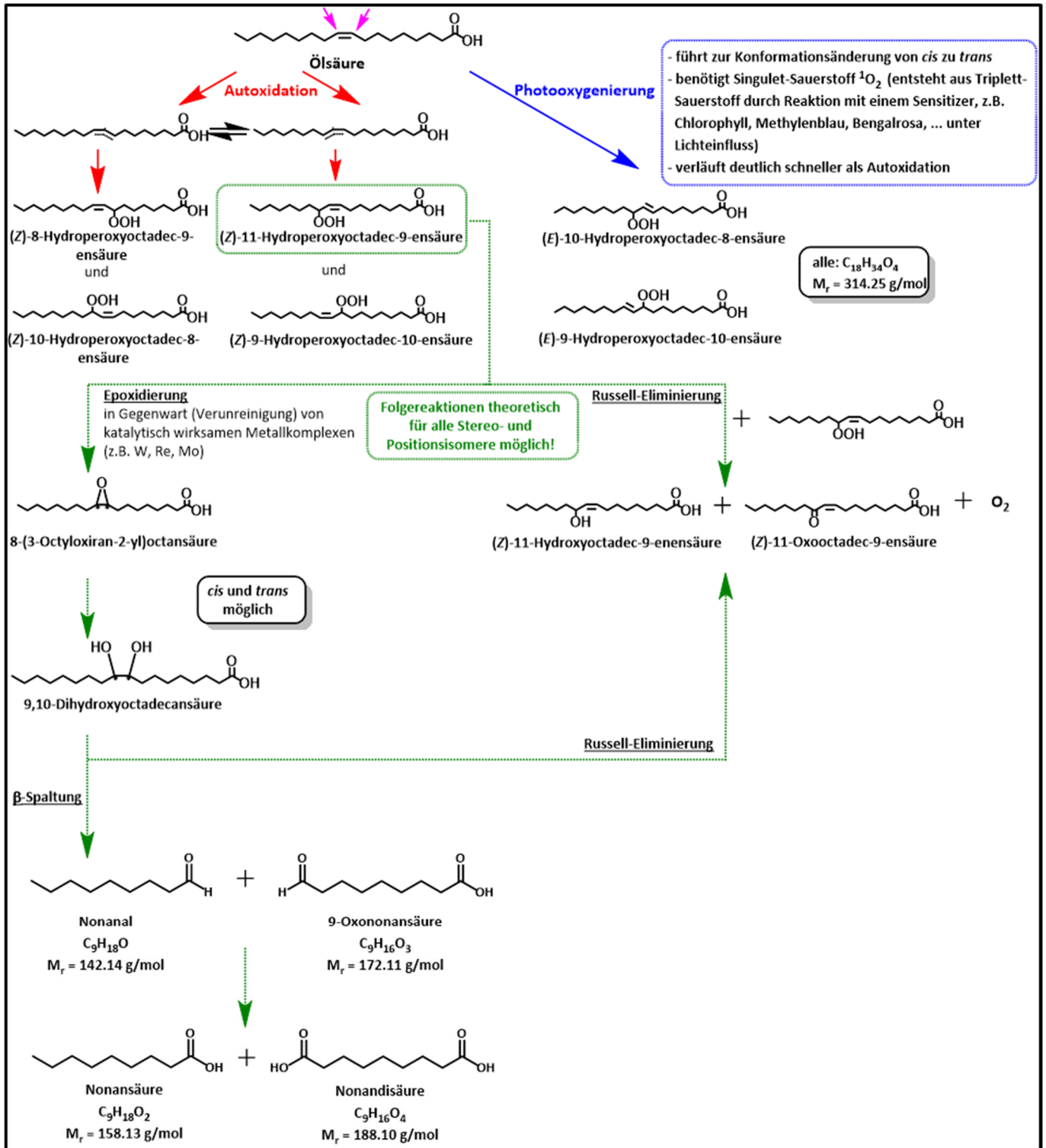


Abb. 4-62: Mögliche Abbauprodukte der Öl- und Linolsäure am Beispiel der Ölsäure [164-166].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da es im Positivmodus jedoch keine nennenswerten Signale gab, blieb dieser bei der weiteren Diskussion unberücksichtigt und nur die Ergebnisse des Negativmodus wurden in Betracht gezogen. Um entstehende Abbauprodukte bei normalen Laborbedingungen (Raumtemperatur, Lichteinfluss) sowie die Einflüsse des Wasserstoffperoxids zu beobachten, wurde ein Teil der Lösungen jeweils in einem Rundgläschen mit Schnappdeckelverschluss auf der Laborbank (Probe „Bench“) gelagert.

Abb. 4-63 zeigt beide Säuren im Vergleich zur frischen, ungestressten Probe t_0 . Es ist eine deutliche Zunahme an Abbauprodukten über die gesamte Messdauer ($t = 0$ h bis $t = 66$ h) zu beobachten. Auch bildeten die Proben mit der zusätzlichen Temperaturbelastung erheblich größere Mengen an Abbauprodukten als die Proben, die nur mit H_2O_2 gestresst wurden und die Proben, die bis zu 190 Tagen auf der Laborbank gelagert wurden. Auch wurde bestätigt, dass Linolsäure aufgrund ihrer zweiten Doppelbindung eine höhere Oxidationsrate und Diversität an Abbauprodukten hervorbringt [167], was sich in einer deutlich höheren Peakanzahl darstellte.

Des Weiteren zeigten sich unter Verwendung der verschiedenen Detektoren (CAD, UV bei $\lambda = 210$ nm, Ionenfalle) verschiedene Abbauprodukte in verschiedenartigem Ausmaße, was den Schluss zulässt, dass auch semi-flüchtige bzw. flüchtige Abbauprodukte entstanden sind. Außerdem deutet auch eine mangelhafte Detektion darauf hin, dass möglicherweise nur schwach ionisierbare oder nicht-ionisierbare Substanzen entstanden sein könnten.

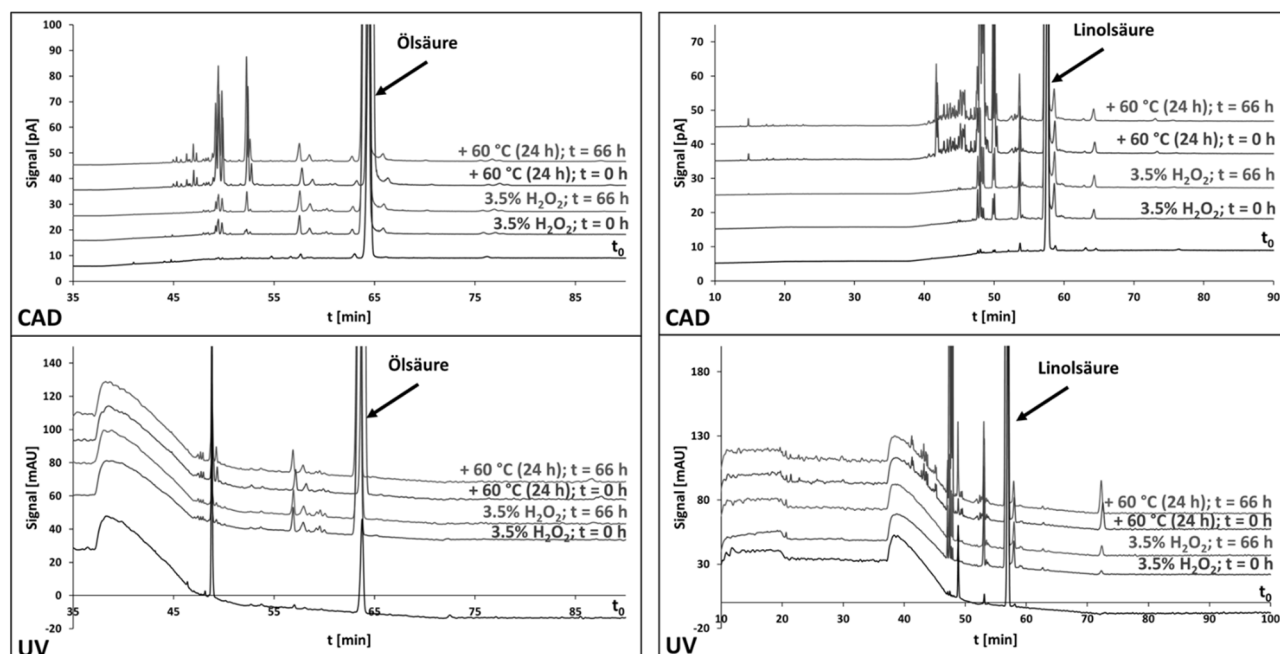


Abb. 4-63: Übersicht der Ergebnisse der Stresstests für Ölsäure (links) und Linolsäure (rechts). Die Detektion erfolgte nach Trennung mit dem Gradienten von YMC_D003_final mittels CAD mit vorgeschalteter UV-Detektion ($\lambda = 210$ nm) Das Injektionsvolumen betrug $10 \mu\text{l}$.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Vergleich der Ergebnisse aus CAD, UV und MS für die Ölsäure ergibt, dass die in **Abb. 4-64** in die unterschiedlichen Bereiche a – e eingeteilten Signale zu einer Vielzahl von Strukturen gehören können. Eine Zuordnung ist möglich, sofern die Substanzen ionisierbar und somit der MS-Detektion zugänglich sind. Dies war für Diole (Bereich a, **Abb. 4-64 a, Tab. 4-6 a**), Hydroperoxide (Bereich b, **Abb. 4-64, Tab. 4-6 b**) und Ketone (ebenfalls Bereich b, **Abb. 4-64 b, Tab. 4-6 b**) möglich. Für die Bereiche c – e war dies nicht möglich, was jedoch zumindest den Schluss zulässt, dass es sich vermutlich um Substanzen handelt, bei denen es zum Verlust der Carbonsäurefunktion kam, welche hier zur Ionisierbarkeit beiträgt.

Tab. 4-6: Ergebnisse und Zuordnung der Stabilitätsuntersuchungen von Ölsäure [164-172].

Bereich	t_R [min]	m/z	Detektor-signal	in Probe enthalten	Zuordnung
a	45 – 46	316.0 ± 0.2	MS > CAD > UV	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60 °C	Spaltprodukte der Epoxide, <i>syn</i> - und <i>anti</i> -Diole möglich (theor. 316.48)
b	47.9 – 48.8	331.2 ± 0.4	MS > CAD > UV	H ₂ O ₂ , H ₂ O ₂ + 60 °C	Hydroperoxide mit Wasser-Add. (theor. 331.25) der Ölsäure; 4 Stereoisomere möglich
b	47.9 – 48.8	331.2 ± 0.4	MS > CAD > UV	insb. H ₂ O ₂ + 60 °C	Hydroperoxide mit Wasser-Add. (theor. 331.25) der Elaidinsäure; 4 Stereoisomere möglich
b	48.4 – 49.1	341.1 ± 0.2	MS > CAD > UV	Bench, H ₂ O ₂ , H ₂ O ₂ + 60 °C	Ketone mit AS-Add. (theor. 341.27)
c	51.5 – 53.5	-	CAD	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60 °C	Keine Zuordnung möglich aufgrund fehlender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäurefunktion möglich.
d	56.5 - 61	-	CAD, UV	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60 °C	Keine Zuordnung möglich aufgrund fehlender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäurefunktion möglich.
e	65 - 66	-	CAD	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60 °C	Keine Zuordnung möglich aufgrund fehlender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäurefunktion möglich.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

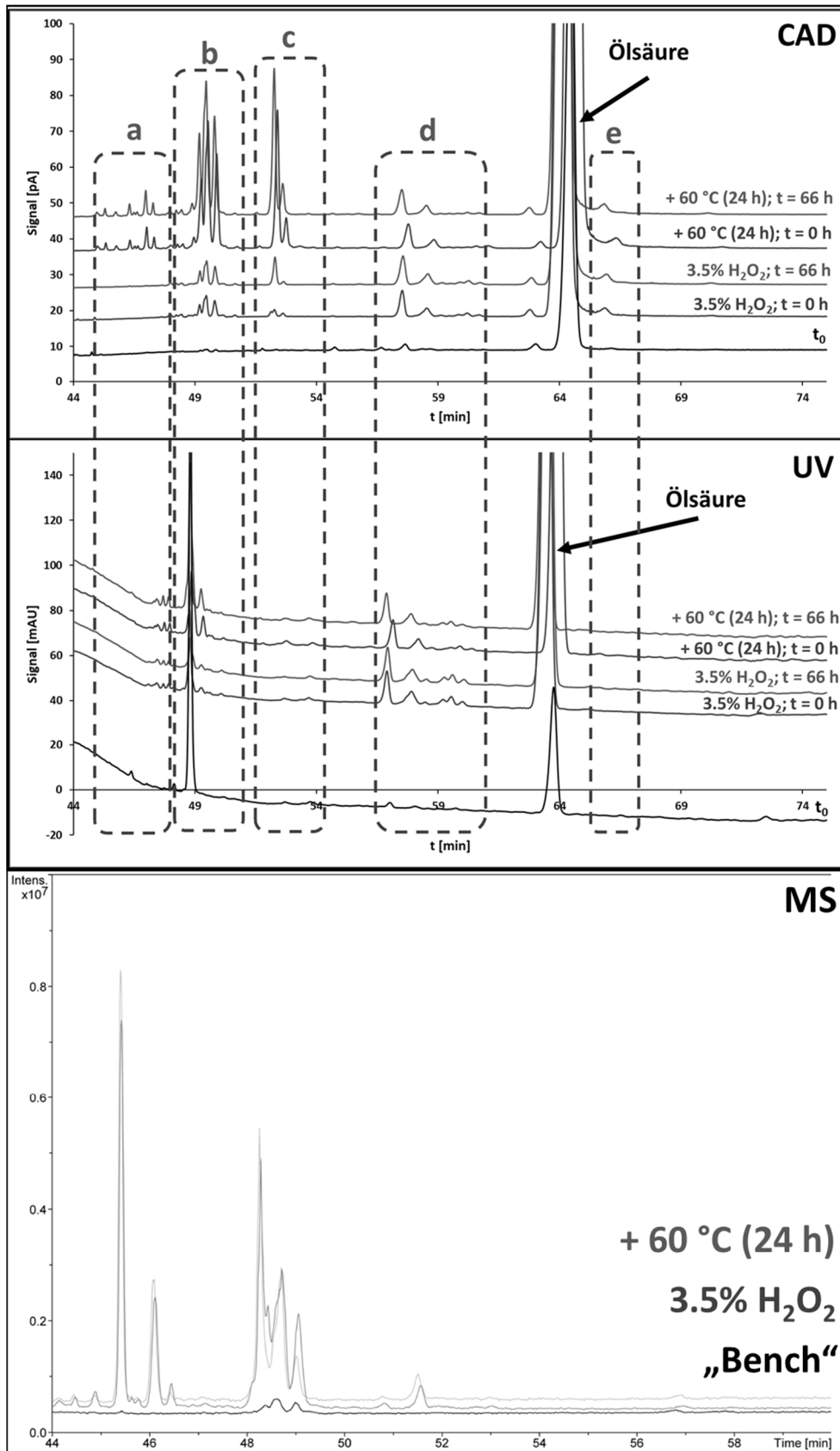


Abb. 4-64: Ausgewählte Bereiche der Chromatogramme zur Bestimmung der Abbauprodukte der Ölsäure. Injektionsvolumen für UV/CAD 10 µl, Injektionsvolumen für LC-MS 1 µl.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die große Menge an Peaks mit ähnlicher Retentionszeit lässt sich darauf zurückführen, dass eine Vielzahl an Stereoisomeren entstehen kann. So sind die gefundenen Dirole (**Abb. 4-64 a**) Spaltprodukte der Epoxide. Diese Epoxide entstehen an der Doppelbindung durch Radikale und Sauerstoff und können unter Metallkatalyse (W, Re, Mo) in *syn*- bzw. *anti*-Dirole gespalten werden [164-166]. Diese Metalle waren vermutlich als Verunreinigung in dem verwendeten H₂O₂ enthalten, da diese Abbauprodukte nur in den gestressten Proben gefunden wurden nicht aber in der auf der Laborbank (Bench) gelagerten.

Die Hydroperoxide wiederum (**Abb. 4-64 b**) können in insgesamt 8 Stereoisomeren vorliegen: Vier für Ölsäure und vier für Elaidinsäure. Letztere kann synthetisch unter thermischer Umsetzung (40 °C, 5 h) der Ölsäure (*Z*-konfiguriert) in die Elaidinsäure (*E*-konfiguriert) erzeugt werden [168]. Diese Bedingungen werden in dem Ansatz mit zusätzlicher thermischer Belastung (60 °C, 24 h) problemlos erreicht, was den Signalzuwachs dieser Probe erklärt. Auch die Signalzunahme dieser Probe bezüglich der Ketone (**Tab. 4-6 b**) ist dadurch erklärbar, da die Russell-Eliminierung ebenfalls über thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) verläuft [168]. Die auf der Laborbank gelagerte Probe (190 d) enthielt hauptsächlich nur Ketone als Abbauprodukte, was ein Indikator dafür sein kann, dass die Hydroperoxide über längere Zeit nicht stabil sind und aus diesem Grund zu den stabileren Formen (Ketonen, Alkoholen) weiterreagieren. Ihr Vorkommen in den gestressten Proben auch nach 190 d lässt sich durch den noch immer vorhandenen Überschuss an H₂O₂ leicht erklären, welche für eine stetige Nachproduktion der Hydroperoxide sorgt.

Betrachtet man die Ergebnisse zur Linolsäure (**Abb. 4-65, Abb. 4-66 und Tab. 4-7**), dann lassen sich auch hier wieder Unterschiede je nach verwendeter Detektionsart erkennen. Die markierten Bereiche d und e (**Abb. 4-66 und Tab. 4-7**, jeweils **d** und **e**) waren mit allen drei Detektoren sichtbar. Bei den hier eluierenden Substanzen handelt es sich vermutlich um die verschiedenen Stereoisomere der Alkohole, die durch Russell-Eliminierung aus den einzelnen Hydroperoxiden entstehen können. Da diese insbesondere bei erhöhter Temperatur (40 °C, 5 h) abläuft [168], wurden auch hier in der Probe mit zusätzlicher Temperaturbelastung (60 °C, 24 h) deutlich größere Mengen gefunden. Der Retentionsbereich e trennte sich zwar deutlich von der vorhergehenden Peakansammlung ab, jedoch handelte es sich auch hierbei um Alkohole, was anhand der erhaltenen *m/z* bestätigt werden konnte. Hierbei handelt es sich vermutlich um die Isomere, die aufgrund ihrer sterischen Orientierung besser mit der stationären Phase Wechselwirkungen eingehen können. So ist es denkbar, dass durch die sterische Orientierung der Doppelbindung und die Lokalisation der Hydroxylgruppe diese durch den lipophilen Teil abgeschirmt wird, sodass das Molekül nach außen hin lipophiler wirkt. Auch könnte es sich um die (*E*)-Isomere der Alkohole handeln, die aufgrund ihrer linearen Struktur besser mit dem „Bürstensaum“ des C₁₈-Materials wechselwirken konnten (Vergleich Kapitel **1.1.2**), als die gewinkelt angeordneten (*Z*)-Isomere. Jedoch handelt es sich hierbei nur um Vermutungen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tab. 4-7: Ergebnisse und Zuordnung der Stabilitätsuntersuchungen von Linolsäure [164-166, 168].

Bereich	t_R [min]	m/z	Detektor-signal	in Probe enthalten	Zuordnung
a	14 – 24	-	MS, CAD	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60 °C	Keine Zuordnung möglich aufgrund ungenügender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäure-funktion möglich.
b	28.8 – 30.4 und 35.7 – 41.0	380.0 ± 0.5	MS	Bench, H ₂ O ₂ , H ₂ O ₂ + 60 °C	(Na+AS)-Add. (theor. 381.25); Einzelmasse 312.23: verschiedene Moleküle möglich: 12 stereoisomere Hydroperoxide, sowie Strukturen mit Keton- und Alkoholfunktion.
c	40.4 – 45.1	358.8 ± 0.7	MS, CAD	Bench, H ₂ O ₂ , H ₂ O ₂ + 60 °C	AS-Add. (theor. 358.26); Einzelmasse 312.23: verschiedene Moleküle möglich: 12 stereoisomere Hydroperoxide, sowie Strukturen mit Keton- und Alkoholfunktion
d	46.8 – 48.1	295.7 ± 0.7	MS, CAD, UV	Bench, H ₂ O ₂ , H ₂ O ₂ + 60 °C	Alkohole (theor. 296.45); durch Russell-Eliminierung aus Hydroperoxiden, 12 Stereoisomere möglich.
d	43.7 – 44.4	314.6 ± 0.5	MS, CAD, UV	Bench, H ₂ O ₂ , H ₂ O ₂ + 60 °C	Wasser-Add. der Alkohole (theor. 314.45); durch Russell-Eliminierung aus Hydroperoxiden, 12 Stereoisomere möglich.
e	48.5 – 49.5	341.0 ± 0.3	MS, CAD, UV	Bench, H ₂ O ₂ , H ₂ O ₂ + 60 °C	AS-Add. der Alkohole (theor. 342.48); durch Russell-Eliminierung aus Hydroperoxiden, 12 Stereoisomere möglich.
f	52 – 54.5	-	CAD > UV	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60 °C	Keine Zuordnung möglich aufgrund fehlender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäure-funktion möglich.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bereich	t_R [min]	m/z	Detektor-signal	in Probe enthalten	Zuordnung
g	57.5 – 60	-	CAD, UV	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60	Keine Zuordnung möglich aufgrund fehlender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäurefunktion möglich.
h	63 - 65	-	CAD > UV	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60	Keine Zuordnung möglich aufgrund fehlender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäurefunktion möglich.
i	72 - 73	-	CAD < UV	H ₂ O ₂ und H ₂ O ₂ + 60	Keine Zuordnung möglich aufgrund fehlender MS-Detektion. Theoretisch durch Verlust der Carbonsäurefunktion möglich.

Bei Bereich b (**Abb. 4-65 b**) sowie c (**Abb. 4-66 c, Tab. 4-7 b** und **c**) handelt es sich vermutlich um die Hydroperoxide, die in 12 verschiedenen stereoisomeren Formen vorliegen können. Diese können beispielsweise weiter zu Alkoholen reagieren (Bereich d und e). Aus diesen Alkoholen kann an der zweiten Doppelbindung ein Epoxid entstehen, welches nach Epoxid-Solvolyse zu einem Keton umgelagert wird [166]. Diese würden ein identisches theoretisches m/z von 312.23 wie die Hydroperoxide ergeben, sodass eine genaue Differenzierung, um welche Struktur es sich letztendlich hier handelt, nicht möglich ist.

Die Bereiche a, f, g, h, i (**Abb. 4-65, Abb. 4-66**) waren in der Ionenfalle nicht detektierbar, weshalb sich hier keine Vermutungen bezüglich einer Strukturidentifikation aufstellen lassen. Dies kann verschiedene Ursachen haben: So könnten die Substanzen generell nicht ionisierbar sein oder das Injektionsvolumen zu gering gewählt worden sein. Die Bereiche a und i waren zwar im MS-Chromatogramm sichtbar, jedoch zeigte sich im Massenspektrum nur das Grundrauschen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

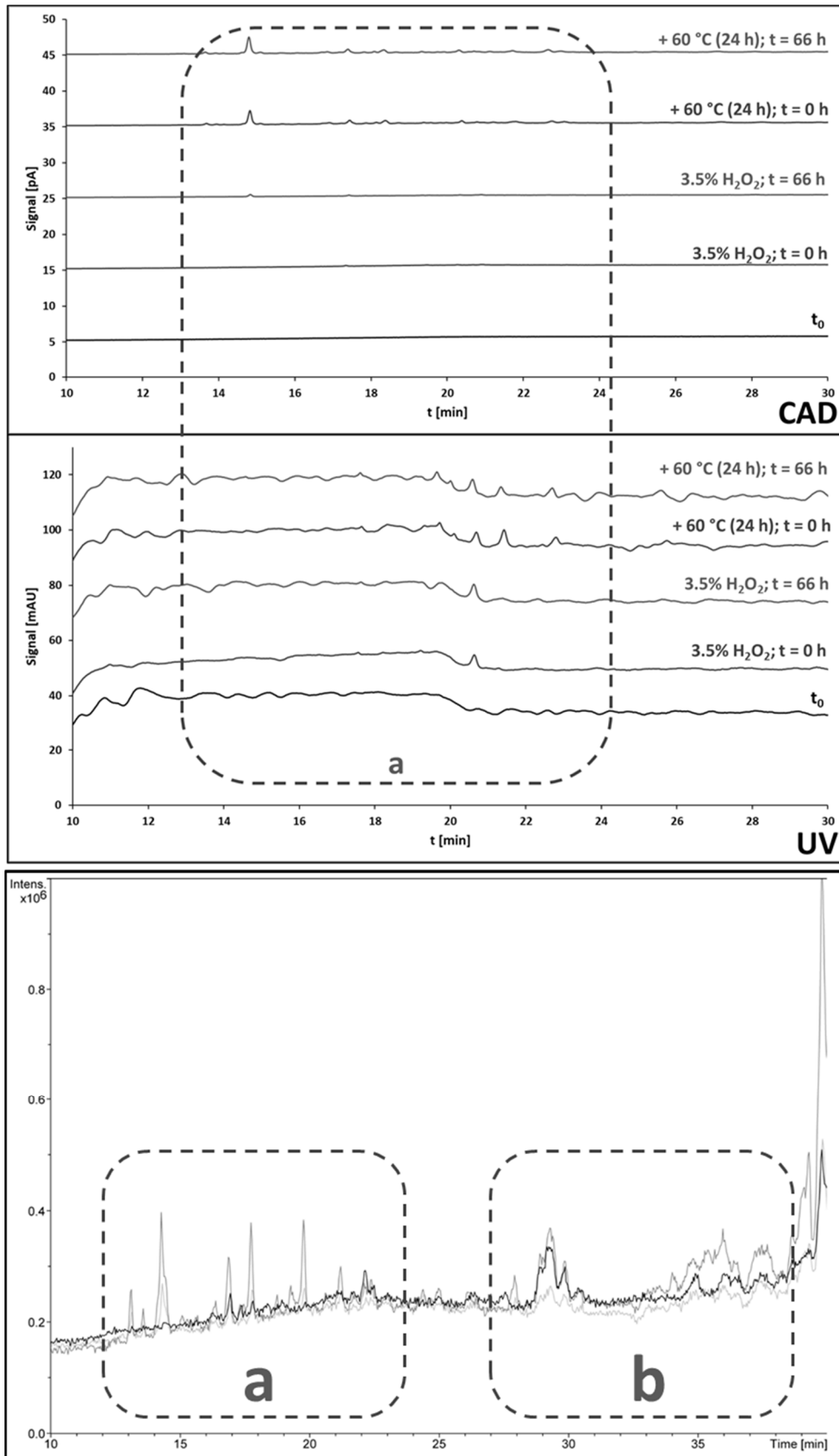


Abb. 4-65: Ausgewählte Bereiche der Chromatogramme zur Bestimmung der Abbauprodukte der Linolsäure. Injektionsvolumen für UV/CAD 10 µl, Injektionsvolumen für LC-MS 1 µl. Retentionsbereich 10 - 35 min.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

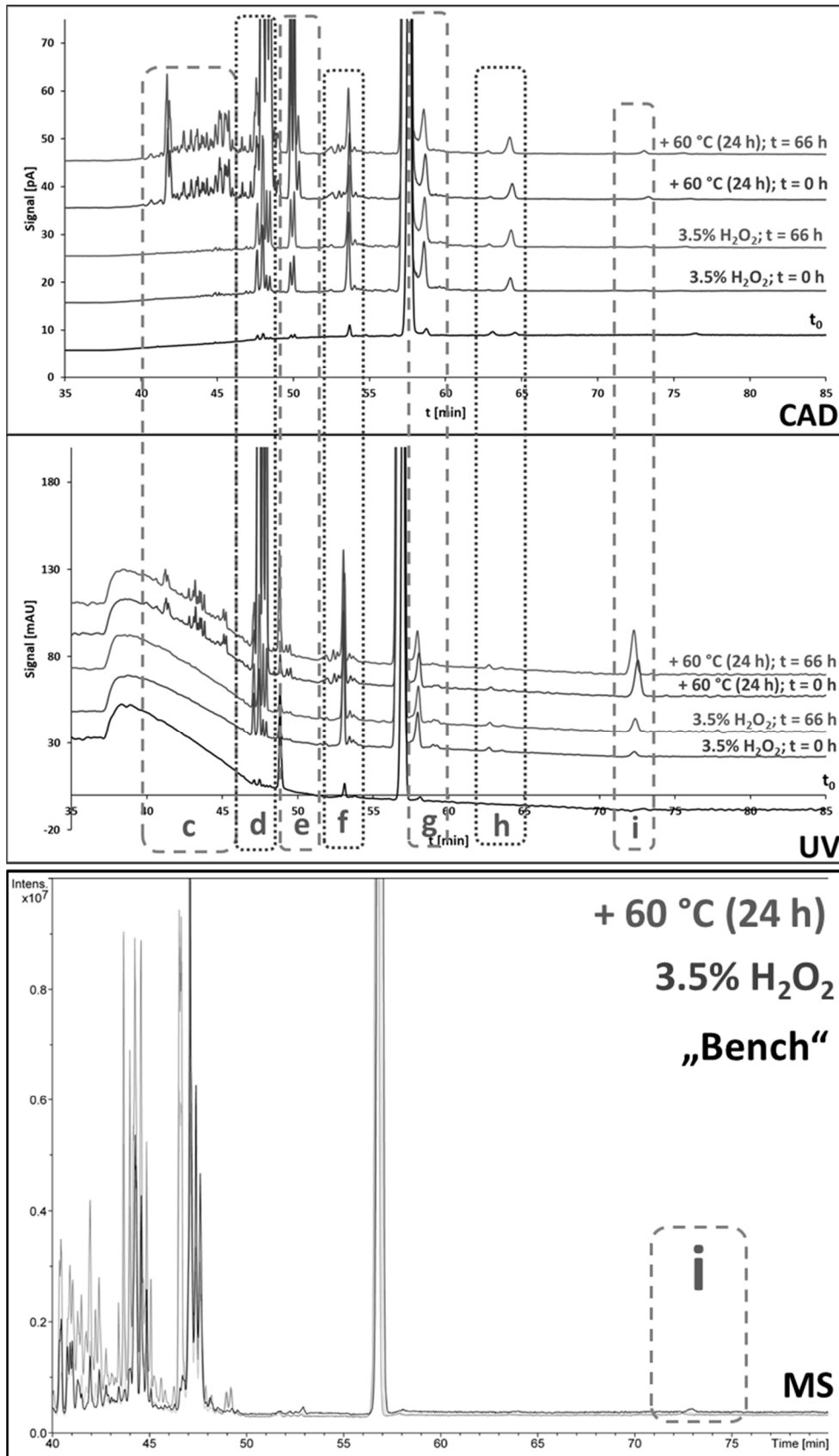


Abb. 4-66: Ausgewählte Bereiche der Chromatogramme zur Bestimmung der Abbauprodukte der Linolsäure. Injektionsvolumen für UV/CAD 10 µl, Injektionsvolumen für LC-MS 1 µl. Retentionsbereich 35 - 85 min.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Peak in Bereich i ist auch am auffälligsten, da er am deutlichsten in der UV-Detektion sichtbar ist (**Abb. 4-66 i**). Demzufolge müsste es sich um ein Abbauprodukt handeln, das einerseits semi-flüchtig ist und andererseits ein besseres chromophores Strukturmerkmal als die Carbonsäurefunktion besitzt. Zwei mögliche Spaltprodukte (β -Spaltung) der Linolsäure kämen hierfür potentiell in Frage. Diese sind in **Abb. 4-67** gezeigt. Beide besitzen ein System aus konjugierten Doppelbindungen, was das Absorptionsmaximum erheblich senken kann. Ob und um welche der beiden Strukturen es sich jedoch handelt, kann ohne entsprechende Referenzen nicht klar gesagt werden, zudem handelt es sich auch hier nur um Vermutungen, die auf den möglichen bekannten Abbauvorgängen der Linolsäure basieren [164-168, 171].

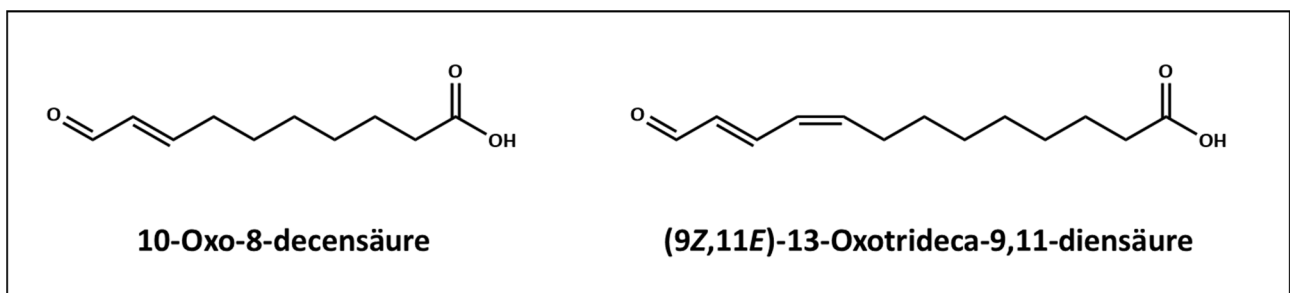


Abb. 4-67: Strukturformeln möglicher Abbauprodukte von Linolsäure.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Methode YMC_D003_final geeignet scheint, die verschiedenen Abbauprodukte von den entsprechenden ungesättigten FA abzutrennen. Auch scheinen ähnliche Abbauprodukte in ähnliche Retentionsbereiche zu fallen, sodass in gewissem Maße Aussagen getroffen werden können, um welche Arten von Abbauprodukten es sich handeln könnte. Damit bietet sie einen Vorteil gegenüber der Peroxidzahl, die nur Auskunft über die enthaltene Menge an reaktivem Sauerstoff liefert, nicht aber beispielsweise zu den Produkten der Russell-Eliminierung (Alkohole, Ketone). Eine kürzere Methode, wie beispielsweise ein isokratischer Lauf mit dem zur Elution der FA notwendigen Anteil Organik (85 % B) wäre nur bedingt sinnvoll, da sich bei der Linolsäure zeigte, dass auch deutlich hydrophilere Abbauprodukte entstehen können (**Abb. 4-65; a und b**). Diese würden, in einem isokratischen Lauf bei diesen Bedingungen höchstwahrscheinlich zusammen mit dem Injektionspeak eluieren. Auch ist zu beachten, dass die verschiedenen Abbauprodukte mit den verschiedenen Detektoren unterschiedlich gut detektiert wurden. Hier scheint eine reine Detektion mittels CAD als nicht ausreichend, weswegen zumindest eine vorweggeschaltete UV-Detektion ratsam ist.

Außerdem muss angemerkt werden, dass alle Zuordnungen allein auf den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen und den in der Literatur beschriebenen zu erwartenden Abbauprodukte basieren, jedoch keine Bestimmungen mittels Referenzsubstanzen erfolgte, um diese vollständig zu verifizieren.

5

Zusammenfassung

5. Zusammenfassung

Der Gruppe der Macrogole sowie den darauf basierenden Abkömmlingen, den Macrogolfettalkoholethern, Macrogolfettsäureestern und Polysorbaten, kommt in der modernen Galenik eine wichtige Rolle zu. Dienten sie vormals nur als gewöhnliche Emulgatoren, so finden sie heutzutage vor allem im Bereich der gezielten Wirkstofffreisetzung, der Erhöhung der Bioverfügbarkeit sowie als Löslichkeitsvermittler komplexer Systeme Anwendung. Diese vielschichtigen Anwendungsgebiete erfordern, auch aufgrund der polydispersen Strukturen der Macrogole, eine reproduzierbare und aussagekräftige Analytik.

Das Europäische Arzneibuch (*Ph. Eur.*) bietet zur Charakterisierung der Hilfsstoffe eine Handvoll Messgrößen, die sog. Fettkennzahlen, die eine Größenordnung vorhandener funktioneller Gruppen liefern. Zu diesen gehören Werte wie Hydroxylzahl, Iodzahl, Peroxidzahl oder Säurezahl. Diese bieten zwar einen Überblick über den Größenbereich der mittleren Kettenlängen oder einen möglichen Abbau der Strukturen, beispielsweise durch Autoxidation, jedoch geben sie keine Auskunft über die Polymerverteilung. Insbesondere diese kann jedoch, je nach Herstellungsweise, stark variieren. Außerdem ist die Methodik der Fettkennzahlenbestimmungen aufgrund der strikten Reaktionsabläufe und zahlreicher Reaktionsschritte einerseits sehr zeitaufwändig und andererseits anfällig für Fehler.

Die HPLC hat, insbesondere aufgrund der Automation, bereits seit Jahren den Status des Goldstandards in der pharmazeutischen Analytik inne. Gekoppelt mit der UV-Detektion bietet sie für zahlreiche Wirkstoffe die Möglichkeit zur schnellen, einfachen und robusten Analyse. Im Bereich der Hilfsstoffe verbreitet sich die HPLC-Analytik langsamer, da viele Hilfsstoffe keinen Chromophor aufweisen. Eine Anwendung der hochsensitiven Massenspektrometrie wäre zwar zur Detektion geeignet, würde sich für die Routineanwendung jedoch als zu komplex und kostenintensiv gestalten. Doch mit der Entwicklung der Aerosol-basierten Detektoren wie dem ELSD (*evaporative light scattering detector*), dem CAD (*charged aerosol detector*) und dem NQADTM (*nano quantity aerosol detector*) wurde auch für nicht-chromophore Substanzen ein Einsatz der HPLC möglich.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Entwicklung einer HPLC-CAD-Methode, die eine möglichst große Bandbreite der Macrogole und der darauf basierenden Hilfsstoffe erfassen kann. Die Trennung erfolgte an einer C₁₈-Trennsäule. Es wurde eine Gradienten-Methode entwickelt, die aus mehreren linearen Gradientenstufen zusammengesetzt wurde, um verschiedene Kettenlängen der Polymere besser voneinander zu trennen. Als mobile Phasen dienten Wasser und Acetonitril, denen jeweils 0.1 % Ameisensäure zugesetzt wurden.

Es konnten Macrogole im Bereich PEG 300 bis PEG 3000 mit akzeptabler Auflösung aufgetrennt werden. Diese Ergebnisse wurden für PEG 300 – 1500 mittels Massenspektrometrie verifiziert. Es konnten fünf gesättigte und zwei ungesättigte Fettsäuren, sowie zwei Fettalkohole verschiedener Kettenlängen

ZUSAMMENFASSUNG

voneinander getrennt werden. Es wurden 13 Macrogol-basierte Hilfsstoffe mit der entwickelten Methode untersucht und erfolgreich getrennt. Die Macrogolfettalkoholether, -stearate und Polysorbate wurden insoweit aufgetrennt, dass die Polymerverteilung beobachtet werden konnte.

Freie PEGs in den Hilfsstoffen wurden getrennt und identifiziert. Anhand dieser konnten unterschiedliche Herstellungsweisen zugeordnet werden. Abhängig von der mittleren Kettenlänge der verarbeiteten PEGs konnten teilweise die freien Fettsäuren bzw. -alkohole von den Estern bzw. Ethern getrennt und identifiziert werden. Im Bereich der kürzeren mittleren Kettenlängen wurden die freien Fettsäuren und -alkohole von den Estern und Ethern überlagert.

Macrogolglycerolhydroxystearat (Cremophor® RH40) wurde in seine Komponenten aufgetrennt, mit Ausnahme der linearen Monoester, die mit den freien PEGs partiell koeluierten und die Glyceroltriestere, die Größenausschlusseffekte zeigten.

Die Methode wurde für Stabilitätsuntersuchungen der ungesättigten Fettsäuren, Öl- und Linolsäure, eingesetzt. Hierzu wurden diese Säuren in Lösung chemisch (Wasserstoffperoxid) und thermisch (60 °C) gestresst und in bestimmten Zeitabständen analysiert. Es zeigte sich ein zeit- und temperaturabhängiger Abbau. Die teilweise Zuordnung der Abbauprodukte erfolgte durch Bestimmung des m/z mittels Massenspektrometrie. Die Methode war geeignet, um das Ausmaß eines oxidativen Abbaus von der Hauptsubstanz zu trennen und strukturell einzuordnen.

Generell bietet die Methode eine gute Basis, die eine Vielzahl an Substanzgruppen erfassen und charakterisieren kann. Sie bietet eine Ergänzung der Fettkennzahlen, die einen verringerten Arbeitsaufwand mit sich bringt. Für spezifischere Betrachtungen (Langzeitstabilität, verwandte Substanzgruppen) stellt sie einen guten Ausgangspunkt dar.

6

Summary

6. Summary

The class of macrogols and macrogol-based excipients, i.e. macrogol fatty alcohol ethers, macrogol fatty acid esters, and polysorbates, plays an important role in modern galenic formulations. Formerly used as simple emulsifiers, they are nowadays utilized in fields such as targeted drug release to increase bioavailability, and as solubilizers for complex systems. For these multifaceted applications, and regarding the polydisperse structures of the macrogols, a reproducible and significant analytical procedure is required.

For the characterization of excipients, the European Pharmacopoeia (*Ph. Eur.*) provides some compendial protocols which are able to describe the number of functional groups present in the substance. Some examples of these bulk parameters are the hydroxyl value, the iodine value, the peroxide value, or the acid value. Thus, these bulk parameters allow an overview of the average molar weight or possible degradation processes (e.g. autoxidation), but they provide no further information about the polymeric distribution which can heavily depend on the manufacturing process. Furthermore, bulk parameter investigations are very time-consuming and prone to errors due to their stringent reaction processes and numerous reaction steps.

Since several years, the HPLC has been the gold standard of pharmaceutical analytics particularly due to the fact of automation. Coupled to UV detection, it offers the opportunity for a quick, easy, and robust analysis for many drugs. In the field of excipients, the development progress of HPLC-analysis is much slower due to the fact that most excipients lack a UV-chromophore. The application of the highly sensitive mass spectrometry would be eligible for detection but is rather complex and expensive. However, the development of the aerosol-based detectors such as the ELSD (evaporative light scattering detection), the CAD (charged aerosol detection), and the NQADTM (nano quantity aerosol detection) enables the application of HPLC for analyzing non-chromophoric substances.

This work aimed to develop a generic HPLC-CAD method to analyze a wide range of macrogols and macrogol-based excipients. The separation was performed on a C₁₈-column. A gradient method was developed based upon several linear gradient steps in order to be able to separate the different chain lengths. The mobile phases were water and acetonitrile, respectively, to which 0.1% formic acid was added.

Macrogols in the average size range of PEG 300 to PEG 3000 were separated with acceptable resolution. The separation results were verified by mass spectrometry for PEG 300 - 1500. Five saturated and two non-saturated fatty acids, as well as two fatty alcohols of different chain lengths were successfully separated. 13 macrogol-based excipients were analyzed with the developed method and separated successfully. The macrogol fatty alcohol ethers, macrogol stearates, and polysorbates were separated to sufficient extent to analyze the polymeric distribution.

The free PEGs in the excipients were separated and identified. Based on these free PEGs, different manufacturing processes could be determined. Depending on the average chain lengths of the processed

SUMMARY

PEGs, the free fatty acids or alcohols could be identified and separated from the esters or ethers, respectively. For the smaller average chain lengths, the free fatty acids and alcohols coeluted with the esters and ethers.

Macrogol glycerol hydroxy stearate (Cremophor® RH40) was separated into its components except for the linear monoesters which partially coeluted with the free PEGs, and the glycerol triesters which showed effects of size exclusion.

The developed method was also used for stability tests of the non-saturated fatty acids, i.e. oleic and linoleic acid. Here, the fatty acid solutions were chemically (hydrogen peroxide) and thermally (60 °C) stressed and analyzed after different time spans. A time and temperature dependent degradation was observed. An assignment of some degradation products was performed by determining the m/z values with mass spectrometry. The method proved to be capable of separating the degradation products of the main substance and allows to estimate the dimension of degradational processes and partly identify the structures of the degradational products.

In general, the provided method offers a good basis for analyzing and characterizing a wide field of substance classes. It provides an extension of bulk parameters (e.g. hydroxyl value) with a reduction of analytical effort. It offers a good starting point for more specific observations such as long-term stability or other related substance classes.

7

Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

1. Yu, L.X., *Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control*. Pharm. Res., 2008. 25(4); 781 - 791.
2. Schmidt, P.C., Lang, S., *Pharmazeutische Hilfsstoffe: Eigenschaften, Anwendungen und Handelsprodukte; Kapitel 4. Emulgatoren*. 2013, Eschborn, Germany; GOVI-Verlag.
3. Griffin, W.C., *Classification of Surface-active agents by HLB*. J. Soc. Cosmet. Chem., 1949. 1; 311 - 326.
4. Schmidt, P.C., Lang, S., *Pharmazeutische Hilfsstoffe: Eigenschaften, Anwendungen und Handelsprodukte; Kapitel 4.3.1 Nichtionogene Emulgatoren ohne Ethylenoxid*. 2013, Eschborn, Germany; GOVI-Verlag.
5. Schmidt, P.C., Lang, S., *Pharmazeutische Hilfsstoffe: Eigenschaften, Anwendungen und Handelsprodukte; Kapitel 4.3.2 Nichtionogene Emulgatoren mit Ethylenoxid*. 2013, Eschborn, Germany; GOVI-Verlag.
6. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Macrogols'*. 2017, 01/2017:1444; Strasbourg, France, 2017.
7. Schmidt, P.C., Lang, S., *Pharmazeutische Hilfsstoffe: Eigenschaften, Anwendungen und Handelsprodukte; Kapitel 16.2 Wasserlösliche Suppositoriengrundlagen*. 2013, Eschborn, Germany; GOVI-Verlag.
8. Lippold, B., Förster, H., *Entwicklung, Herstellung und In-vitro-Testung von peroralen Depotarzneiformen mit konstanter Wirkstoffliberation am Beispiel des Theophyllins*. Pharm. Ind, 1982. 44; 735 - 740.
9. Rowe, R.C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. , *Handbook of Pharmaceutical Excipients; Polyethylene Glycol*. 6th Edition ed. 2009, London and Washington D.C.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.
10. Kellaway, I.W., Marriott, C., *Correlations between Physical and Drug Release Characteristics of Polyethylene-Glycol Suppositories*. J. Pharm. Sci., 1975. 64(7); 1162 - 1166.
11. Coppens, K.A., Hall, M.J., Mitchell, S.A., Read, M.D., *Hypromellose, ethylcellulose, and polyethylene oxide use in hot melt extrusion*. Pharm. Technol., 2006. 30(1); 62 - 70.
12. Hammer, H.F., Hammer, J., Gasche, C., *Übersicht-Polyäthylenglykol (Macrogol)-Übersicht über seine Verwendung in der Diagnostik und Therapie gastroenterologischer Erkrankungen*. Wien. Klin. Wochenschr., 2000. 112(2); 53 - 60.

LITERATURVERZEICHNIS

13. Ell, C., Fischbach, W., Bronisch, H.J., Dertinger, S., Layer, P., Runzi, M., Schneider, T., Kachel, G., Gruger, J., Kollinger, M., Nagell, W., Goerg, K.J., Wanitschke, R., Gruss, H.J., *Randomized trial of low-volume PEG solution versus standard PEG + electrolytes for bowel cleansing before colonoscopy*. Am. J. Gastroenterol., 2008. 103(4); 883 - 893.
14. Herbert, M.K., *Störungen der gastrointestinalen Motilität*. Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2011. 48(2); 93 - 98.
15. Gruss, H.J., *Macrogol 3350: Therapie der Wahl bei hartnäckigen Fällen der chronischen Obstipation und Koprostase*. Coloproctology, 1998. 20(4); 161 - 167.
16. Restek, *Restek - Pure Chromatography; Produktübersicht "Wax Type Columns for GC"*. <http://www.restek.com/Landing-Pages/Wax-Type-Columns>. abgerufen am: 18.04.2018.
17. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.4.22. Composition of fatty acids by Gas Chromatography'*. 2016, 07/2016:20422; Strasbourg, France, 2016.
18. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, General information 'Lauryl alcohol'*. 2017, 1119900; Strasbourg, France, 2017.
19. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Cetyl alcohol'*. 2008, 01/2008:0540; Strasbourg, France, 2008.
20. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Cetyl stearyl alcohol'*. 2008, 01/2008:0702; Strasbourg, France, 2008.
21. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Oleyl alcohol'*. 2011, 04/2011:2073; Strasbourg, France, 2011.
22. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, General information 'Lauric acid'*. 2017, 1143100; Strasbourg, France, 2017.
23. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, General information 'Myristic acid'*. 2017, 1143700; Strasbourg, France, 2017.
24. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Palmitic acid'*. 2008, 01/2008:1904; Strasbourg, France, 2008.
25. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Stearic acid'*. 2015, 04/2015:1474; Strasbourg, France, 2015.

LITERATURVERZEICHNIS

26. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Macrogol stearate'*. 2017, 01/2017:1234; Strasbourg, France, 2017.
27. Schmidt, P.C., Lang, S., *Pharmazeutische Hilfsstoffe: Eigenschaften, Anwendungen und Handelsprodukte; Kapitel 15.1 Wasserunlösliche Schmiermittel*. 2013, Eschborn, Germany; GOVI-Verlag.
28. Zhang, Q., Yie, G., Li, Y., Yang, Q., Nagai, T., *Studies on the cyclosporin A loaded stearic acid nanoparticles*. *Int. J. Pharm.*, 2000. 200(2); 153 - 159.
29. Mittal, A.S., U. V. S., Ali, A.; Aquil, M., *Status of Fatty Acids as Skin Penetration Enhancers-A Review*. *Curr. Drug Del.*, 2009. 6(3); 274 - 279.
30. Neisingh, S.E., Sam, A.P., de Nijs, H., *A Dissolution Method for Hard and Soft Gelatin Capsules Containing Testosterone Undecanoate in Oleic Acid*. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2008. 12(5); 651 - 663.
31. Schwarz, C., Mehnert, W., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II. Drug incorporation and physicochemical characterization*. *J. Microencapsul.*, 1999. 16(2); 205 - 513.
32. Fetih, G.I., M. A.; Ahim, M. A., *Design and Characterization of Transdermal films containing Ketorolac tromethamine*. *International Journal of Pharmaceutical Technologie and Research*, 2011. 3(1); 449 - 458.
33. GESTIS-Stoffdatenbank, *1-Dodecanol*. abgerufen am 17.04.2018.
34. PubChem, *Lauryl alcohol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8193>. abgerufen am 17.04.2018.
35. GESTIS-Stoffdatenbank, *1-Hexadecanol*. abgerufen am 17.04.2018.
36. PubChem, *Cetyl alcohol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2682>. abgerufen am 17.04.2018.
37. GESTIS-Stoffdatenbank, *1-Octadecanol*. abgerufen am 17.04.2018.
38. PubChem, *Stearyl alcohol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8221>. abgerufen am 17.04.2018.
39. PubChem, *Oleyl alcohol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284499>. abgerufen am 17.04.2018.

LITERATURVERZEICHNIS

40. GESTIS-Stoffdatenbank, *cis-9-Octadecen-1-ol*. abgerufen am 17.04.2018.
41. GESTIS-Stoffdatenbank, *Capronsäure*. abgerufen am 17.04.2018.
42. PubChem, *Caproic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8892>. abgerufen am 17.04.2018.
43. PubChem, *Octanoic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/379>. abgerufen am 17.04.2018.
44. GESTIS-Stoffdatenbank, *Octansäure*. abgerufen am 17.04.2018.
45. Cappa, C.D., Lovejoy, E. R., Ravishankara, A. R., *Evaporation rates and vapor pressures of the even-numbered C8-C18 monocarboxylic acids*. J. Phys. Chem. A, 2008. 112(17); 3959 - 3964.
46. GESTIS-Stoffdatenbank, *Decansäure*. abgerufen am 17.04.2018.
47. PubChem, *Capric acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2969>. abgerufen am 17.04.2018.
48. GESTIS-Stoffdatenbank, *Laurinsäure*. abgerufen am 17.04.2018.
49. PubChem, *Lauric acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3893>. abgerufen am 17.04.2018.
50. GESTIS-Stoffdatenbank, *Myristinsäure*. abgerufen am 17.04.2018.
51. PubChem, *Myristic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11005>. abgerufen am 17.04.2018.
52. PubChem, *Palmitic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/985>. abgerufen am 17.04.2018.
53. GESTIS-Stoffdatenbank, *Palmitinsäure*. abgerufen am 17.04.2018.
54. PubChem, *Heptadecanoic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10465>. abgerufen am 17.04.2018.
55. Sigma-aldrich, *Sicherheitsdatenblatt* zu *Heptadecansäure*.
<https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&pro>

LITERATURVERZEICHNIS

[ductNumber=H3500&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Fterm%3D506-12-7%26interface%3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode%3Dpartialmaxfocus%3Dproduct%26lang%3Dde%26region%3DDE%26focus%3Dproduct%26clid%3DEAlalQobChMIuPr3pbbB2glVy7vtCh0BAAjnEAAAYASAAEgJjo_D_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/2Fcatalog/2Fsearch/3Fterm/3D506-12-7%26interface/3DCAS%2520No.%26N%3D0%26mode/3Dpartialmaxfocus/3Dproduct%26lang%3Dde%26region/3DDE%26focus/3Dproduct%26clid/3DEAlalQobChMIuPr3pbbB2glVy7vtCh0BAAjnEAAAYASAAEgJjo_D_BwE), 2018. abgerufen am 17.04.2018.

56. ChemSpider, *Struktursuche "Margaric acid"*. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10033.html>. abgerufen am 17.04.2018.
57. GESTIS-Stoffdatenbank, *Stearinsäure*. abgerufen am 17.04.2018.
58. PubChem, *Stearic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281>. abgerufen am 17.04.2018.
59. GESTIS-Stoffdatenbank, *Ölsäure*. abgerufen am 17.04.2018.
60. PubChem, *Oleic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445639>. abgerufen am 17.04.2018.
61. PubChem, *Linoleic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280450>. abgerufen am 17.04.2018.
62. GESTIS-Stoffdatenbank, *Linolsäure*. abgerufen am 17.04.2018.
63. Rowe, R.C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. , *Handbook of Pharmaceutical Excipients; Polyoxyethylene Alkyl Ethers*. 6th Edition ed. 2009, London and Washington D.C.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.
64. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Macrogol lauryl ether'*. 2008, 01/2008:1124; Strasbourg, France, 2008.
65. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Macrogol stearyl ether'*. 2008, 01/2008:1340; Strasbourg, France, 2008.
66. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Macrogol oleyl ether'*. 2008, 01/2008:1125; Strasbourg, France, 2008.
67. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Macrogol cetostearyl ether'*. 2008, 01/2008:1123; Strasbourg, France, 2008.
68. Elworthy, P.H.P., M. S., *Demonstration of maximum solubilization in a polyoxyethylene alkyl ether series of non-ionic surfactants*. J. Pharm. Pharmacol., 1982. 34(9); 543 - 546.

LITERATURVERZEICHNIS

69. Abdel-Rahman, A., Aboutaleb, A., Samy, E., *Factors affecting chlordiazepoxide solubilization by non-ionic surfactants*. Bull. Pharm. Sci. Assiut Univ, 1991. 14; 35 - 45.
70. Mueller-Goymann, C., Usselman, B., *Solubilization of cholesterol in liquid crystals of aqueous systems of polyoxyethylene cetyl ethers*. Acta Pharm. Jugosl., 1988. 38(4); 327 - 329.
71. Usselman, B., Mueller-Goymann, C.C., *Struktureller Aufbau von Cholesterol-Polyoxyäthylfettalkoholäther-Wasser-Mischungen* Prog. Colloid Polym. Sci., 1984. 69; 56 - 63.
72. Al Gohary, O., Foda, N., *Pharmaceutical and microbiological aspects of nalidixic acid suppositories*. Egyptian journal of pharmaceutical sciences, 1996. 37(1-6); 273 - 284.
73. Onyeji, C.O., Adebayo, A.S., Babalola, C.P., *Effects of absorption enhancers in chloroquine suppository formulations: I. In vitro release characteristics*. Eur. J. Pharm. Sci., 1999. 9(2); 131 - 136.
74. Troester, S.D.M., U.; Kreuter, J., *Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants*. Int. J. Pharm., 1990. 61(85 - 100).
75. Drugbase, *Datenbankrecherche "Polidocanol"*. http://www.drugbase.de/de/datenbanken/hagers-enzyklopaedie/artikel.html?tx_crondavdbhager_pi%5Buid%5D=78508&cHash=615f3bfe29e240fc151a72984cbc822c. abgerufen am 26.04.2018.
76. Rowe, R.C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. , *Handbook of Pharmaceutical Excipients; Polyoxyethylene Stearates*. 6th Edition ed. 2009, London and Washington D.C.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.
77. Abd El-Bary, A., Foda, N., Tayel, S., *Bioavailability of glibenclamide from nasal delivery systems*. Pharmazeutische Industrie, 1991. 53(12); 1151 - 1155.
78. Cohn, I., Singleton, W.S., Hartwig, Q.L., Atik, M., *New intravenous fat emulsion*. JAMA, 1963. 183(9); 755 - 757.
79. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Macrogolglycerol Hydroxystearate'*. 2017, 01/2017:1083; Strasbourg, France, 2017.
80. Strickley, R.G., *Solubilizing excipients in oral and injectable formulations*. Pharm. Res., 2004. 21(2); 201 - 230.
81. Rowe, R.C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. , *Handbook of Pharmaceutical Excipients; Polyoxyethylene Castor Oil Derivatives*. 6th Edition ed. 2009, London and Washington D.C.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.

LITERATURVERZEICHNIS

82. Yi, T., Wan, J., Xu, H., Yang, X., *A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water soluble drugs*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2008. 70(2); 439 - 444.
83. Spornath, A., Aserin, A., Garti, N., *Fully dilutable microemulsions embedded with phospholipids and stabilized by short-chain organic acids and polyols*. J. Colloid Interface Sci., 2006. 299(2); 900 - 909.
84. Ueda, K., Yamazaki, Y., Noto, H., Teshima, Y., Yamashita, C., Sakaeda, T., Iwakawa, S., *Effect of oxyethylene moieties in hydrogenated castor oil on the pharmacokinetics of menatetrenone incorporated in O/W lipid emulsions prepared with hydrogenated castor oil and soybean oil in rats*. J. Drug Target., 2003. 11(1); 37 - 43.
85. Rowe, R.C., Sheskey, P. J., Quinn, M. E. , *Handbook of Pharmaceutical Excipients; Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters*. 6th Edition ed. 2009, London and Washington D.C.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.
86. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Polysorbate 20'*. 2017, 01/2017:0426; Strasbourg, France, 2017.
87. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Polysorbate 80'*. 2017, 01/2017:0428; Strasbourg, France, 2017.
88. Akers, M.J., *Excipient-drug interactions in parenteral formulations*. J. Pharm. Sci., 2002. 91(11); 2283 - 2300.
89. Loos, W.J., Baker, S.D., Verweij, J., Boonstra, J.G., Sparreboom, A., *Clinical pharmacokinetics of unbound docetaxel: role of polysorbate 80 and serum proteins*. Clin. Pharmacol. Ther., 2003. 74(4); 364-71.
90. Baker, S.D., Zhao, M., He, P., Carducci, M.A., Verweij, J., Sparreboom, A., *Simultaneous analysis of docetaxel and the formulation vehicle polysorbate 80 in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Anal. Biochem., 2004. 324(2); 276-284.
91. Shahi, V., Zatz, J.L., *Effect of Formulation Factors on Penetration of Hydrocortisone through Mouse Skin*. J. Pharm. Sci., 1978. 67(6); 789 - 792.
92. Zhang, H.J., Yao, M., Morrison, R.A., Chong, S.H., *Commonly used surfactant, tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats*. Arch. Pharm. Res., 2003. 26(9); 768 - 772.
93. Nerurkar, M.M., Burton, P.S., Borchardt, R.T., *The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system*. Pharm. Res., 1996. 13(4); 528 - 534.

LITERATURVERZEICHNIS

94. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.5.3 Hydroxyl value'*. 2008, 01/2008:20503; Strasbourg, France, 2008.
95. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Saw Palmetto Fruit'*. 2012, 07/2012:1848; Strasbourg, France, 2012.
96. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Monograph 'Oleic acid'*. 2008, 01/2008:0799; Strasbourg, France, 2008.
97. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, General information 'Linoleic acid'*. 2017, 1143200; Strasbourg, France, 2017.
98. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.5.1 Acid value'*. 2008, 01/2008:20501; Strasbourg, France, 2008.
99. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.5.6 Saponification value'*. 2008, 01/2008:20506; Strasbourg, France, 2008.
100. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.5.2 Ester value'*. 2008, 01/2008:20502; Strasbourg, France, 2008.
101. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.5.7 Unsaponifiable matter'*. 2008, 01/2008:20507; Strasbourg, France, 2008.
102. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.5.4 Iodine value'*. 2008, 01/2008:20504; Strasbourg, France, 2008.
103. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.5.5 Peroxide value'*. 2016, 01/2016:20505; Strasbourg, France, 2016.
104. EDQM, *European Pharmacopoeia 9.4, Chapter '2.4.25 Ethylene Oxide and Dioxan'*. 2015, 04/2015:20425; Strasbourg, France, 2015.
105. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Kapitel 20 Hochleistungsflüssigchromatographie*. 4 ed. 2008, Stuttgart; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
106. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Kapitel 18.2.2 Kenngrößen zur Beschreibung von Peakform und Trennqualität*. 4 ed. 2008, Stuttgart; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

LITERATURVERZEICHNIS

107. Niessner, R., Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R., *Instrumentelle Analytik; Kapitel 26 Einführung in chromatographische Trennmethoden*. Vol. 6. 2013, Berlin Heidelberg; Springer Spektrum.
108. Ettre, L.S., *Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993)*. Pure Appl. Chem., 1993. 65(4); 819 - 872.
109. Gritti, F., Guiochon, G., *Mass transfer kinetics, band broadening and column efficiency*. J. Chromatogr. A, 2012. 1221; 2 - 40.
110. Snyder, L.R.K., J. J.; Dolan, J. W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Chapter 5 The Column*. 3rd ed. 2010; John Wiley & Sons. Inc.
111. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Kapitel 20.2.7 Detektoren*. 4 ed. 2008, Stuttgart; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
112. Niessner, R., Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., *Instrumentelle Analytik, Kapitel 28.3.6 Detektoren*. Vol. 6. 2013.
113. Snyder, L.R.K., J. J.; Dolan, J. W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Chapter 4 Detection*. 3rd ed. 2010; John Wiley & Sons. Inc.
114. Gamache, P.H., *Charged aerosol detection for liquid chromatography and related separation techniques; Chaper 1: Principles of Charged Aerosol Detection*. 1 ed. 2017, Hoboken, NJ, USA; John Wiley & Sons, Inc; 544.
115. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G., *Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Kapitel 11.1.1 Chromophores System, Elektronenübergänge*. 4 ed. 2008, Stuttgart; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
116. Snyder, L.R.K., J. J.; Dolan, J. W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Appendix: Miscellaneous Solvent Properties*. 3rd ed. 2010; John Wiley & Sons. Inc.
117. Wikipedia, *Poise*. <https://de.wikipedia.org/wiki/Poise>. abgerufen am 25.04.2018.
118. *Das HPLC-MS-Buch für Anwender*, ed. S. Kromidas. 2017, Weinheim, Deutschland; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KAA. A.
119. Kohler, M., Haerdi, W., Christen, P., Veuthey, J.L., *The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis*. Trac-Trend Anal Chem, 1997. 16(8); 475 - 484.

LITERATURVERZEICHNIS

120. Cintron, J.M., Risley, D.S., *Hydrophilic interaction chromatography with aerosol-based detectors (ELSD, CAD, NQAD) for polar compounds lacking a UV chromophore in an intravenous formulation*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2013. 78-79; 14 - 18.
121. Almeling, S., Holzgrabe, U., *Use of evaporative light scattering detection for the quality control of drug substances: influence of different liquid chromatographic and evaporative light scattering detector parameters on the appearance of spike peaks*. J. Chromatogr. A, 2010. 1217(14); 2163 - 2170.
122. Dixon, R.W., Peterson, D. S., *Development and testing of a detection method for liquid chromatography based on aerosol charging*. Anal. Chem., 2002. 74(13); 2930 - 2937.
123. Ilko, D., Braun, A., Germershaus, O., Meinel, L., Holzgrabe, U., *Fatty acid composition analysis in polysorbate 80 with high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detection*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2015. 94; 569 - 574.
124. Braun, A.C., Ilko, D., Merget, B., Gieseler, H., Germershaus, O., Holzgrabe, U., Meinel, L., *Predicting critical micelle concentration and micelle molecular weight of polysorbate 80 using compendial methods*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2015. 94; 559 - 568.
125. Christiansen, A., Backensfeld, T., Kuhn, S., Weitschies, W., *Stability of the non-ionic surfactant polysorbate 80 investigated by HPLC-MS and charged aerosol detector*. Pharmazie, 2011. 66(9); 666 - 671.
126. Li, Y., Hewitt, D., Lentz, Y.K., Ji, J.A., Zhang, T.Y., Zhang, K., *Characterization and stability study of polysorbate 20 in therapeutic monoclonal antibody formulation by multidimensional ultrahigh-performance liquid chromatography-charged aerosol detection-mass spectrometry*. Anal. Chem., 2014. 86(10); 5150 - 5157.
127. Lippold, S., Koshari, S.H.S., Kopf, R., Schuller, R., Buckel, T., Zarraga, I.E., Koehn, H., *Impact of mono- and poly-ester fractions on polysorbate quantitation using mixed-mode HPLC-CAD/ELSD and the fluorescence micelle assay*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2017. 132; 24 - 34.
128. Nair, L.M., Stephens, N.V., Vincent, S., Raghavan, N., Sand, P.J., *Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection*. J. Chromatogr. A, 2003. 1012(1); 81 - 86.
129. Fekete, S., Ganzler, Katalin, Fekete, Jenő, *Simultaneous determination of polysorbate 20 and unbound polyethylene-glycol in protein solutions using new core-shell reversed phase column and condensation nucleation light scattering detection*. J. Chromatogr. A, 2010. 1217(40); 6258 - 6266.
130. Takahashi, K., Kinugasa, S., Senda, M., Kimizuka, K., Fukushima, K., Matsumoto, T., Shibata, Y., Christensen, J., *Quantitative comparison of a corona-charged aerosol detector and an evaporative*

LITERATURVERZEICHNIS

light-scattering detector for the analysis of a synthetic polymer by supercritical fluid chromatography. J. Chromatogr. A, 2008. 1193(1-2); 151 - 155.

131. Kou, D., Manius, G., Zhan, S., Chokshi, H.P., *Size exclusion chromatography with Corona charged aerosol detector for the analysis of polyethylene glycol polymer.* J. Chromatogr. A, 2009. 1216(28); 5424 - 5428.
132. Smith, M.C., Crist, R.M., Clogston, J.D., McNeil, S.E., *Quantitative analysis of PEG-functionalized colloidal gold nanoparticles using charged aerosol detection.* Anal. Bioanal. Chem., 2015. 407(13); 3705 - 3716.
133. Ilko, D., Puhl, S., Meinel, L., Germershaus, O., Holzgrabe, U., *Simple and rapid high performance liquid chromatography method for the determination of polidocanol as bulk product and in pharmaceutical polymer matrices using charged aerosol detection.* J. Pharm. Biomed. Anal., 2015. 104; 17 - 20.
134. Puhl, S., Ilko, D., Li, L., Holzgrabe, U., Meinel, L., Germershaus, O., *Protein release from electrospun nonwovens: improving the release characteristics through rational combination of polyester blend matrices with polidocanol.* Int. J. Pharm., 2014. 477(1-2); 273 - 81.
135. Lie, A., Meyer, A.S., Pedersen, L.H., *Appearance and distribution of regioisomers in metallo- and serine-protease-catalysed acylation of sucrose in N,N-dimethylformamide.* J. Mol. Catal. B: Enzym., 2014. 106; 26 - 31.
136. Rather, M.Y., Ara, K.Z.G., Nordberg Karlsson, E., Adlercreutz, P., *Characterization of cyclodextrin glycosyltransferases (CGTases) and their application for synthesis of alkyl glycosides with oligomeric head group.* Process Biochem., 2015. 50(5); 722 - 728.
137. Greiderer, A., Steeneken, L., Aalbers, T., Vivo-Truyols, G., Schoenmakers, P., *Characterization of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) using comprehensive two-dimensional liquid chromatography.* J. Chromatogr. A, 2011. 1218(34); 5787 - 5793.
138. Lie, A., Wimmer, R., Pedersen, L.H., *Design of experiments and multivariate analysis for evaluation of reversed-phase high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection of sucrose caprate regioisomers.* J. Chromatogr. A, 2013. 1281; 67 - 72.
139. Moreau, R.A., *The analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector.* Lipids, 2006. 41(7); 727 - 734.
140. Pedersen, A.T., Nordblad, M., Nielsen, P.M., Woodley, J.M., *Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation.* J. Mol. Catal. B: Enzym., 2014. 105; 89 - 94.
141. Plante, M., Crafts, C., Bailey, B., Acworth, I., *Characterization of Castor Oil by HPLC and Charged Aerosol Detection.* 2011.

LITERATURVERZEICHNIS

142. Lu, F., Bruheim, I., Haugsgjerd, B., Jacobsen, C., *Effect of temperature towards lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions in krill oil upon storage*. Food Chem., 2014. 157; 398 - 3407.
143. Plante, M., Bailey, B., Acworth, I. , *The use of charged aerosol detection with HPLC for the measurement of lipids*, ed. Lipidomics. 2009; Humana Press.
144. Moreau, R.A., *Lipid analysis via HPLC with a charged aerosol detector*. Lipid Technology, 2009. 21(8-9); 191 - 194.
145. Nair, L.M., Werling, J.O., *Aerosol based detectors for the investigation of phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical suspension formulation*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2009. 49(1); 95 - 99.
146. Amidon, G.L.L., H.; Shah, V. P.; Crison, J. R., *A Theoretical Basis for a Biopharmaceutical Drug Classification*. Pharm. Res., 1995. 12(3); 413 - 420.
147. Rösler, A., Vandermeulen, G.W.M., Klok, H.-A., *Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers*. Adv. Drug Del. Rev., 2012. 64; 270 - 279.
148. Veronese, F.M., Pasut, G., *PEGylation, successful approach to drug delivery*. Drug Discovery Today, 2005. 10(21); 1451 - 1458.
149. Greenwald, R.B., Choe, Y.H., McGuire, J., Conover, C.D., *Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. 55(2); 217 - 250.
150. Roberts, M.J., Bentley, M.D., Harris, J.M., *Chemistry for peptide and protein PEGylation*. Adv. Drug Del. Rev., 2012. 64; 116 - 127.
151. Turecek, P.L., Bossard, M.J., Schoetens, F., Ivens, I.A., *PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs*. J. Pharm. Sci., 2016. 105(2); 460 - 475.
152. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2010. 49(36); 6288 - 6308.
153. Hutchinson, J.P., Li, J., Farrell, W., Groeber, E., Szucs, R., Dicoski, G., Haddad, P.R., *Comparison of the response of four aerosol detectors used with ultra high pressure liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 2011. 1218(12); 1646 - 1655.
154. Vervoort, N., Daemen, D., Torok, G., *Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 2008. 1189(1-2); 92 - 100.

LITERATURVERZEICHNIS

155. Almeling, S., Ilko, D., Holzgrabe, U., *Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2012. 69; 50 - 63.
156. Brinz, D., Holzgrabe, U., *Analysis of the molecular size distribution of polyethylene glycols by CE-UV versus HPLC with evaporative light scattering detection*. Electrophoresis, 2008. 29(17); 3605 - 3611.
157. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2nd ed. 1979; John Wiley & Sons. Inc.
158. Engelhardt, H., Jungheim, M., *Comparison and Characterization of Reversed Phases*. Chromatographia, 1990. 29(1-2); 59-68.
159. Dehouck, P.V., D; Kovács, Z; Noszál, B; Adams, Erwin; Hoogmartens, Jos, *Uncertainty related to the use of relative retention times in pharmaceutical analysis*. LC GC europe, 2003. 16(11).
160. Hazotte, A., Libong, D., Matoga, M., Chaminade, P., *Comparison of universal detectors for high-temperature micro liquid chromatography*. J. Chromatogr. A, 2007. 1170(1-2); 52 - 61.
161. Mitchell, C.R., Bao, Y., Benz, N. J., Zhang, S., *Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes*. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2009. 877(32); 4133 - 4139.
162. PubChem-Database, *Eintrag zur Substanz: Margarinsäure*. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/heptadecanoic_acid#section=Top, 2018. abgerufen am 10.07.2018.
163. PubChem-Database, *Eintrag zur Substanz: Palmitinsäure*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/985#section=Top>, 2018. abgerufen am: 10.07.2018.
164. Gunstone, F.D., *Reaction of Oxygen and Unsaturated Fatty-Acids*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1984. 61(2); 441 - 447.
165. Köckritz, A., Martin, A., *Oxidation of unsaturated fatty acid derivatives and vegetable oils*. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2008. 110(9); 812 - 824.
166. Gardner, H.W., *Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids*. Free Radic. Biol. Med., 1989. 7(1); 65 - 86.
167. Holman, R.T., Elmer, O.C., *The Rates of Oxidation of Unsaturated Fatty Acids and Esters*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1947. 24(4); 127 - 129.

LITERATURVERZEICHNIS

168. Porter, N.A., Wujek, J.S., *Allylic Hydroperoxide Rearrangement - Beta-Scission or Concerted Pathway*. J. Org. Chem., 1987. 52(23); 5085 - 5089.
169. Turnwald, S.E., Lorier, M.A., Wright, L.J., Mucalo, M.R., *Oleic acid oxidation using hydrogen peroxide in conjunction with transition metal catalysis*. J. Mater. Sci. Lett., 1998. 17(15); 1305 - 1307.
170. Allen, R.R., Kiess, A.A., *Isomerization During Hydrogenation. I. Oleic acid*. J. Am. Oil Chem. Soc., 1955. 32; 400 - 405.
171. Voss, L.F., Bazerbashi, M.F., Beekman, C.P., Hadad, C.M., Allen, H.C., *Oxidation of oleic acid at air/liquid interfaces*. Journal of Geophysical Research, 2007. 112(D6).
172. King, M.D., Rennie, A.R., Thompson, K.C., Fisher, F.N., Dong, C.C., Thomas, R.K., Pfrang, C., Hughes, A.V., *Oxidation of oleic acid at the air–water interface and its potential effects on cloud critical supersaturations*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2009. 11(35); 7699 - 7707.

8

Anhang

8. Anhang

8.1. Publikationsverzeichnis

C. Theiss, U. Holzgrabe, Characterization of polydisperse macrogols and macrogol-based excipients via HPLC and charged aerosol detection, J. Pharm. Biomed. Anal., 160 (2018) 212 – 221, DOI: 10.1016/j.jpba.2018.07.043.

8.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

8.2.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1:	Übersicht der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Fettalkohole und -säuren.....	7
Tab. 1-2:	Strukturelle Übersicht der betrachteten Fettalkoholether.	10
Tab. 1-3:	Strukturelle Übersicht der betrachteten Fettsäureester.....	11
Tab. 1-4:	Strukturelle Übersicht zu Cremophor® RH40 (ethoxyliertes hydriertes Rizinusöl).....	12
Tab. 1-5:	Strukturelle Übersicht zu den betrachteten Polysorbaten.....	13
Tab. 1-6:	Charakterisierung der betrachteten Hilfsstoffe mittels Fettkennzahlen (nach <i>Ph. Eur.</i> 9.4).	15
Tab. 1-7:	Bedeutung und Bestimmung der Fettkennzahlen.....	16
Tab. 1-8:	Gängige Modifikationen von Kieselgel	19
Tab. 1-9:	Übersicht über die verschiedenen Arten von Detektoren	20
Tab. 1-10:	Übersicht der physikalischen Eigenschaften der wichtigsten HPLC-Lösungsmitteln ..	21
Tab. 4-1:	Ausgangsmethoden nach <i>Brinz</i> und <i>Holzgrabe</i>	70
Tab. 4-2:	Retentionszeiten der FA und FAA unter Verwendung der finalen Methode (YMC_D003_final).	95
Tab. 4-3:	Übersicht zum Einfluss der Säurekonzentration auf verschiedene Messgrößen der Fettsäuren.	98
Tab. 4-4:	Methodenübersicht zur Gruppe der Fettalkoholether.....	115
Tab. 4-5:	Ergebnisse zur Löslichkeit von Myrj® 59.....	123
Tab. 4-6:	Ergebnisse und Zuordnung der Stabilitätsuntersuchungen von Ölsäure.....	139
Tab. 4-7:	Ergebnisse und Zuordnung der Stabilitätsuntersuchungen von Linolsäure.....	142
Tab. 8-1:	Methoden zur Trennung der Macrosole an der Waters XTerra RP-18 Säule unter Verwendung von Wasser (MilliPore®) und MeOH als Lösungsmittel.	183
Tab. 8-2:	Methoden zur Trennung der Macrosole an der Waters XTerra RP-18 Säule unter Verwendung von Wasser (MilliPore®) und ACN als Lösungsmittel.....	186
Tab. 8-3:	Methodenentwicklung an der YMC-Pack Pro C18 Säule unter Verwendung von Wasser (MilliPore®) und ACN als Lösungsmittel. Erste Entwicklungsschritte zur Trennung von PEGs im Bereich 300 – 1000.	188

ANHANG

Tab. 8-4:	Fortsetzung der Methodenentwicklung an der YMC-Pack Pro C18 Säule zur Trennung von Macrogolen höherer Kettenlängen (PEG 1500 – 3000) durch Modifikation der Methode YMC_012.....	193
Tab. 8-5:	Methodenentwicklung des 2. Teils (lipophilen Parts) zur Trennung der Fettsäuren und Fettalkohole. Verwendung der YMC-Pack Pro C18 Säule und verschiedener Lösungsmittel und Lösungsmittelzusätzen.....	197
Tab. 8-6:	Gesamtmethode entwickelt an der YMC-Pack Pro C18 Säule. Abschließende Modifikationen und spezielle Betrachtungen.....	201
Tab. 8-7:	Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden XTerra_MeOH_000 bis XTerra_MeOH_003a.....	204
Tab. 8-8:	Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden XTerra_MeOH_004 bis XTerra_MeOH_010.	205
Tab. 8-9:	Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden XTerra_ACN_000 bis XTerra_ACN_003.....	206
Tab. 8-10:	Berechnete Auflösungen für PEG 600 vermessen mit den Methoden YMC_001 bis YMC_006.....	207
Tab. 8-11:	Berechnete Auflösungen für PEG 1000 vermessen mit den Methoden YMC_007 bis YMC_011.	208
Tab. 8-12:	Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden YMC_010 bis YMC_014.	209
Tab. 8-13:	Berechnete Auflösungen für PEG 3000 vermessen mit den Methoden YMC_012_M001 bis YMC_012_M006.	210
Tab. 8-14:	Berechnete Auflösungen für PEG 3000 vermessen mit den Methoden YMC_012_M002f bis YMC_012_M010f.....	212
Tab. 8-15:	Zusammenfassung der für PEG 300 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse....	214
Tab. 8-16:	Zusammenfassung der für PEG 400 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse....	215
Tab. 8-17:	Zusammenfassung der für PEG 600 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse....	215
Tab. 8-18:	Zusammenfassung der für PEG 1000 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse..	217
Tab. 8-19:	Zusammenfassung der für PEG 1500 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse..	220
Tab. 8-20:	Potentielle Abbauprodukte der Ölsäure.....	225
Tab. 8-21:	Potentielle Abbauprodukte der Linolsäure.....	232

8.2.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Grundstruktur und sterische Ausrichtung der Macrogole.....	3
Abb. 1-2:	Funktionsweise der Ionenfalle.....	24
Abb. 1-3:	Schematischer Aufbau des Corona® Charged Aerosol Detectors	27
Abb. 1-4:	Ergebnisse einer Stichwortsuche nach Publikationsjahr (über ScienceDirect vom 25.04.2018).	28
Abb. 4-1:	Darstellung des Gradienten der finalen Methode (YMC_D003_final) mit der für die Methodenentwicklung relevanter Unterteilung.	69
Abb. 4-2:	Chromatogramme von PEG 300, 400, 600, 1000 und einer Mischung aus PEG 300 und 1000 getrennt mit den beiden Methoden XTerra_MeOH_000 (a + b) und XTerra_ACN_000 (c + d).	70
Abb. 4-3:	Chromatogramme der gemischten Probe „Mix PEG 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden XTerra_MeOH_000 bis XTerra_MeOH_003a.....	72
Abb. 4-4:	Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden XTerra_MeOH_000 bis XTerra_MeOH_003a	72
Abb. 4-5:	Chromatogramme der gemischten Probe „Mix PEG 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden XTerra_MeOH_000 und XTerra_MeOH_004 bis XTerra_MeOH_010.	73
Abb. 4-6:	Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden XTerra_MeOH_004 bis XTerra_MeOH_0010	75
Abb. 4-7:	Chromatogramme der gemischten Probe „Mix 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden XTerra_ACN_000 bis XTerra_ACN_003.....	76
Abb. 4-8:	Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden XTerra_ACN_000 bis XTerra_ACN_003.....	77
Abb. 4-9:	Chromatogramme von PEG 600 zum Vergleich der Methoden YMC_001 bis YMC_006.	78
Abb. 4-10:	Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 600 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_001 bis YMC_006	79
Abb. 4-11:	Chromatogramme von PEG 1000 zum Vergleich der Methoden YMC_007 bis YMC_011.	80

ANHANG

Abb. 4-12:	Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 1000 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_007 bis YMC_011	80
Abb. 4-13:	Chromatogramme für die Probe „Mix 300 + 1000“ zum Vergleich der Methoden YMC_010 bis YMC_014.	81
Abb. 4-14:	Darstellung der berechneten Auflösungen der Probe „Mix 300 + 1000“ zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_010 bis YMC_014	81
Abb. 4-15:	Chromatogramme für PEG 3000 zum Vergleich der Methoden YMC_012_M001 bis YMC_012_M003 zur Bestimmung der optimalen Zielkonzentration an ACN für höhere Oligomere.	82
Abb. 4-16:	Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 3000 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_012_M001 bis YMC_012_M006	83
Abb. 4-17:	Chromatogramme für PEG 3000 zum Vergleich der Methoden YMC_012_M004 (M004) bis YMC_012_M006 (M006) zur Bestimmung der optimalen Steilheit des Gradienten G3.	84
Abb. 4-18:	Chromatogramme für PEG 3000 zum Vergleich der Methoden YMC_012_M002f (M002f) bis YMC_012_M010f (M010f) zur Bestimmung der optimalen Steilheit des Gradienten G3.	84
Abb. 4-19:	Darstellung der berechneten Auflösungen von PEG 3000 zwischen aufeinanderfolgenden Peaks für die Methoden YMC_012_M002f (M002f) bis YMC_012_M010f (M010f)	85
Abb. 4-20:	Darstellung des ersten Teils der finalen Methode (YMC_D003_final) zur Trennung der hydrophilen Komponenten (PEGs) mit allen Subgradienten (G1 – G3) und Subplateaus (P1 – P3).	86
Abb. 4-21:	Chromatogramme der LC/MS-Untersuchungen von PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1000 und PEG 1500. Zuordnung der PEG-Oligomere.	88
Abb. 4-22:	Identifikation von inneren Salzen am Beispiel der Probe von PEG 400	90
Abb. 4-23:	Darstellung des zweiten Teils der finalen Methode (YMC_D003_final) zur Trennung der lipophilen Komponenten (FA und FAA).	91
Abb. 4-24:	Chromatographische Ergebnisse der einzelnen FA und FAA unter isokratischen Bedingungen (85 % ACN; FA_YMC_004).	92
Abb. 4-25:	Chromatogramme der Methode FA_YMC005a	93

ANHANG

Abb. 4-26:	Chromatogramme der Probe „PEG 3000 + C18 FA (Typ I)“ mit (005b) und ohne (005a) Säurezusatz. (a) Gesamtdarstellung (b) Ausschnitt PEG 3000. (c) Ausschnitt FA.	93
Abb. 4-27:	Chromatogramme der gemischten Probe „Mix FA + FAA“ unter Verwendung der gekürzten Methoden (beginnend bei 32.5 % ACN) mit (005d) und ohne (005c) Säurezusatz (AS: Ameisensäure).....	94
Abb. 4-28:	Chromatogramme zum Vergleich der Methoden „005d“ (Gradientendauer 10 min) und „006b“ (Gradientendauer 20 min).....	94
Abb. 4-29:	Chromatogramm mit Originalskalierung von C18 FA (Typ I) mit verschiedenen Konzentrationen an Säurezusatz (YMC_D001 bis YMC_D003).	96
Abb. 4-30:	Chromatogramm mit Originalskalierung von Myrj® 45 mit verschiedenen Konzentrationen an Säurezusatz (YMC_D001 bis YMC_D003).	97
Abb. 4-31:	Vergleich der Methoden	99
Abb. 4-32:	Darstellung des dritten Teils der finalen Methode zur verbesserten Auftrennung der Ether und Ester	100
Abb. 4-33:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® 30.....	101
Abb. 4-34:	Chromatogramme von Brij® 30 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	102
Abb. 4-35:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Thesit®	103
Abb. 4-36:	Chromatogramme von Thesit® zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	104
Abb. 4-37:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® 52.....	105
Abb. 4-38:	Chromatogramme von Brij® 52 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	106
Abb. 4-39:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® C10.....	107
Abb. 4-40:	Chromatogramme von Brij® C10 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	108
Abb. 4-41:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® 72.....	109
Abb. 4-42:	Chromatogramme von Brij® 72 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	110
Abb. 4-43:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® S20.....	111
Abb. 4-44:	Chromatogramme von Brij® S20 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	112

ANHANG

Abb. 4-45:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Brij® O20	113
Abb. 4-46:	Chromatogramme von Brij® O20 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	114
Abb. 4-47:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Myrj® 45.....	116
Abb. 4-48:	Chromatogramme von Myrj® 45 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	117
Abb. 4-49:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Myrj® 52.....	119
Abb. 4-50:	Chromatogramme von Myrj® 52 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	120
Abb. 4-51:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Myrj® 59.....	121
Abb. 4-52:	Chromatogramme von Myrj® 59 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	123
Abb. 4-53:	Chromatogramme zu Myrj® 59 in verschiedenen Lösungsmitteln.	124
Abb. 4-54:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Cremophor® RH40	126
Abb. 4-55:	Chromatogramme von Cremophor® RH40 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.....	127
Abb. 4-56:	Chromatogramme der Methodenmodifikationen zur weiteren Untersuchung von Cremophor® RH40.	128
Abb. 4-57:	Chromatographische Ergebnisse (LC-MS) zu Cremophor® RH40 unter Verwendung der Methode YMC_D003_final.	130
Abb. 4-58:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Tween® 20	131
Abb. 4-59:	Chromatogramme von Tween® 20 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	132
Abb. 4-60:	Chromatogramme der Referenzmessung (R) von Tween® 80	134
Abb. 4-61:	Chromatogramme von Tween® 80 zum Vergleich der Methodenmodifikationen zur Entwicklung von Teil III.	135
Abb. 4-62:	Mögliche Abbauprodukte der Öl- und Linolsäure	137
Abb. 4-63:	Übersicht der Ergebnisse der Stresstests	138
Abb. 4-64:	Ausgewählte Bereiche der Chromatogramme zur Bestimmung der Abbauprodukte der Ölsäure.....	140
Abb. 4-65:	Ausgewählte Bereiche der Chromatogramme zur Bestimmung der Abbauprodukte der Linolsäure.	144

ANHANG

Abb. 4-66:	Ausgewählte Bereiche der Chromatogramme zur Bestimmung der Abbauprodukte der Linolsäure.	145
Abb. 4-67:	Strukturformeln möglicher Abbauprodukte von Linolsäure.	146

8.3. Abkürzungen

12-OH FA	12-Hydroxystearinsäure
ACN	Acetonitril
Add.	Addukt
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
API	Wirkstoff; <i>Active pharmaceutical ingredient</i>
APPI	<i>Atmospheric pressure photoionization</i>
AS	Ameisensäure
BCS	Biopharmazeutisches Klassifizierungssystem; <i>Biopharmaceutics Classification System</i>
bspw.	beispielsweise
C12 FAA	Laurylalkohol
C16 FAA	Cetylalkohol
C16/ C18 FAA	Cetylstearylalkohol
C18 FAA	Stearylalkohol
C18:1 FAA	Oleylalkohol
C12 FA	Laurinsäure
C14 FA	Myristinsäure
C16 FA	Palmitinsäure
C17 FA	Margarinsäure
C18 FA	Stearinsäure
C18:1 FA	Ölsäure
C18:2 FA	Linolsäure
CAD	<i>Charged Aerosol Detector</i>
CNLS	<i>Condensation Nucleation Light Scattering Detector</i>
DAD	<i>Diode array detector</i>
EGE	Ethylenglycol-Einheit
ESI	<i>Electron spray ionization</i>
EZ	Esterzahl
FA	Fettsäure
FAA	Fettalkohol

ANHANG

FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HLB	<i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie; <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IEC	Ionenaustauschchromatographie; <i>Ion exchange chromatography</i>
IR	Infrarot-Spektroskopie
IT	Ionenfalle; <i>Ion Trap</i>
IZ	Iodzahl
JPE	Japanisches Arzneibuch; <i>Japanese Pharmacopoeia</i>
MeOH	Methanol
mind.	Mindestens
MS	Massenspektrometrie
NQAD™	<i>Nano Quantity Analyte Detector</i>
<i>n/v</i>	nicht verfügbar
Na-Add.	Natrium-Addukt
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
NP	Normalphase
<i>Ph. Eur.</i>	Europäisches Arzneibuch; <i>Pharmacopoeia Europaea</i>
OHZ	Hydroxylzahl
O/W-Emulgator	Öl-in-Wasser Emulgator (<i>oil-in-water</i>)
PEG	Polyethylenglykol, Macrogol
POZ	Peroxidzahl
Q	<i>Single-Quadrupol</i>
QqQ	<i>Triple-Quadrupol</i>
RP-18	Umkehrphase; Octadecylsilaniertes Kieselgel; <i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAX	starker Ionenaustauscher; <i>strong anion exchange</i>

ANHANG

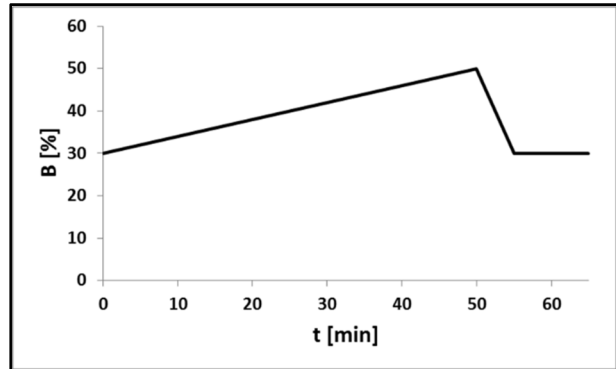
SCX	starker Kationenaustauscher; <i>strong cation exchange</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie; <i>Size-exclusion chromatography</i>
SZ	Säurezahl
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>Time-of-flight mass spectrometre</i>
u.a.	unter anderem
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
usw.	und so weiter
UVA	Unverseifbarer Anteil
USP	Arzneibuch der Vereinigten Staaten; <i>United States Pharmacopoeia</i>
v.a.	vor allem
VWD	<i>Variable wave-length detector</i>
VZ	Verseifungszahl
WAX	schwacher Anionenaustauscher; <i>weak anion exchange</i>
WB	Wasserbad
WCX	schwacher Kationenaustauscher; <i>weak cation exchange</i>
W/O-Emulgator	Wasser-in-Öl Emulgator (<i>water-in-oil</i>)
z. B.	zum Beispiel

8.4. Methodenübersicht

Tab. 8-1: Methoden zur Trennung der Macrogole an der Waters XTerra RP-18 Säule unter Verwendung von Wasser (MilliPore®) und MeOH als Lösungsmittel.⁷

XTerra_MeOH_000

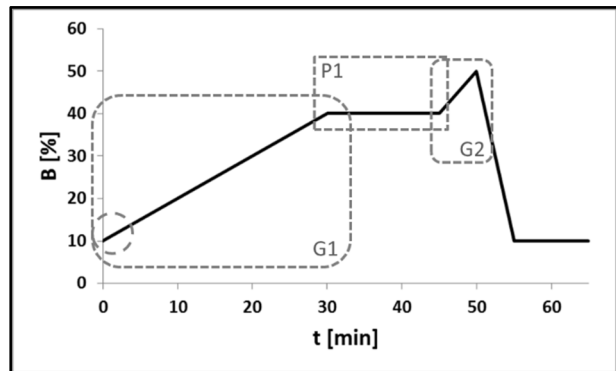
t [min]	MeOH [%]
0	30
50	50
55	50
65	30



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_001

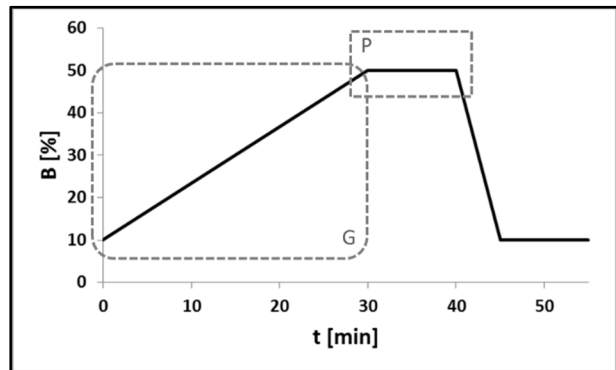
t [min]	MeOH [%]
0	10
30	40
45	40
50	50
55	10
65	10



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_002

t [min]	MeOH [%]
0	10
30	50
40	50
45	10
55	10

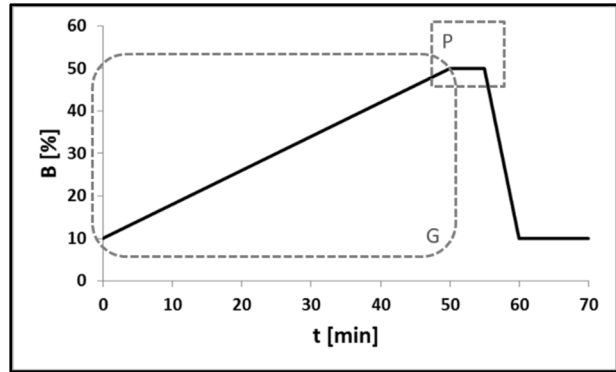


Flussrate: 0.5 ml/min

⁷ Änderungen im Vergleich zu vorhergehenden Methoden sind in der Gradiententabelle fett und in den Schaubildern separat markiert.

XTerra_MeOH_003

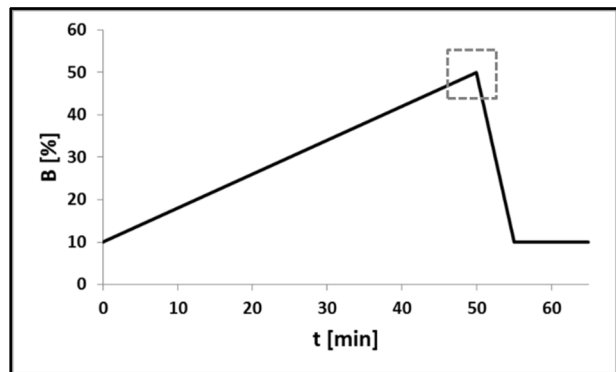
t [min]	MeOH [%]
0	10
50	50
55	50
60	10
70	10



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_003a

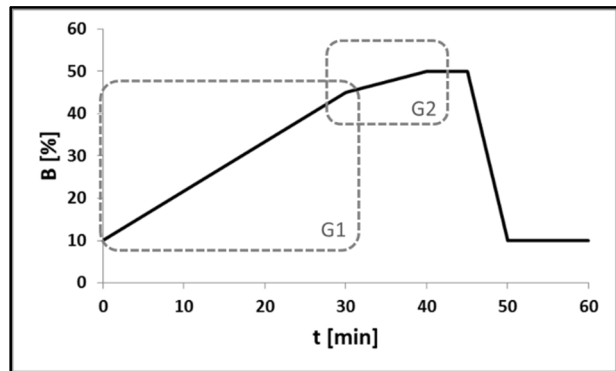
t [min]	MeOH [%]
0	10
50	50
55	10
65	10



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_004

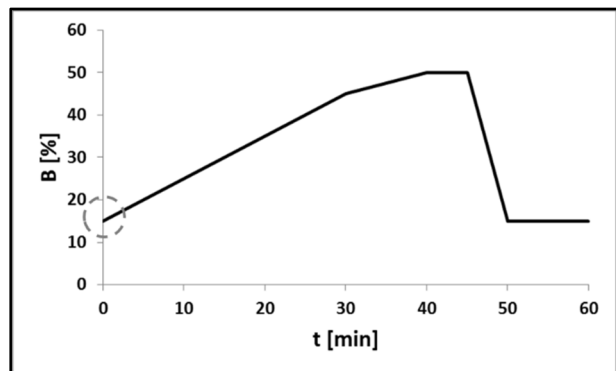
t [min]	MeOH [%]
0	10
30	45
40	50
45	50
50	10
60	10



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_005

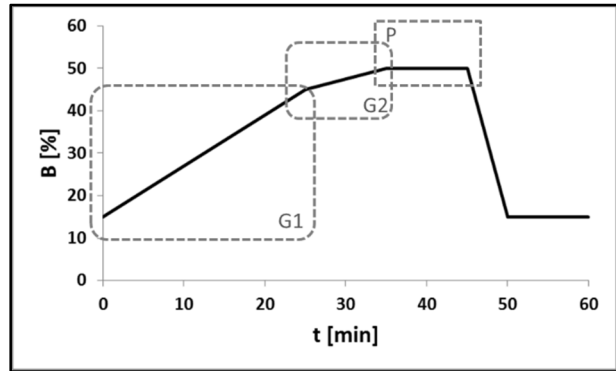
t [min]	MeOH [%]
0	15
30	45
40	50
45	50
50	15
60	15



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_006

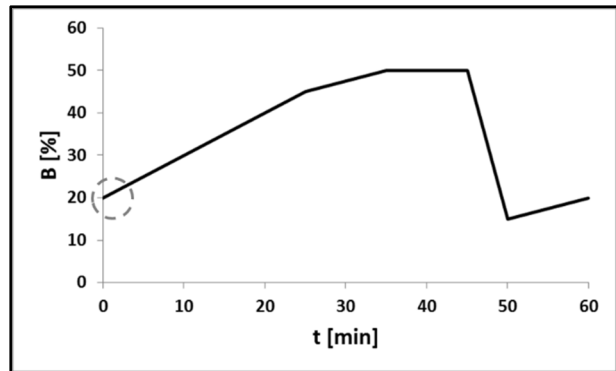
t [min]	MeOH [%]
0	15
25	45
35	50
45	50
50	15
60	15



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_007

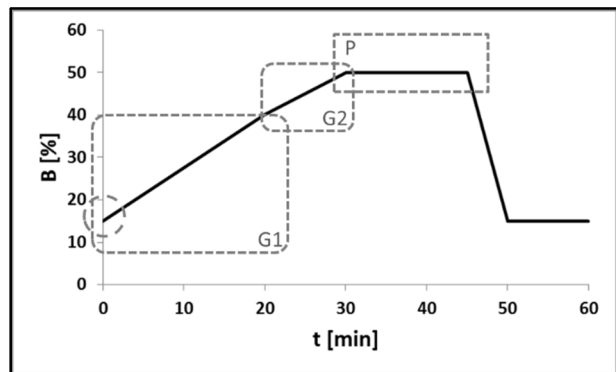
t [min]	MeOH [%]
0	20
25	45
35	50
45	50
50	15
60	20



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_008

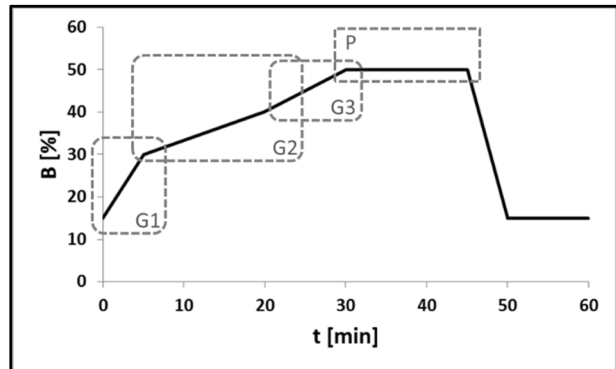
t [min]	MeOH [%]
0	15
20	40
30	50
45	50
50	15
60	15



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_009

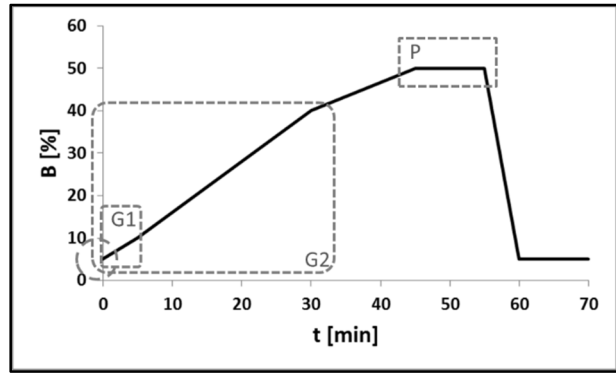
t [min]	MeOH [%]
0	15
5	30
20	40
30	50
45	50
50	15
60	15



Flussrate: 0.5 ml/min

XTerra_MeOH_010

t [min]	MeOH [%]
0	5
5	10
30	40
45	50
55	50
60	5
70	5

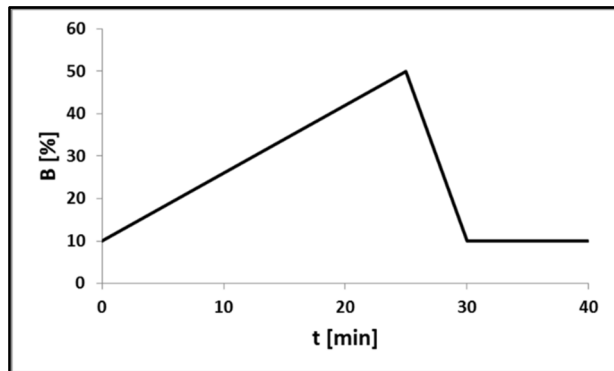


Flussrate: 0.5 ml/min

Tab. 8-2: Methoden zur Trennung der Macrogele an der Waters XTerra RP-18 Säule unter Verwendung von Wasser (MilliPore®) und ACN als Lösungsmittel.⁸

XTerra_ACN_000

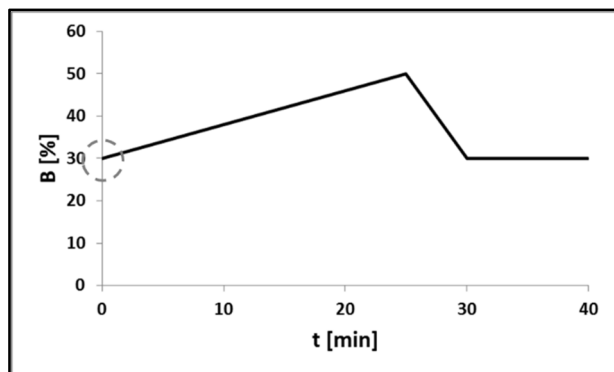
t [min]	ACN [%]
0	10
25	50
30	10
40	10



Flussrate: 1.0 ml/min

XTerra_ACN_001

t [min]	ACN [%]
0	30
25	50
30	30
40	30



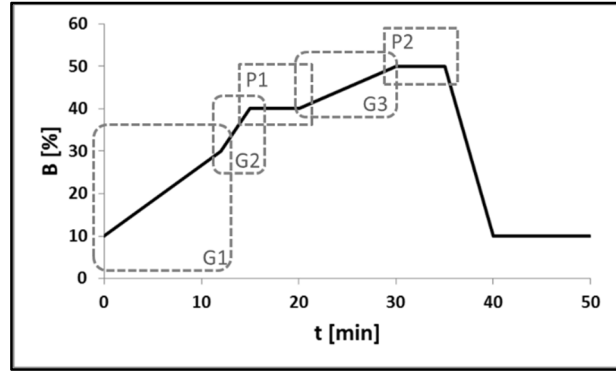
Flussrate: 1.0 ml/min

⁸ Änderungen im Vergleich zu vorhergehenden Methoden sind in der Gradiententabelle fett und in den Schaubildern separat markiert.

ANHANG

XTerra_ACN_002

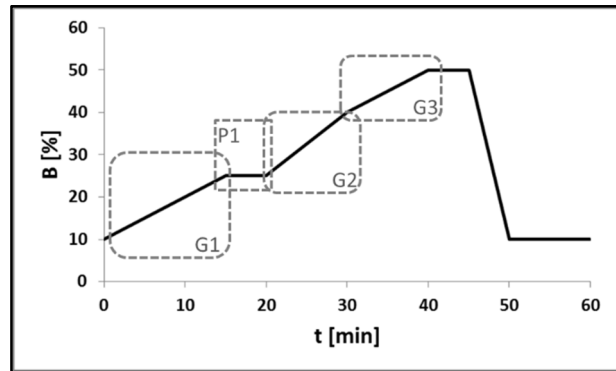
t [min]	ACN [%]
0	10
12	30
15	40
20	40
30	50
35	50
40	10
50	10



Flussrate: 1.0 ml/min

XTerra_ACN_003

t [min]	ACN [%]
0	10
15	25
20	25
30	40
40	50
45	50
50	10
60	10



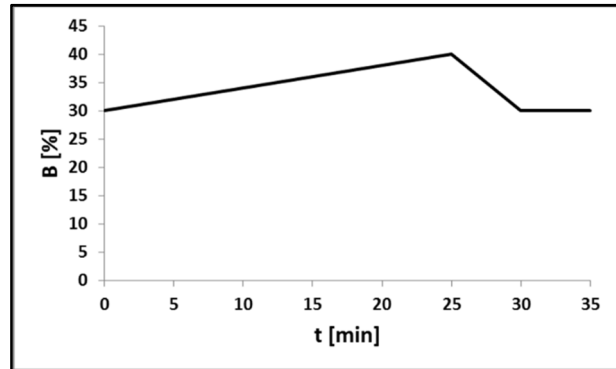
Flussrate: 1.0 ml/min

ANHANG

Tab. 8-3: Methodenentwicklung an der YMC-Pack Pro C18 Säule unter Verwendung von Wasser (MilliPore®) und ACN als Lösungsmittel. Erste Entwicklungsschritte zur Trennung von PEGs im Bereich 300 – 1000.⁹

YMC_001

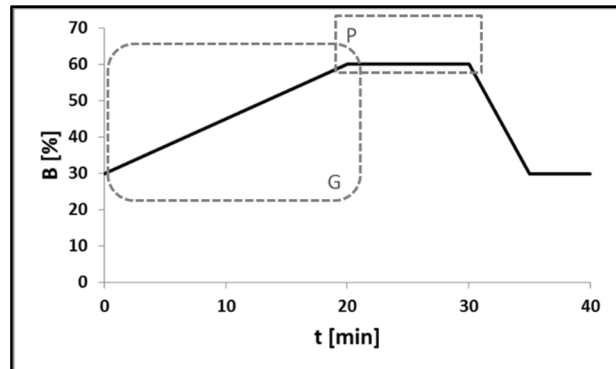
t [min]	ACN [%]
0	30
25	40
30	40
35	30



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_002

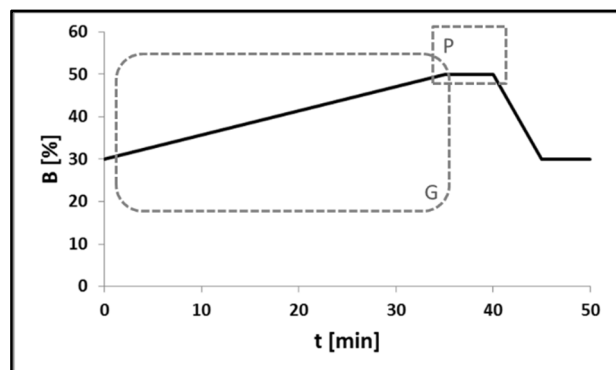
t [min]	ACN [%]
0	30
20	60
30	60
35	30
40	30



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_003

t [min]	ACN [%]
0	30
35	50
40	50
45	30
50	30

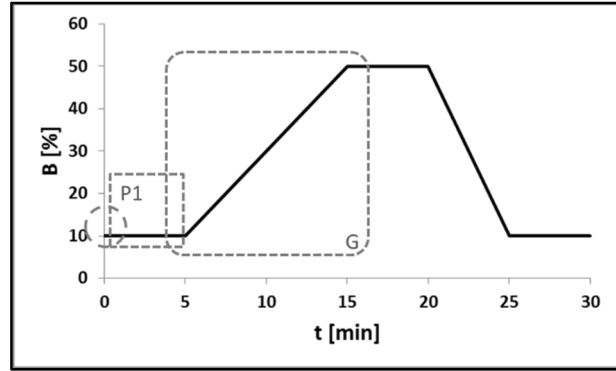


Flussrate: 1.0 ml/min

⁹ Änderungen im Vergleich zu vorhergehenden Methoden sind in der Gradiententabelle fett und in den Schaubildern separat markiert.

YMC_004a

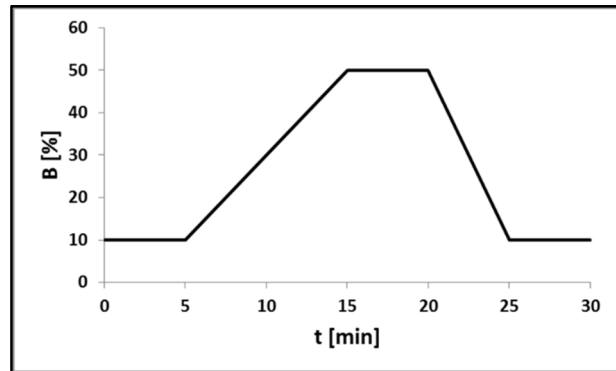
t [min]	ACN [%]
0	10
5	10
15	50
20	50
25	10
30	10



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_004b

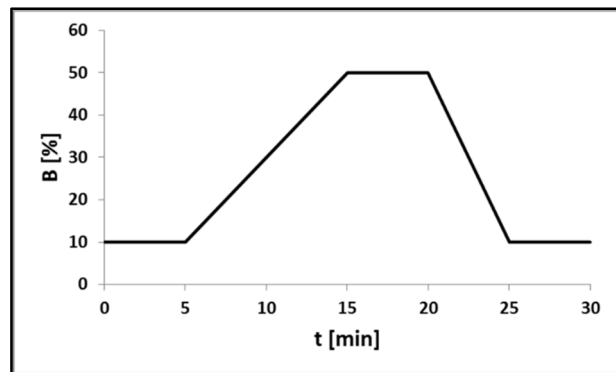
t [min]	ACN [%]
0	10
5	10
15	50
20	50
25	10
30	10



Flussrate: 0.75 ml/min

YMC_005

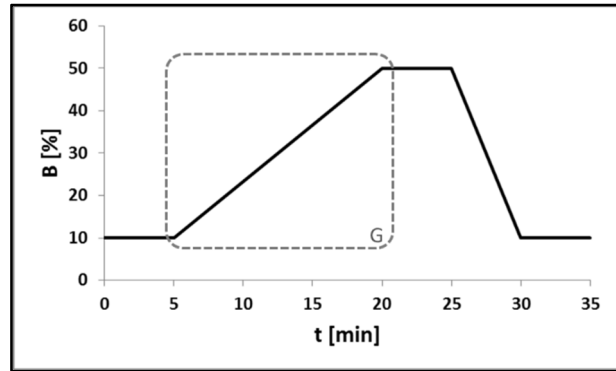
t [min]	ACN [%]
0	10
5	10
15	50
20	50
25	10
30	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_006

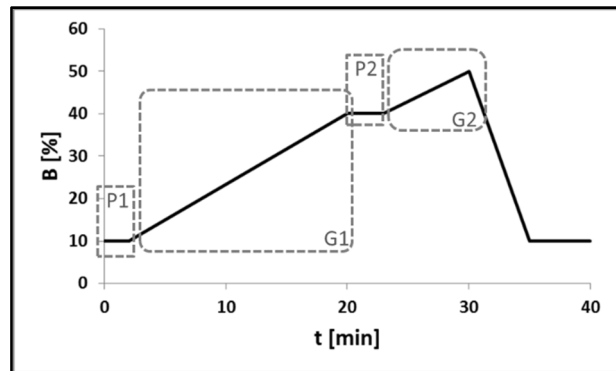
t [min]	ACN [%]
0	10
5	10
20	50
25	50
30	10
35	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_007

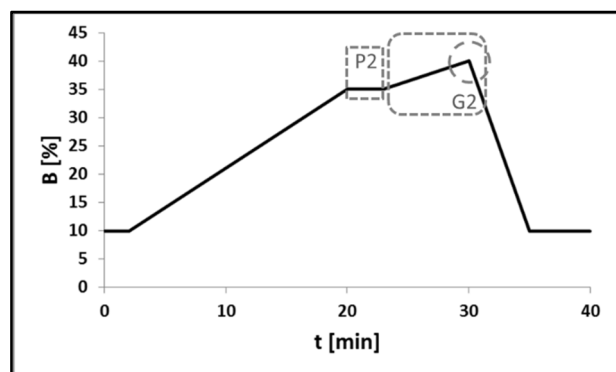
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
20	40
23	40
30	50
35	10
40	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_008

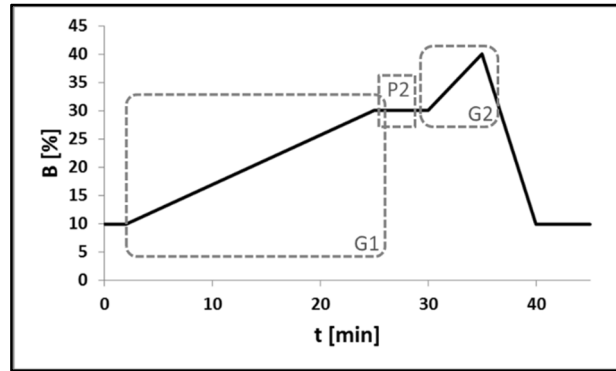
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
20	35
23	35
30	40
35	10
40	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_009

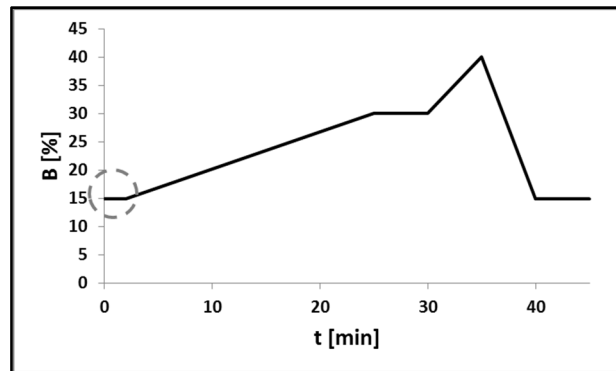
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
25	30
30	30
35	40
40	10
45	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_010

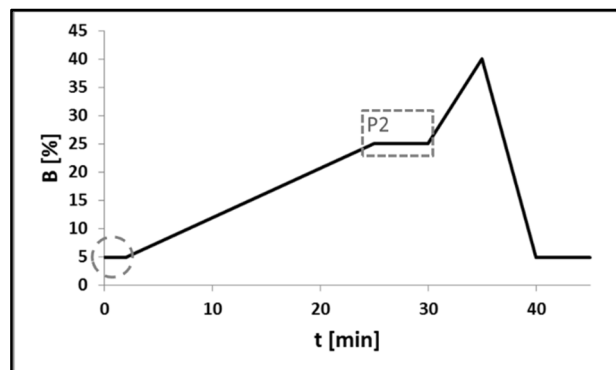
t [min]	ACN [%]
0	15
2	15
25	30
30	30
35	40
40	15
45	15



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_011

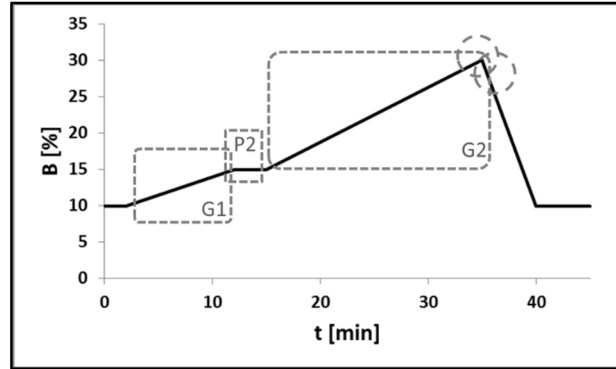
t [min]	ACN [%]
0	5
2	5
25	25
30	25
35	40
40	5
45	5



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_012

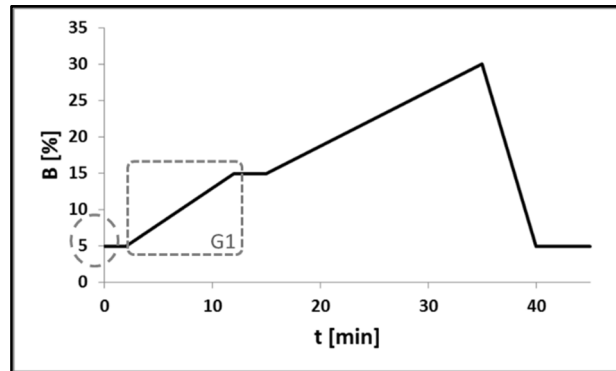
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
40	10
45	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_013

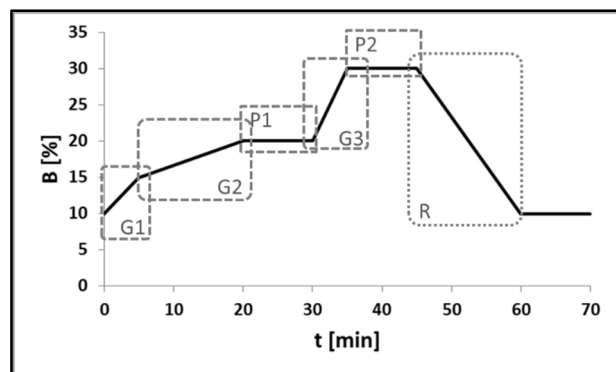
t [min]	ACN [%]
0	5
2	5
12	15
15	15
35	30
40	5
45	5



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_014

t [min]	ACN [%]
0	10
5	15
20	20
30	20
35	30
45	30
60	10
70	10



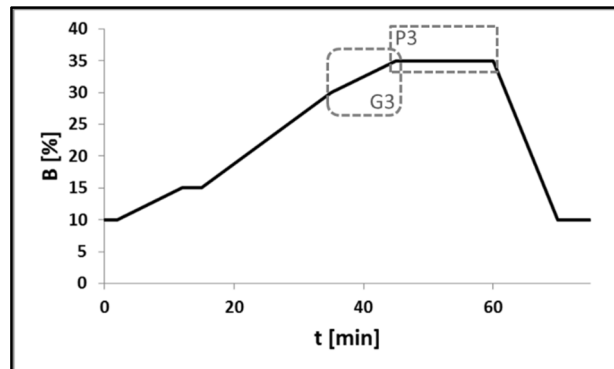
Flussrate: 0.5 ml/min

ANHANG

Tab. 8-4: Fortsetzung der Methodenentwicklung an der YMC-Pack Pro C18 Säule zur Trennung von Macrogolen höherer Kettenlängen (PEG 1500 – 3000) durch Modifikation der Methode YMC_012.¹⁰ Verwendung von Wasser (MilliPore®) und ACN als Lösungsmittel.

YMC_012_M001

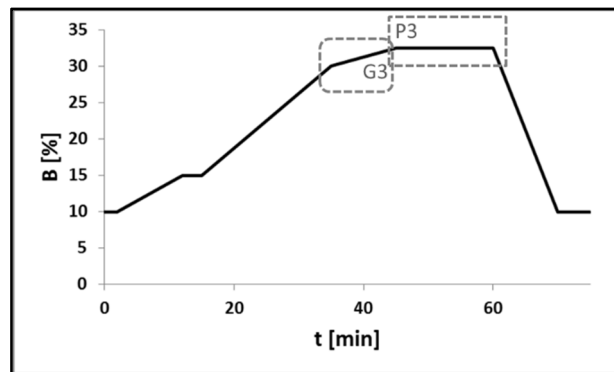
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
45	35
60	35
70	10
75	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_012_M002

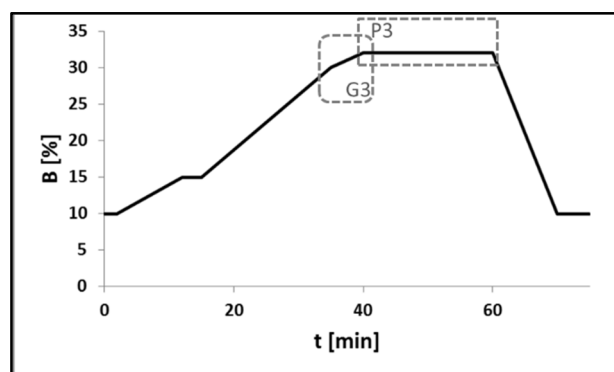
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
45	32.5
60	32.5
70	10
75	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_012_M003

t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
40	30
60	30
70	10
75	10



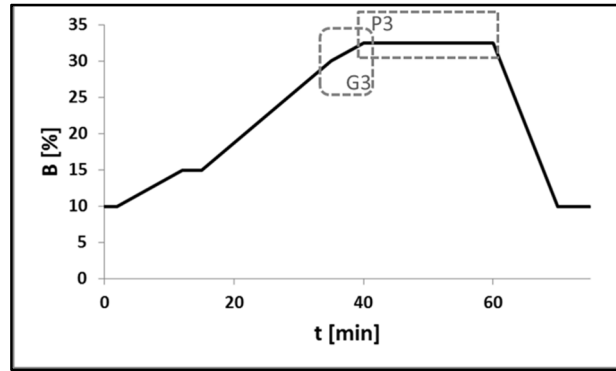
Flussrate: 0.5 ml/min

¹⁰ Änderungen im Vergleich zu vorhergehenden Methoden sind in der Gradiententabelle fett und in den Schaubildern separat markiert.

ANHANG

YMC_012_M004

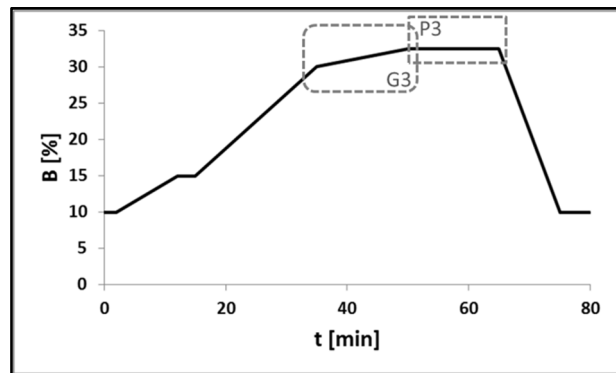
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
40	32.5
60	32.5
70	10
75	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_012_M005

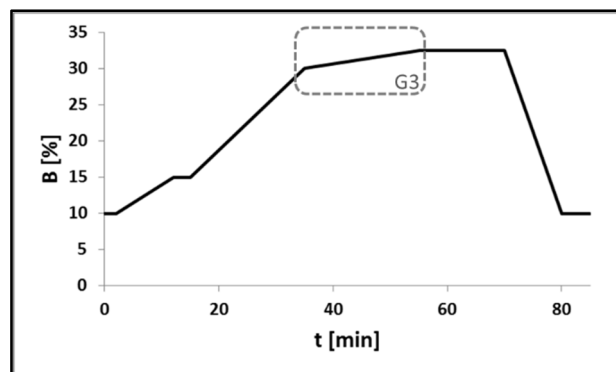
t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
50	32.5
65	32.5
75	10
80	10



Flussrate: 0.5 ml/min

YMC_012_M006

t [min]	ACN [%]
0	10
2	10
12	15
15	15
35	30
55	32.5
70	32.5
80	10
85	10

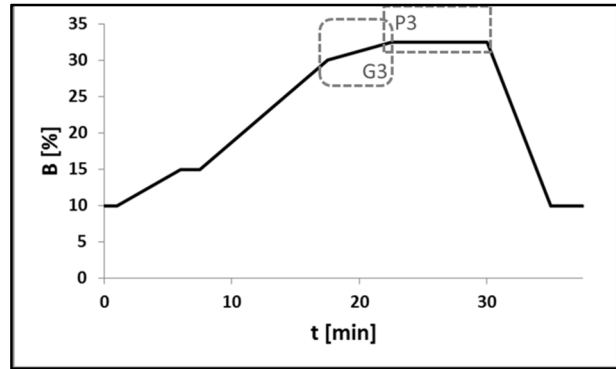


Flussrate: 0.5 ml/min

ANHANG

YMC_012_M002f

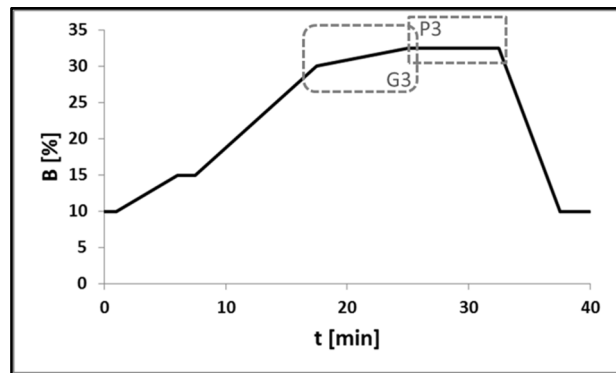
t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
22.5	32.5
30	32.5
35	10
37.5	10



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_012_M005f

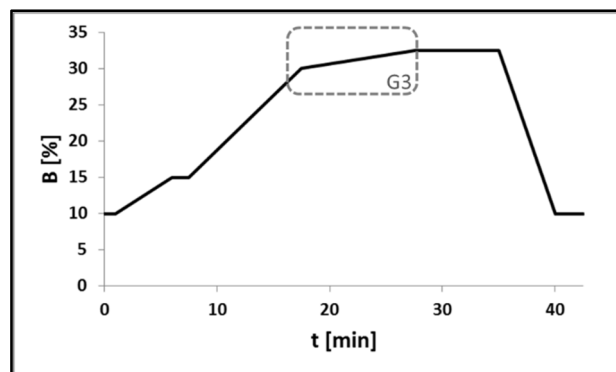
t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
25	32.5
32.5	32.5
37.5	10
40	10



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_012_M006f

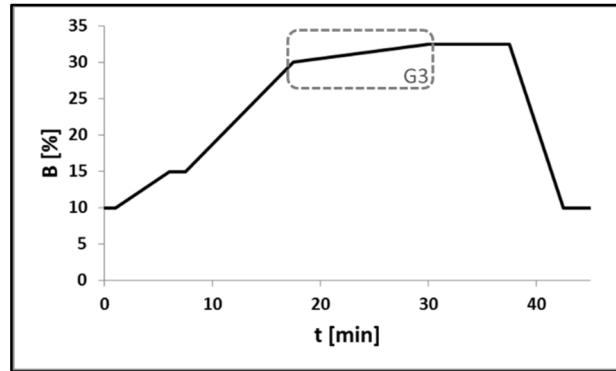
t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
40	10
42.5	10



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_012_M007f

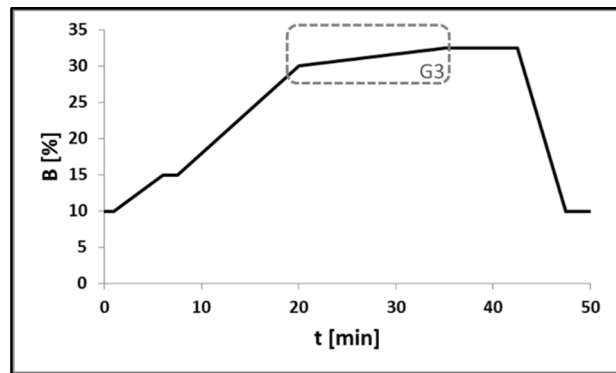
t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
30	32.5
37.5	32.5
42.5	10
45	10



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_012_M008f

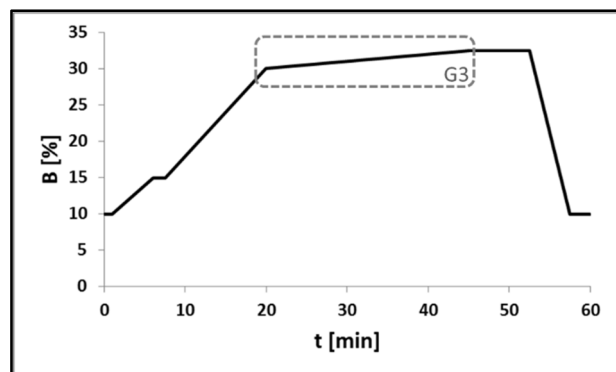
t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
20	30
35	32.5
42.5	32.5
47.5	10
50	10



Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_012_M009f

t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
20	30
45	32.5
52.5	32.5
57.5	10
60	10

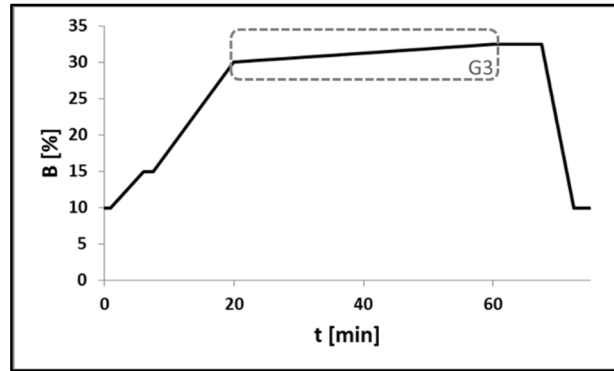


Flussrate: 1.0 ml/min

ANHANG

YMC_012_M010f

t [min]	ACN [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
20	30
60	32.5
67.5	32.5
72.5	10
75	10

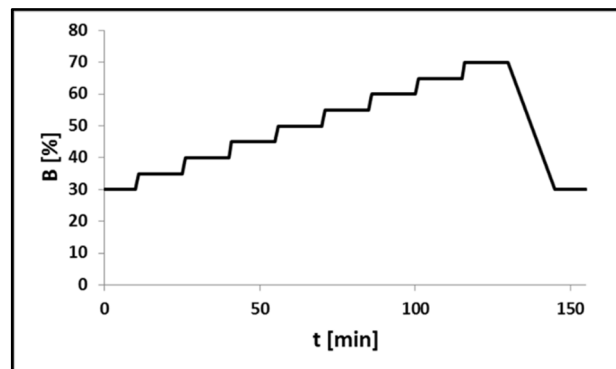


Flussrate: 1.0 ml/min

Tab. 8-5: Methodenentwicklung des 2. Teils (lipophilen Parts) zur Trennung der Fettsäuren und Fettalkohole. Verwendung der YMC-Pack Pro C18 Säule und verschiedener Lösungsmittel und Lösungsmittelzusätzen.¹¹

MeOH_YMC_FA

t [min]	B [%]
0	30
10	30
11	35
25	35
26	40
40	40
41	45
55	45
56	50
70	50
71	55
85	55
86	60
100	60
101	65
115	65
116	70
130	70
145	30
155	30



Flussrate: 0.5 ml/min

A: Wasser (MilliPore®)

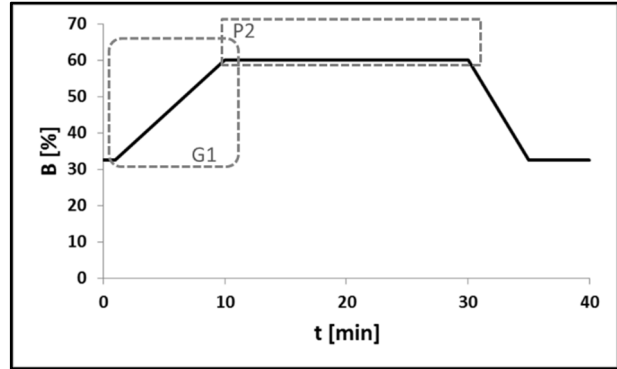
B: MeOH

¹¹ Änderungen im Vergleich zu vorhergehenden Methoden sind in der Gradiententabelle fett und in den Schaubildern separat markiert.

FA_YMC_001

t [min]	B [%]
0	32.5
1	32.5
10	60
30	60
35	32.5
40	32.5

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN

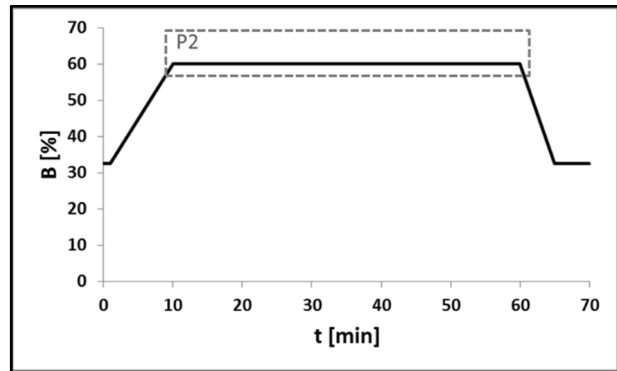


Flussrate: 1.0 ml/min

FA_YMC_002

t [min]	B [%]
0	32.5
1	32.5
10	60
60	60
65	32.5
70	32.5

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN

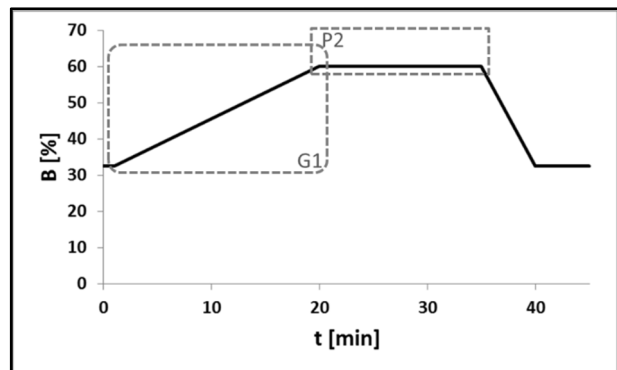


Flussrate: 1.0 ml/min

FA_YMC_003

t [min]	B [%]
0	32.5
1	32.5
20	60
35	60
40	32.5
45	32.5

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN



Flussrate: 1.0 ml/min

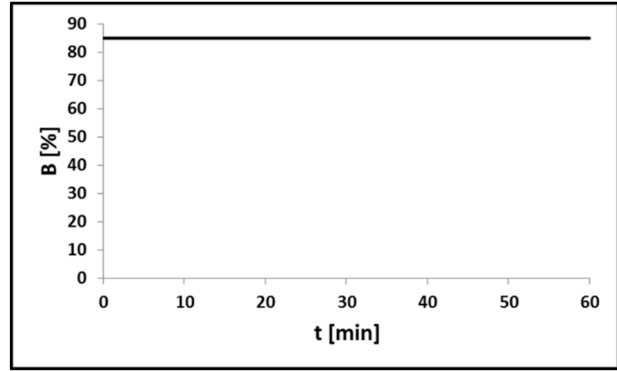
ANHANG

FA_YMC_004

isokratisch
A:B (15:85)

Laufzeit 60 min

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN



Flussrate: 1.0 ml/min

FA_YMC_005a

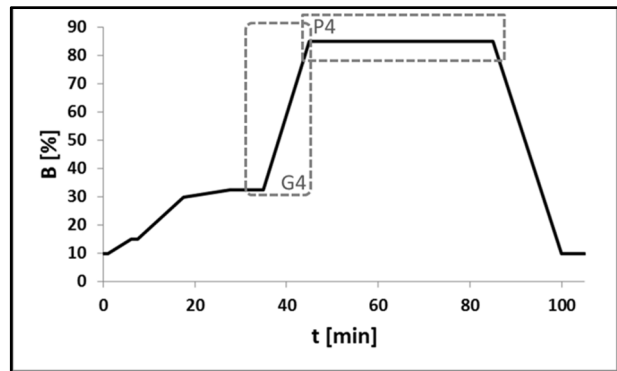
(ohne Zusatz)

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
45	85
85	85
100	10
105	10

FA_YMC_005b

(+ 0.025 %
Ameisensäure)

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN



Flussrate: 1.0 ml/min

FA_YMC_005c

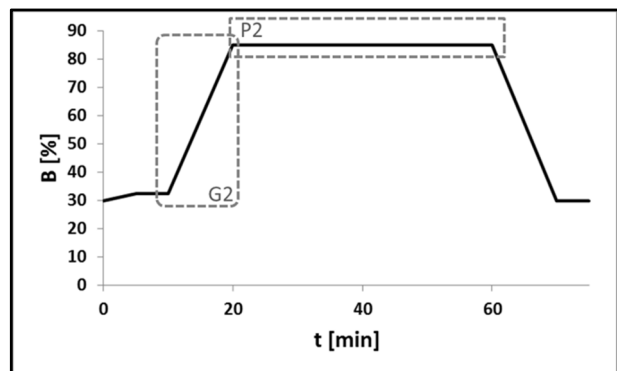
(ohne Zusatz)

t [min]	B [%]
0	30
5	32.5
10	32.5
20	85
60	85
70	10
75	10

FA_YMC_005d

(+ 0.025 %
Ameisensäure)

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN

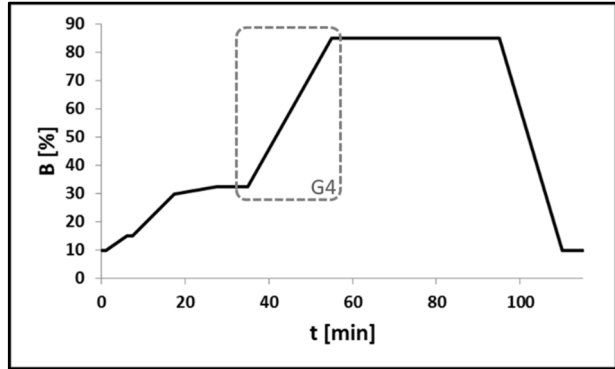


Flussrate: 1.0 ml/min

ANHANG

FA_YMC_006a
(ohne Zusatz)

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
55	85
95	85
110	10
115	10

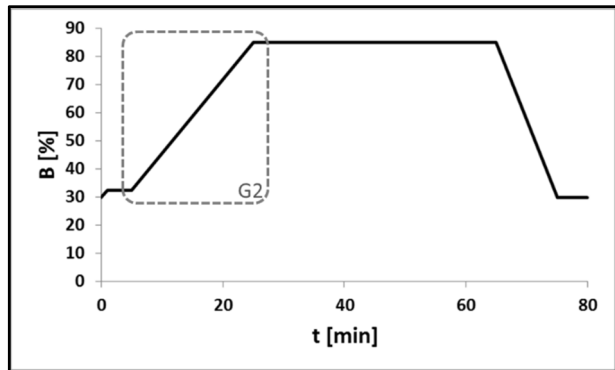


Flussrate: 1.0 ml/min

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN

FA_YMC_006b

t [min]	B [%]
0	30
1	32.5
5	32.5
25	85
65	85
75	10
80	10

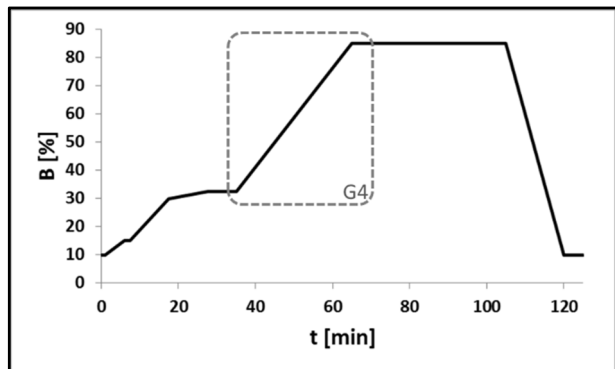


Flussrate: 1.0 ml/min

A: Wasser (MilliPore®) +
0.025 % Ameisensäure
B: ACN + 0.025 %
Ameisensäure

FA_YMC_007
(ohne Zusatz)

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
65	85
105	85
120	10
125	10



Flussrate: 1.0 ml/min

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN

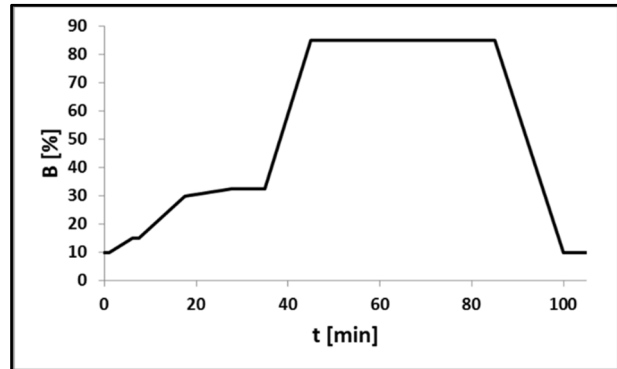
ANHANG

Tab. 8-6: Gesamtmethoden entwickelt an der YMC-Pack Pro C18 Säule. Abschließende Modifikationen und spezielle Betrachtungen.¹²

YMC_D001

(Zusatz 0.05 % Ameisensäure)

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
45	85
85	85
100	10
105	10

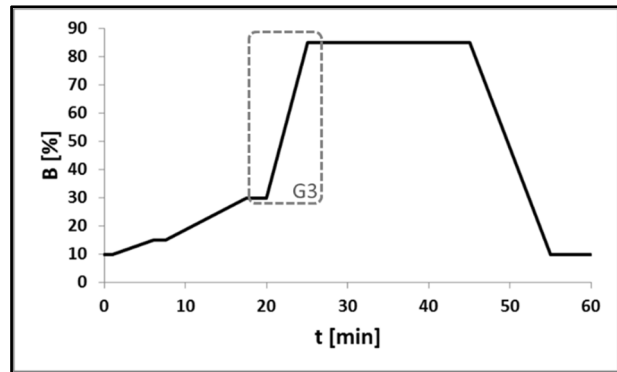


Flussrate: 1.0 ml/min

A: Wasser (MilliPore®)
B: ACN

YMC_D003_Low

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
20	30
25	85
45	85
55	10
60	10

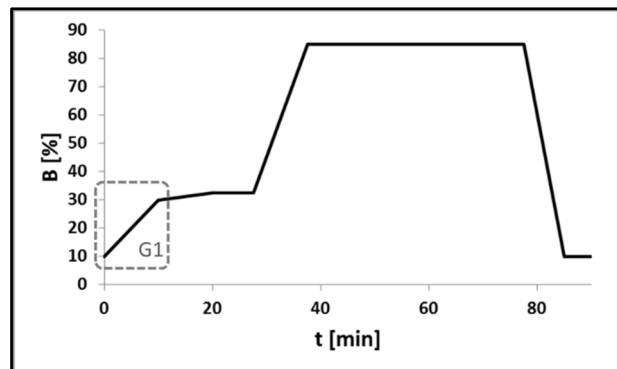


Flussrate: 1.0 ml/min

A: Wasser (MilliPore®)
+ 0.1 % Ameisensäure
B: ACN+ 0.1 %
Ameisensäure

YMC_D003_High

t [min]	B [%]
0	10
10	30
20	32.5
27.5	32.5
37.5	85
77.5	85
85	10
90	10



Flussrate: 1.0 ml/min

A: Wasser (MilliPore®)+
0.1 % Ameisensäure
B: ACN+ 0.1 %
Ameisensäure

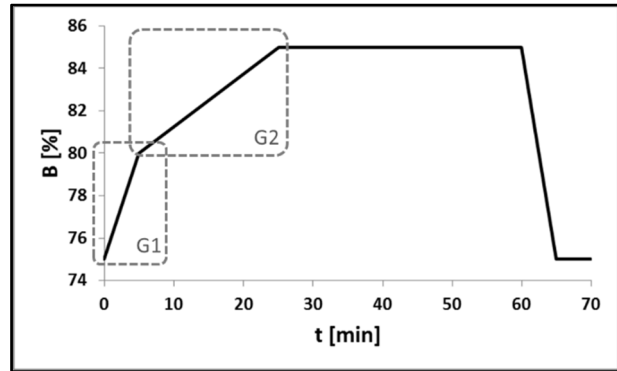
¹² Änderungen im Vergleich zu vorhergehenden Methoden sind in der Gradiententabelle fett und in den Schaubildern separat markiert.

ANHANG

YMC_D003_S2M_001

t [min]	B [%]
0	75
5	80
25	85
60	85
65	75
70	75

A: Wasser (MilliPore®)
+ 0.1 % Ameisensäure
B: ACN + 0.1 %
Ameisensäure

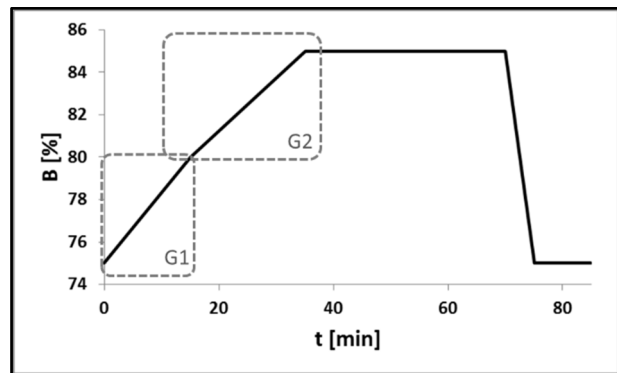


Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_D003_S2M_002

t [min]	B [%]
0	75
15	80
35	85
70	85
75	75
85	75

A: Wasser (MilliPore®)
+ 0.1 % Ameisensäure
B: ACN + 0.1 %
Ameisensäure

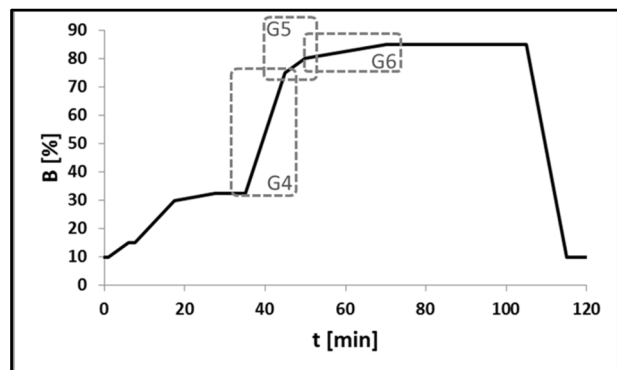


Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_D003_final

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
45	75
50	80
70	85
105	85
115	10
120	10

A: Wasser (MilliPore®)
+ 0.1 % Ameisensäure
B: ACN + 0.1 %
Ameisensäure



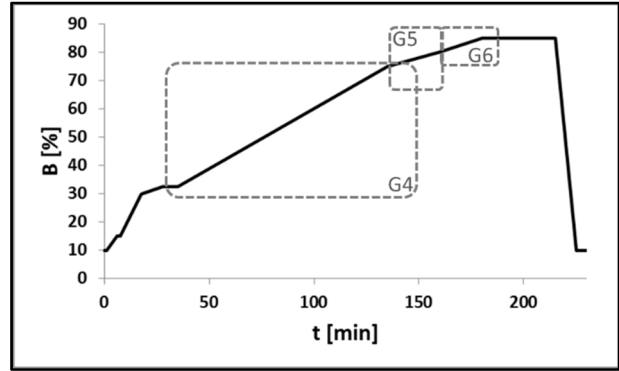
Flussrate: 1.0 ml/min

ANHANG

YMC_D003_RH40_001

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
17.5	30
27.5	32.5
35	32.5
135	75
160	80
180	85
215	85
225	10
230	10

A: Wasser (MilliPore®)
+ 0.1 % Ameisensäure
B: ACN + 0.1 %
Ameisensäure

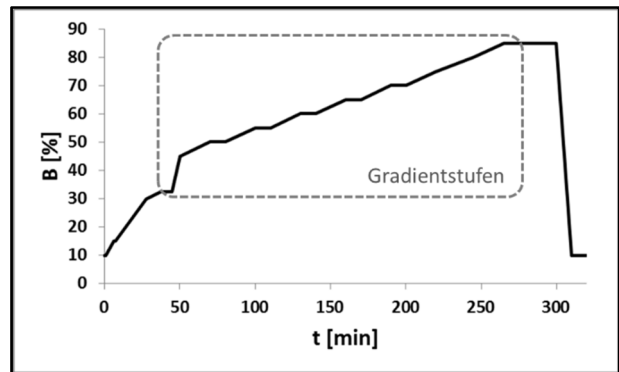


Flussrate: 1.0 ml/min

YMC_D003_RH40_002

t [min]	B [%]
0	10
1	10
6	15
7.5	15
27.5	30
37.5	32.5
45	32.5
50	45
70	50
80	50
100	55
110	55
130	60
140	60
160	65
170	65
190	70
200	70
220	75
245	80
265	85
300	85
310	10
320	10

A: Wasser (MilliPore®)
+ 0.1 % Ameisensäure
B: ACN + 0.1 %
Ameisensäure



Flussrate: 1.0 ml/min

ANHANG

8.5. Tabellen

Tab. 8-7: Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden XTerra_MeOH_000 bis XTerra_MeOH_003a. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Die Startkonzentration MeOH aller Methoden lag bei 10 %, während die Zielkonzentration bei 50 % MeOH lag. Diese wurde bei „001“ über einen 2-stufigen Gradienten erreicht, während „002“-„003a“ einstufig verliefen. Der Gradient von „002“ verlief steiler als bei „003“ und „003a“.

betrachtete Peaks	XTerra_MeOH_000	XTerra_MeOH_001	XTerra_MeOH_002	XTerra_MeOH_003	XTerra_MeOH_003a
1+2	6.82	11.25	9.50	10.01	12.74
2+3	2.13	10.11	8.81	9.45	11.50
3+4	2.15	8.96	7.80	8.86	10.35
4+5	2.30	7.88	6.79	8.33	9.24
5+6	2.59	6.98	6.21	7.81	8.39
6+7	3.16	6.57	5.59	7.77	8.06
7+8	3.70	6.39	5.01	7.45	7.62
8+9	4.13	5.59	4.32	6.35	6.68
9+10	4.13	4.81	3.88	11.26	5.95
10+11	4.59	4.26	3.81	5.19	5.47
11+12	4.97	4.18	3.25	4.38	5.33
12+13	4.74	3.56	2.79	3.96	4.40
13+14	4.56	3.07	2.48	3.66	3.58
14+15	4.25	3.09	2.21	2.96	3.35
15+16	4.01	3.03	1.99	2.57	3.00
16+17	3.96	2.83	1.79	2.40	2.73
17+18	3.86	2.90	1.66	2.29	2.50
18+19	3.64	2.92	1.63	2.30	2.27
19+20	3.57	3.00	1.57	2.17	2.13
20+21	3.36	3.04	1.58	2.02	2.13
21+22	3.21	3.06	1.50	1.86	2.10
22+23	3.13	3.19	1.28	1.90	2.02
23+24	2.96	4.35	1.20	1.94	1.88
24+25	2.89	0.23	1.13	1.90	1.80
25+26	2.94	4.07	1.14	1.76	1.78
26+27	2.71	-	1.09	1.83	1.98
27+28	2.51	-	1.28	1.94	-
28+29	3.07	-	-	1.58	-
29+30	0.23	-	-	-	-
30+31	4.17	-	-	-	-
31+32	5.08	-	-	-	-

ANHANG

Tab. 8-8: Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden XTerra_MeOH_004 bis XTerra_MeOH_010. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Einführung verschiedener Gradientstufen im Vergleich zu r einstufigen Ausgangsmethode („000“) und Variation der Gradientensteilheit. 2-stufige Gradienten in den Methoden „004“ bis „007“ mit sinkender Gradientensteilheit („004“ > „005“ > „006“ > „007“), 3-stufige Gradienten in den Methoden „009“ und „010“.

betrachtete Peaks	XTerra_MeOH_004	XTerra_MeOH_005	XTerra_MeOH_006	XTerra_MeOH_007	XTerra_MeOH_008	XTerra_MeOH_009	XTerra_MeOH_010
1+2	9.48	7.15	7.17	1.34	7.01	5.83	12.58
2+3	8.51	7.15	6.70	4.77	6.55	4.8	10.12
3+4	7.40	6.78	6.30	5.39	6.16	4.06	8.29
4+5	6.56	6.29	5.90	5.65	5.82	3.85	7.45
5+6	6.04	6.08	5.68	6.01	5.53	3.96	6.31
6+7	5.55	6.03	5.47	6.29	5.25	3.95	5.56
7+8	5.23	5.99	5.52	6.45	4.99	4.2	5.34
8+9	5.37	5.37	5.19	6.44	4.58	4.36	5.18
9+10	4.68	4.95	4.81	6.57	4.16	4.36	4.79
10+11	4.30	5.05	4.76	5.93	4.05	4.10	4.61
11+12	3.70	4.33	3.71	6.11	3.45	3.99	3.78
12+13	2.85	3.96	3.12	5.22	2.94	3.89	3.21
13+14	2.57	3.35	2.75	3.90	2.56	3.48	3.03
14+15	2.30	2.89	2.39	3.46	2.30	3.18	2.55
15+16	2.03	2.62	2.20	3.18	2.11	2.87	2.29
16+17	1.83	2.31	2.03	3.00	1.99	2.71	2.25
17+18	1.77	2.12	1.86	2.64	1.87	2.51	2.05
18+19	1.69	2.01	1.76	2.41	1.72	2.38	1.96
19+20	1.57	1.98	1.63	2.26	1.56	2.21	1.88
20+21	1.47	1.89	1.50	2.02	1.49	1.94	1.79
21+22	1.45	1.89	1.46	2.01	1.43	1.85	1.73
22+23	1.43	1.76	1.43	2.06	1.39	1.76	1.65
23+24	1.41	1.69	1.51	1.98	1.30	1.58	1.70
24+25	1.33	1.64	1.44	2.03	1.32	1.53	1.77
25+26	1.48	1.64	1.38	1.89	1.27	1.50	1.77
26+27	1.55	1.62	1.53	1.99	1.29	1.48	1.71
27+28	1.52	1.74	1.74	1.95	1.29	1.42	1.59
28+29	1.88	-	1.40	2.05	1.51	1.43	1.59
29+30	-	-	0.98	-	1.39	1.30	-
30+31	-	-	-	-	-	1.23	-

ANHANG

Tab. 8-9: Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden XTerra_ACN_000 bis XTerra_ACN_003. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Einstufige Methoden XTerra_ACN_000 (Ausgangsmethode, 10 % ACN Startkonzentration) und XTerra_ACN_001 (30 % ACN Startkonzentration) verglichen mit den 2-stufigen Methoden XTerra_ACN_002 (generell steilere Gradienten) und XTerra_ACN_003 (flachere Gradienten).

betrachtete Peaks	XTerra_ACN_000	XTerra_ACN_001	XTerra_ACN_002	XTerra_ACN_003
1+2	3.50	32.89	3.63	3.59
2+3	4.91	35.48	4.61	5.00
3+4	4.82	49.91	4.87	5.37
4+5	4.71	21.08	4.69	5.41
5+6	4.55	-	4.41	5.44
6+7	4.40	-	4.13	5.31
7+8	3.92	-	3.74	5.03
8+9	3.63	-	3.47	5.15
9+10	3.23	-	3.33	1.10
10+11	3.03	-	2.93	5.26
11+12	2.87	-	2.62	4.18
12+13	2.44	-	2.45	2.16
13+14	2.18	-	2.13	2.19
14+15	2.00	-	1.91	3.67
15+16	1.80	-	1.76	0.90
16+17	1.65	-	1.61	3.40
17+18	1.55	-	1.48	2.76
18+19	1.46	-	1.42	2.59
19+20	1.35	-	1.32	2.32
20+21	1.27	-	1.24	2.15
21+22	1.21	-	1.15	1.97
22+23	1.12	-	1.11	1.80
23+24	1.08	-	1.06	1.71
24+25	1.04	-	1.04	1.61
25+26	1.00	-	1.00	1.52
26+27	1.04	-	1.04	1.45
27+28	1.04	-	1.11	1.48
28+29	1.20	-	1.28	1.50
29+30	-	-	-	1.51
30+31	-	-	-	1.53
31+32	-	-	-	1.62
32+33	-	-	-	1.75
33+34	-	-	-	1.46

ANHANG

Tab. 8-10: Berechnete Auflösungen für PEG 600 vermessen mit den Methoden YMC_001 bis YMC_006. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Bestimmung der optimalen Startkonzentration und der geeigneten Gradientensteilheit des einfachen Gradienten. Startkonzentrationen: 30 % (YMC_001 – 003) und 10 % (YMC_004 – 006). Steigende Gradientensteilheit resultierend aus sinkender Flussrate: YMC_004a (1.0 ml/min; flachster Gradient), YMC_004b (0.75 ml/min), YMC_005 (0.5 ml/min; steilster Gradient). Verlängerung der Gradientzeit und dabei sinkende Steilheit: YMC_006.

betrachtete Peaks	YMC_001	YMC_002	YMC_003	YMC_004a	YMC_004b	YMC_005	YMC_006
1+2	1.46	4.13	1.63	9.29	7.51	4.89	6.47
2+3	1.54	-	1.25	6.15	4.64	3.21	4.37
3+4	-	-	-	4.25	3.39	2.35	3.28
4+5	-	-	-	3.29	2.70	1.89	2.72
5+6	-	-	-	2.73	2.18	1.63	2.32
6+7	-	-	-	2.35	1.92	1.49	2.04
7+8	-	-	-	2.04	1.75	1.38	1.79
8+9	-	-	-	1.85	1.56	1.24	1.58
9+10	-	-	-	1.71	1.41	1.08	1.46
10+11	-	-	-	1.58	1.31	0.99	1.36
11+12	-	-	-	1.47	1.22	0.95	1.28
12+13	-	-	-	1.42	1.18	0.90	1.23
13+14	-	-	-	1.35	1.17	0.90	1.22
14+15	-	-	-	1.24	1.18	0.94	1.20
15+16	-	-	-	1.22	1.20	1.08	1.23
16+17	-	-	-	1.31	1.26	-	1.21
17+18	-	-	-	1.32	1.32	-	1.19
18+19	-	-	-	1.30	-	-	-

ANHANG

Tab. 8-11: Berechnete Auflösungen für PEG 1000 vermessen mit den Methoden YMC_007 bis YMC_011. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Verwendung 2-stufiger Gradienten mit Variation der Intermediärkonzentration, sowie der Startkonzentrationen, und damit gleichzeitige Änderung der Gradientensteilheit. Startkonzentrationen: 10 % (YMC_007 – 009), 15 % (YMC_010), 5 % (YMC_011). Intermediärkonzentrationen: 40 % (YMC_007), 35 % (YMC_008), 30 % (YMC_009 und YMC_010), 25 % (YMC_011).

betrachtete Peaks	YMC_007	YMC_008	YMC_009	YMC_010	YMC_011
1+2	3.59	4.20	4.95	6.17	5.01
2+3	3.24	3.55	4.50	5.46	4.42
3+4	2.87	3.05	4.04	4.93	4.10
4+5	2.52	2.83	3.69	4.75	3.51
5+6	2.30	2.59	3.38	4.17	3.2
6+7	2.15	2.37	3.03	3.64	3.04
7+8	1.95	2.20	2.82	3.32	2.70
8+9	1.81	2.06	2.63	3.13	2.58
9+10	1.72	1.93	2.44	2.93	2.62
10+11	1.62	1.84	2.28	2.75	2.66
11+12	1.49	1.71	2.18	2.61	2.68
12+13	1.40	1.56	2.10	2.48	2.72
13+14	1.32	1.46	1.97	2.37	2.75
14+15	1.24	1.38	1.97	2.31	3.21
15+16	1.21	1.34	1.87	2.22	2.58
16+17	1.16	1.29	1.75	2.12	2.11
17+18	1.17	1.26	1.72	2.06	1.74
18+19	1.23	1.28	1.74	2.02	1.5
19+20	1.21	1.30	1.64	1.93	1.27
20+21	1.19	1.30	1.58	1.87	1.17
21+22	1.22	1.24	1.51	1.73	1.02
22+23	1.16	1.27	1.53	1.69	0.97
23+24	1.20	0.95	-	1.62	-
24+25	1.10	1.73	-	1.83	-

ANHANG

Tab. 8-12: Berechnete Auflösungen für die Probe „Mix 300 + 1000“ vermessen mit den Methoden YMC_010 bis YMC_014. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Variation der Startkonzentrationen: 15 % (YMC_010, YMC_013), 10 % (YMC_012, YMC_014) und 5 % (YMC_011). Zielkonzentrationen verringert auf 30 % (YMC_012 – 014). Erste Untersuchungen zu 3-stufiger Gradiententeilung (YMC_014).

betrachtete Peaks	YMC_010	YMC_011	YMC_012	YMC_013	YMC_014
1+2	3.80	16.82	14.52	16.66	13.80
2+3	4.58	13.04	15.15	11.72	12.53
3+4	5.09	9.83	13.10	8.80	8.96
4+5	6.08	8.21	13.08	8.18	9.03
5+6	7.05	7.15	11.02	9.05	9.54
6+7	6.90	6.5	12.04	8.32	11.32
7+8	6.92	5.73	9.34	7.58	17.91
8+9	6.85	5.66	9.17	6.68	0.14
9+10	6.64	5.28	7.63	6.18	20.51
10+11	5.80	4.82	6.59	5.80	11.29
11+12	5.42	4.31	5.52	5.00	10.06
12+13	4.85	4.02	5.96	4.38	8.20
13+14	4.36	3.73	5.19	4.13	7.60
14+15	3.85	3.27	4.31	3.71	7.87
15+16	3.59	2.99	3.91	3.46	6.20
16+17	3.39	2.86	3.71	3.16	5.17
17+18	3.05	2.70	3.42	2.96	4.23
18+19	2.89	2.61	3.14	2.67	3.78
19+20	2.76	2.66	2.96	2.57	3.46
20+21	2.61	2.71	2.95	2.43	3.00
21+22	2.39	2.73	2.72	2.27	2.76
22+23	2.32	2.87	2.54	2.19	2.47
23+24	2.28	2.97	2.47	2.10	2.26
24+25	2.22	2.40	2.36	2.03	2.17
25+26	2.15	2.01	2.20	1.98	2.08
26+27	2.04	1.72	2.15	1.95	2.07
27+28	2.00	1.44	2.09	1.81	2.01
28+29	1.97	1.24	2.09	1.79	1.89
29+30	1.87	1.12	1.96	1.73	1.75
30+31	1.67	0.93	1.89	1.67	1.67
31+32	1.65	0.80	1.72	1.47	1.61
32+33	1.51	1.19	1.67	1.47	1.59
33+34	1.74	-	-	-	-

ANHANG

Tab. 8-13: Berechnete Auflösungen für PEG 3000 vermessen mit den Methoden YMC_012_M001 bis YMC_012_M006. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Bestimmung der optimalen Zielkonzentration an ACN für höhere Oligomere. M001 (35 % ACN), M002 (32 % ACN) und M003 (32.5 % ACN). Modifikation der Gradientensteilheit über Variation der Gradientendauer: M004 (5 min; steilster Gradient), M005 (15 min) und M006 (20 min; flachster Gradient).

betrachtete Peaks	YMC_012_M001	YMC_012_M002	YMC_012_M003	YMC_012_M004	YMC_012_M005	YMC_012_M006
1+2	7.75	7.43	3.64	4.03	3.93	3.58
2+3	3.45	3.54	3.54	3.69	4.31	3.78
3+4	2.94	3.17	3.24	3.11	4.02	3.50
4+5	2.92	2.74	2.93	3.13	3.55	3.38
5+6	2.53	2.54	2.71	3.31	3.28	3.29
6+7	2.36	2.45	2.38	2.81	3.03	3.05
7+8	2.29	2.36	2.54	2.55	2.78	2.69
8+9	2.15	2.45	2.61	2.32	2.60	2.55
9+10	2.11	2.30	2.21	2.29	2.47	2.39
10+11	2.01	2.23	1.97	2.35	2.29	2.23
11+12	2.14	2.06	1.51	2.30	2.16	2.23
12+13	2.17	2.06	1.24	2.14	2.14	2.11
13+14	2.03	2.01	1.22	1.95	2.10	1.99
14+15	1.86	1.95	1.25	1.90	2.00	1.91
15+16	1.72	1.94	1.60	1.86	1.92	1.80
16+17	1.67	1.81	2.00	1.85	1.84	1.73
17+18	1.69	1.75	1.96	1.80	1.82	1.69
18+19	1.72	1.80	1.99	1.72	1.75	1.73
19+20	1.88	1.84	1.90	1.66	1.67	1.61
20+21	2.13	1.78	1.96	1.60	1.62	1.64
21+22	1.91	1.83	1.60	1.65	1.63	1.57
22+23	1.81	1.96	1.18	1.52	1.66	1.56
23+24	1.70	1.87	0.67	1.48	1.63	1.61
24+25	1.54	1.78	1.03	1.53	1.54	1.53
25+26	1.43	1.71	1.65	1.45	1.53	1.50
26+27	1.37	1.62	1.79	1.48	1.51	1.57
27+28	1.37	1.59	1.88	1.43	1.52	1.52
28+29	1.40	1.76	1.79	1.33	1.47	1.51
29+30	1.40	1.74	0.60	1.41	1.49	1.61
30+31	1.32	1.55	0.80	1.38	1.53	1.58
31+32	1.32	1.56	1.15	1.36	1.51	1.55
32+33	1.33	1.63	2.15	1.39	1.44	1.72
33+34	1.36	1.63	1.95	1.35	1.42	1.59
34+35	1.40	1.54	1.35	1.36	1.53	1.44
35+36	1.30	1.51	0.95	1.27	1.48	1.41
36+37	1.31	1.53	0.94	1.26	1.51	1.41
37+38	1.23	1.51	1.46	1.24	1.48	1.31
38+39	1.22	1.63	1.72	1.17	1.42	1.42
39+40	1.24	1.58	1.49	1.19	1.31	1.33
40+41	1.24	1.42	1.39	1.20	1.30	1.35
41+42	1.17	1.38	1.74	1.20	1.34	1.33
42+43	1.15	1.36	1.69	1.15	1.33	1.32
43+44	1.17	1.50	2.14	1.14	1.26	1.27
44+45	1.16	1.41	1.57	1.17	1.22	1.29
45+46	1.17	1.34	1.74	1.13	1.22	1.27

ANHANG

betrachtete Peaks	YMC_012_ M001	YMC_012_ M002	YMC_012_ M003	YMC_012_ M004	YMC_012_ M005	YMC_012_ M006
46+47	1.07	1.22	1.69	1.13	1.22	1.29
47+48	1.00	1.35	1.70	1.10	1.18	1.30
48+49	0.98	1.33	1.72	1.05	1.18	1.24
49+50	0.95	1.39	1.65	0.97	1.25	1.22
50+51	1.01	1.25	1.72	0.95	1.18	1.22
51+52	0.93	1.26	1.69	0.95	1.18	1.26
52+53	0.96	1.40	1.53	0.93	1.17	1.27
53+54	1.03	1.25	1.59	0.91	1.24	1.27
54+55	1.17	1.38	1.98	0.93	1.24	1.23
55+56	1.19	1.32	1.61	0.99	1.20	1.28
56+57	0.99	1.20	1.60	1.01	1.19	1.27
57+58	0.94	1.48	1.92	1.11	1.19	1.29
58+59	0.92	1.67	1.60	1.20	1.19	1.24
59+60	0.91	1.52	1.65	1.17	1.19	1.21
60+61	1.01	1.50	1.63	1.17	1.19	1.28
61+62	1.12	-	2.24	1.20	1.17	1.31
62+63	1.35	-	0.44	1.11	1.17	1.30
63+64	1.34	-	0.55	1.15	1.22	1.33
64+65	1.10	-	0.29	1.17	1.18	1.35
65+66	0.91	-	0.71	1.18	1.23	1.33
66+67	0.93	-	-	1.15	1.23	1.27
67+68	1.02	-	-	1.24	1.35	1.28
68+69	1.22	-	-	1.18	1.26	1.33
69+70	1.51	-	-	1.32	1.30	1.37
70+71	1.48	-	-	1.05	1.32	1.31
71+72	1.71	-	-	1.28	1.17	1.39
72+73	2.03	-	-	1.23	1.34	1.34
73+74	1.45	-	-	1.19	1.45	1.33
74+75	-	-	-	1.38	1.47	1.31
75+76	-	-	-	-	1.41	1.56
76+77	-	-	-	-	-	1.27
77+78	-	-	-	-	-	1.94
78+79	-	-	-	-	-	1.56
79+80	-	-	-	-	-	3.46
80+81	-	-	-	-	-	1.29
81+82	-	-	-	-	-	0.55

ANHANG

Tab. 8-14: Berechnete Auflösungen für PEG 3000 vermessen mit den Methoden YMC_012_M002f bis YMC_012_M010f. Grau hinterlegte Werte liegen außerhalb des akzeptablen Bereichs ($1.0 < R_s < 4.0$), hellgrau hinterlegte Werte liegen außerhalb des Idealbereiches ($1.4 < R_s < 3.0$), aber innerhalb des akzeptablen Bereichs. Erhöhung der Flussrate auf 1.0 ml/min („f“). Modifikation der Gradientensteilheit des für höhere Oligomere relevanten Gradienten (30 % ACN auf 32.5 %) über Variation der Gradientendauer: 5 min (M002f), 7.5 min (M005f), 10 min (M006f), 12.5 min (M007f), 15 min (M008f), 25 min (M009f) und 40 min (M010f).

betrachtete Peaks	YMC_012_M002f	YMC_012_M005f	YMC_012_M006f	YMC_012_M007f	YMC_012_M008f	YMC_012_M009f	YMC_012_M010f
1+2	6.16	2.77	6.07	2.07	3.25	3.15	2.99
2+3	2.73	2.96	2.54	2.05	2.86	2.82	3.02
3+4	2.57	2.62	2.14	2.12	2.72	2.75	3.05
4+5	2.25	2.43	2.28	1.96	2.64	2.62	2.77
5+6	2.05	2.67	2.42	1.79	2.41	2.46	2.55
6+7	2.27	2.55	2.30	1.68	2.43	2.45	2.43
7+8	2.24	2.37	2.09	1.67	2.42	2.25	2.32
8+9	2.08	2.23	1.99	1.73	2.41	2.14	2.28
9+10	2.01	2.09	1.88	1.56	2.28	2.07	2.22
10+11	1.91	1.94	1.74	1.59	2.18	1.92	2.13
11+12	1.80	1.86	1.73	1.56	2.17	1.72	1.99
12+13	1.74	1.79	1.68	1.51	2.05	1.69	1.92
13+14	1.64	1.80	1.61	1.47	1.91	1.65	1.83
14+15	1.53	1.73	1.55	1.41	1.80	1.67	1.78
15+16	1.52	1.59	1.53	1.36	1.79	1.64	1.68
16+17	1.50	1.52	1.48	1.35	1.72	1.54	1.64
17+18	1.44	1.48	1.43	1.35	1.59	1.49	1.59
18+19	1.45	1.46	1.41	1.35	1.50	1.47	1.50
19+20	1.40	1.44	1.35	1.31	1.48	1.48	1.46
20+21	1.36	1.36	1.38	1.30	1.48	1.44	1.41
21+22	1.37	1.37	1.36	1.35	1.47	1.43	1.38
22+23	1.35	1.36	1.32	1.28	1.44	1.42	1.36
23+24	1.30	1.39	1.27	1.25	1.44	1.35	1.38
24+25	1.29	1.38	1.30	1.28	1.40	1.33	1.39
25+26	1.28	1.34	1.33	1.29	1.39	1.34	1.42
26+27	1.28	1.34	1.29	1.29	1.41	1.44	1.46
27+28	1.29	1.31	1.31	1.30	1.36	1.44	1.40
28+29	1.30	1.34	1.31	1.29	1.36	1.31	1.35
29+30	1.27	1.35	1.21	1.27	1.38	1.40	1.44
30+31	1.25	1.30	1.28	1.25	1.36	1.41	1.36
31+32	1.26	1.26	1.30	1.28	1.30	1.45	1.38
32+33	1.27	1.28	1.32	1.25	1.27	1.38	1.40
33+34	1.27	1.30	1.31	1.29	1.35	1.35	1.35
34+35	1.23	1.31	1.26	1.28	1.37	1.26	1.45
35+36	1.27	1.28	1.27	1.27	1.41	1.38	1.44
36+37	1.24	1.25	1.28	1.32	1.34	1.33	1.41
37+38	1.21	1.29	1.29	1.29	1.34	1.30	1.42
38+39	1.21	1.26	1.25	1.27	1.31	1.30	1.36
39+40	1.24	1.29	1.21	1.18	1.32	1.30	1.30
40+41	1.21	1.24	1.22	1.18	1.30	1.29	1.30
41+42	1.17	1.22	1.22	1.21	1.32	1.26	1.30
42+43	1.18	1.21	1.25	1.21	1.27	1.24	1.25
43+44	1.20	1.17	1.20	1.19	1.23	1.22	1.21
44+45	1.18	1.20	1.10	1.19	1.17	1.14	1.13
45+46	1.03	1.20	1.05	1.14	1.09	1.09	1.11

ANHANG

betrachtete Peaks	YMC_012 _M002f	YMC_012 _M005f	YMC_012 _M006f	YMC_012 _M007f	YMC_012 _M008f	YMC_012 _M009f	YMC_012 _M010f
46+47	0.94	1.16	1.03	1.09	1.03	1.09	1.09
47+48	0.89	1.10	0.99	1.04	0.99	1.04	1.05
48+49	0.86	1.04	0.98	1.00	0.99	1.02	1.02
49+50	0.85	0.98	0.98	1.00	0.93	1.03	1.04
50+51	0.83	0.94	0.95	0.98	0.94	1.03	1.03
51+52	0.84	0.93	0.93	0.98	0.95	1.05	1.04
52+53	0.83	0.92	0.93	0.99	0.93	1.05	1.04
53+54	0.81	0.92	0.97	0.99	0.92	1.04	1.05
54+55	0.85	0.90	0.96	0.99	0.91	1.05	1.02
55+56	0.87	0.91	1.01	0.98	0.94	1.07	1.07
56+57	0.88	0.93	1.07	1.06	0.94	1.13	1.11
57+58	0.90	0.94	1.14	1.17	0.95	1.21	1.18
58+59	0.97	0.94	1.18	1.24	0.97	1.27	1.30
59+60	1.10	1.04	1.15	1.20	1.02	1.24	1.30
60+61	1.20	1.12	1.19	1.26	1.10	1.23	1.24
61+62	1.20	1.20	1.21	1.25	1.13	1.22	1.33
62+63	1.19	1.15	1.25	1.21	1.17	1.32	1.36
63+64	1.19	1.25	1.21	1.44	1.22	1.32	1.37
64+65	1.22	1.23	1.24	1.32	1.17	1.31	1.25
65+66	1.23	1.16	1.24	1.17	1.18	1.40	1.47
66+67	1.25	1.17	1.27	1.31	1.23	1.41	1.43
67+68	1.29	1.23	1.22	1.40	1.24	1.45	1.53
68+69	1.32	1.25	1.26	1.20	1.29	1.38	1.56
69+70	1.48	1.24	1.31	1.19	1.30	1.41	1.77
70+71	1.41	1.32	1.38	1.26	1.23	1.32	1.63
71+72	1.53	1.43	1.85	1.23	1.19	1.46	1.73
72+73	1.45	1.61	1.36	-	1.00	1.68	1.62
73+74	1.52	1.55	1.41	-	1.33	1.68	1.73
74+75	1.30	1.60	-	-	1.46	1.49	1.72
75+76	1.18	0.78	-	-	1.70	1.72	1.46
76+77	0.75	-	-	-	-	-	1.42

ANHANG

Tab. 8-15: Zusammenfassung der für PEG 300 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse.

<i>n</i>	<i>m/z</i>
3	152.1 (<i>z</i> = 1); 173.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
4	196.1 (<i>z</i> = 1); 217.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
5	239.6 (<i>z</i> = 1); 261.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
6	283.3 (<i>z</i> = 1); 305.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
7	327.2 (<i>z</i> = 1); 344.3 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 349.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
8	371.2 (<i>z</i> = 1); 388.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.)
9	415.8 (<i>z</i> = 1); 432.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.)
10	459.5 (<i>z</i> = 1); 476.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.)
11	520.7 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.)
12	564.4 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 274.0 (<i>z</i> = 2)
13	608.5 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 613.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 318.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
14	652.4 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 657.1 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 340.7 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
15	696.4 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 360.5 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.)
16	371.8 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.)

ANHANG

Tab. 8-16: Zusammenfassung der für PEG 400 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse.

<i>n</i>	<i>m/z</i>
4	195.8 (z = 1); 217.9 (z = 1; Natrium-Add.)
5	239.4 (z = 1); 261.6 (z = 1; Natrium-Add.)
6	283.3 (z = 1); 300.4 (z = 1; Wasser-Add.); 305.3 (z = 1; Natrium-Add.)
7	327.7 (z = 1); 344.6 (z = 1; Wasser-Add.); 349.5 (z = 1; Natrium-Add.)
8	388.8 (z = 1; Wasser-Add.); 394.1 (z = 1; Natrium-Add.)
9	415.9 (z = 1); 432.8 (z = 1; Wasser-Add.); 460.8 (z = 1; AS-Add.)
10	459.7 (z = 1); 476.8 (z = 1; Wasser-Add.)
11	503.4 (z = 1); 520.7 (z = 1; Wasser-Add.); 525.1 (z = 1; Natrium-Add.);
12	252.2 (z = 2)
13	547.3 (z = 1); 564.8 (z = 1; Wasser-Add.); 569.3 (z = 1; Natrium-Add.);
14	274.2 (z = 2)
15	608.7 (z = 1; Wasser-Add.); 613.3 (z = 1; Natrium-Add.);
16	296.3 (z = 2); 307.9 (z = 2; Wasser-Add.); 318.8 (z = 2; ACN-Add.)
17	652.5 (z = 1; Wasser-Add.); 657.2 (z = 1; Natrium-Add.);
18	326.7 (z = 2; Wasser-Add.); 330.2 (z = 2; Natrium-Add.); 340.6 (z = 2; ACN-Add.)
19	696.3 (z = 1; Wasser-Add.); 701.3 (z = 1; Natrium-Add.);
20	341.0 (z = 2); 349.6 (z = 2; Wasser-Add.); 358.1 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 352.2 (z = 2, Natrium-Add.); 362.6 (z = 2; ACN-Add.)

Tab. 8-17: Zusammenfassung der für PEG 600 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse.

<i>n</i>	<i>m/z</i>
4	195.5 (z = 1)
5	239.2 (z = 1); 261.8 (z = 1; Natrium-Add.)
6	283.1 (z = 1); 305.6 (z = 1; Natrium-Add.)
7	344.7 (z = 1; Wasser-Add.); 349.6 (z = 1; Natrium-Add.)
8	388.8 (z = 1; Wasser-Add.); 393.4 (z = 1; Natrium-Add.)
9	416.0 (z = 1); 433.0 (z = 1; Wasser-Add.); 437.5 (z = 1; Natrium-Add.)
10	459.8 (z = 1); 477.0 (z = 1; Wasser-Add.); 481.6 (z = 1; Natrium-Add.)
11	503.7 (z = 1); 520.9 (z = 1; Wasser-Add.); 525.5 (z = 1; Natrium-Add.)
12	547.9 (z = 1); 564.9 (z = 1; Wasser-Add.); 569.4 (z = 1; Natrium-Add.); 274.0 (z = 2); 291.1 (z = 2; 2x Wasser-Add.)
13	591.5 (z = 1); 608.8 (z = 1; Wasser-Add.); 613.4 (z = 1; Natrium-Add.); 296.8 (z = 2); 307.7 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 319.3 (z = 2; 2x Natrium-Add.); 318.7 (z = 2; ACN-Add.)

ANHANG

<i>n</i>	<i>m/z</i>
14	652.8 (z = 1; Wasser-Add.); 657.4 (z = 1; Natrium-Add.); 318.7 (z = 2); 327.1 (z = 2; Wasser-Add.); 330.0 (z = 2; Natrium-Add.); 340.7 (z = 2; ACN-Add.)
15	696.8 (z = 1; Wasser-Add.); 701.4 (z = 1; Natrium-Add.); 340.9 (z = 2); 349.6 (z = 2; Wasser-Add.); 352.1 (z = 2; Natrium-Add.); 363.5 (z = 2; 2x Natrium-Add.)
16	740.8 (z = 1; Wasser-Add.); 745.5 (z = 1; Natrium-Add.); 362.8 (z = 2); 371.6 (z = 2; Wasser-Add.); 374.0 (z = 2; Natrium-Add.); 385.5 (z = 2; 2x Natrium-Add.); 384.7 (z = 2; ACN-Add.)
17	784.5 (z = 1; Wasser-Add.); 789.4 (z = 1; Natrium-Add.); 384.9 (z = 2); 393.6 (z = 2; Wasser-Add.); 402.2 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 396.0 (z = 2; Natrium-Add.); 406.9 (z = 2; 2x Natrium-Add.)
18	828.5 (z = 1; Wasser-Add.); 833.5 (z = 1; Natrium-Add.); 407.5 (z = 2); 415.5 (z = 2; Wasser-Add.); 426.4 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 418.2 (z = 2; Natrium-Add.)
19	872.5 (z = 1; Wasser-Add.); 877.5 (z = 1; Natrium-Add.); 429.1 (z = 2); 437.6 (z = 2; Wasser-Add.); 448.1 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 439.9 (z = 2; Natrium-Add.)
20	916.5 (z = 1; Wasser-Add.); 921.5 (z = 1; Natrium-Add.); 451.2 (z = 2); 459.5 (z = 2; Wasser-Add.); 468.4 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 462.3 (z = 2; Natrium-Add.)
21	944.1 (z = 1); 960.5 (z = 1; Wasser-Add.); 965.5 (z = 1; Natrium-Add.); 473.0 (z = 2); 481.3 (z = 2; Wasser-Add.); 490.2 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 484.2 (z = 2; Natrium-Add.); 493.0 (z = 2; ACN-Add.)
22	1004.7 (z = 1; Wasser-Add.); 1009.6 (z = 1; Natrium-Add.); 495.0 (z = 2); 512.5 (z = 2; 2x Wasser-Add.)
23	1048.7 (z = 1; Wasser-Add.); 1053.5 (z = 1; Natrium-Add.); 516.8 (z = 2); 533.9 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 353.1 (z = 3; 2x Wasser-Add.)
24	1092.7 (z = 1; Wasser-Add.); 1097.7 (z = 1; Natrium-Add.); 538.7 (z = 2); 547.0 (z = 2; Wasser-Add.); 555.9 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 372.9 (z = 3; 2x Wasser-Add.)
25	1119.7 (z = 1); 1136.8 (z = 1; Wasser-Add.); 1141.5 (z = 1; Natrium-Add.); 560.6 (z = 2); 579.9 (z = 2; 2x Wasser-Add.)
26	1180.8 (z = 1; Wasser-Add.); 583.0 (z = 2); 599.5 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 401.4 (z = 3; 2x Wasser-Add.)
27	604.8 (z = 2); 621.6 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 403.7 (z = 3); 414.7 (z = 3; Natrium-Add.)
28	643.8 (z = 2; 2x Wasser-Add.)
29	670.5 (z = 2; ACN-Add.)
30	692.4 (z = 2; ACN-Add.)
31	714.4 (z = 2; ACN-Add.)
32	736.4 (z = 2; ACN-Add.)

ANHANG

Tab. 8-18: Zusammenfassung der für PEG 1000 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse.

<i>n</i>	<i>m/z</i>
3	173.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
4	196.1 (<i>z</i> = 1); 217.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
5	239.4 (<i>z</i> = 1); 261.9 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
6	284.2 (<i>z</i> = 1); 305.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
7	328.1 (<i>z</i> = 1); 349.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
8	372.1 (<i>z</i> = 1); 388.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 393.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
9	433.0 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 437.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
10	476.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 481.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
11	521.1 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 525.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
12	564.7 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 569.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
13	608.7 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 613.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 318.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
14	652.7 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 657.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 326.7 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 341.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
15	696.7 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 701.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 348.8 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 353.1 (<i>z</i> = 2; Natrium-Add.); 362.8 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.)
16	740.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 745.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 362.9 (<i>z</i> = 2); 370.7 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 374.1 (<i>z</i> = 2; Natrium-Add.); 384.9 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
17	784.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 789.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 384.7 (<i>z</i> = 2); 393.3 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 395.9 (<i>z</i> = 2; Natrium-Add.); 406.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 407.5 (<i>z</i> = 2; AS-Add.)
18	828.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 833.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 407.0 (<i>z</i> = 2); 415.6 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 423.8 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 418.0 (<i>z</i> = 2; Natrium- Add.); 426.6 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 429.0 (<i>z</i> = 2; AS-Add.)
19	872.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 877.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 429.0 (<i>z</i> = 2); 437.7 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 445.6 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 440.2 (<i>z</i> = 2; Natrium- Add.); 448.5 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 450.9 (<i>z</i> = 2; AS-Add.)
20	916.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 921.7 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 451.0 (<i>z</i> = 2); 460.0 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 468.5 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 462.1 (<i>z</i> = 2; Natrium- Add.); 472.7 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 243.3 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.)
21	960.8 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 965.7 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 473.3 (<i>z</i> = 2); 481.5 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 489.8 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 484.0 (<i>z</i> = 2; Natrium- Add.); 494.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
22	1004.7 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1009.7 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 495.1 (<i>z</i> = 2); 511.7 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 505.9 (<i>z</i> = 2; Natrium-Add.); 517.0 (<i>z</i> = 2; ACN- Add.)

ANHANG

<i>n</i>	<i>m/z</i>
23	1048.8 (z = 1; Wasser-Add.); 1053.7 (z = 1; Natrium-Add.); 517.3 (z = 2); 525.6 (z = 2; Wasser-Add.); 534.0 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 528.2 (z = 2; Natrium-Add.) 350.6 (z = 3; Wasser-Add.); 356.9 (z = 3; 3x Wasser-Add.)
24	1092.7 (z = 1; Wasser-Add.); 1097.7 (z = 1; Natrium-Add.); 539.1 (z = 2); 556.1 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 365.0 (z = 3; Wasser-Add.); 370.6 (z = 3; Natrium-Add.); 382.3 (z = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
25	1136.6 (z = 1; Wasser-Add.); 1141.8 (z = 1; Natrium-Add.); 561.4 (z = 2); 569.8 (z = 2; Wasser-Add.); 577.9 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 385.2 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 396.7 (z = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
26	1180.6 (z = 1; Wasser-Add.); 1185.6 (z = 1; Natrium-Add.); 1201.8 (z = 1; ACN-Add.); 583.1 (z = 2); 591.6 (z = 2; Wasser-Add.); 600.2 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 604.6 (z = 2; ACN-Add.); 613.6 (z = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 396.4 (z = 3; Wasser-Add.); 400.2 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 414.7 (z = 3; [2xWasser+ACN]-Add.); 411.5 (z = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
27	1229.8 (z = 1; Natrium-Add.); 1245.9 (z = 1; ACN-Add.); 605.0 (z = 2); 622.2 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 643.2 (z = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 415.0 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 418.6 (z = 3; ACN-Add.); 430.1 (z = 3; [2xWasser+ACN]-Add.); 426.3 (z = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
28	1269.0 (z = 1; Wasser-Add.); 1273.7 (z = 1; Natrium-Add.); 1289.9 (z = 1; ACN-Add.); 627.0 (z = 2); 644.2 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 424.9 (z = 3; Wasser-Add.); 430.0 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 437.5 (z = 3; 3x Wasser-Add.); 440.7 (z = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
29	1317.9 (z = 1; Natrium-Add.); 649.0 (z = 2); 657.4 (z = 2; Wasser-Add.); 666.2 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 445.0 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 450.4 (z = 3; 2x Natrium-Add.); 455.4 (z = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
30	1357.1 (z = 1; Wasser-Add.); 1361.7 (z = 1; Natrium-Add.); 670.8 (z = 2); 688.3 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 692.6 (z = 2; ACN-Add.); 455.6 (z = 3; Wasser-Add.); 459.7 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 464.4 (z = 3; 2x Natrium-Add.); 462.8 (z = 3; ACN-Add.); 468.6 (z = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
31	1406.0 (z = 1; Natrium-Add.); 692.7 (z = 2); 710.3 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 714.7 (z = 2; ACN-Add.); 731.4 (z = 3; [2xWasser+ACN]-Add.); 474.2 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 479.0 (z = 3; 2x Natrium-Add.); 494.9 (z = 3; 2x AS-Add.); 482.9 (z = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 484.6 (z = 3; [ACN+Natrium]-Add.); 369.6 (z = 4; 2x ACN-Add.)
32	1450.0 (z = 1; Natrium-Add.); 732.1 (z = 2; 2x Wasser-Add.); 736.6 (z = 2; ACN-Add.); 753.5 (z = 3; [2x Wasser+ACN]-Add.); 488.4 (z = 3; 2x Wasser-Add.); 496.1 (z = 3; 3x Wasser-Add.); 493.6 (z = 3; 2x Natrium-Add.); 492.0 (z = 3; ACN-Add.); 497.5 (z = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 509.8 (z = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 499.1 (z = 3; [ACN+Natrium]-Add.); 512.2 (z = 3; [2x ACN+Natrium]-Add.)

ANHANG

<i>n</i>	<i>m/z</i>
33	1472.0 (<i>z</i> = 1); 1489.2 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1494.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 753.9 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 758.6 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 775.7 (<i>z</i> = 3; [2x Wasser+ACN]-Add.); 491.9 (<i>z</i> = 3); 510.9 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 508.4 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 512.3 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
34	1518.2 (<i>z</i> = 1); 1537.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 775.8 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 780.5 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 506.9 (<i>z</i> = 3); 525.7 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 523.0 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 526.9 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 528.7 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.); 394.6 (<i>z</i> = 4; 2x Natrium-Add.); 404.1 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 417.3 (<i>z</i> = 4; 3x AS-Add.)
35	797.7 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 802.7 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 528.7 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 540.1 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 538.8 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 597.7 (<i>z</i> = 3; 2x AS-Add.); 541.4 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
36	819.6 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 827.3 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 846.5 (<i>z</i> = 2; 2x ACN-Add.); 536.1 (<i>z</i> = 3); 554.6 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 545.2 (<i>z</i> = 3; Natrium-Add.); 568.6 (<i>z</i> = 3; 2x AS- Add.); 556.1 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 583.5 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+AS]-Add.); 572.9 (<i>z</i> = 3; [2x ACN+Natrium]-Add.)
37	842.0 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 846.4 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 866.2 (<i>z</i> = 2; 2x ACN-Add.); 570.8 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 582.6 (<i>z</i> = 3; 2x AS-Add.); 587.4 (<i>z</i> = 3; [Wasser+2x AS]-Add.); 586.0 (<i>z</i> = 3; [2x ACN+Natrium]-Add.); 489.4 (<i>z</i> = 4; [4x ACN+3x AS]-Add.); 353.0 (<i>z</i> = 5; 2x AS-Add.)
38	890.5 (<i>z</i> = 2; 2x ACN-Add.); 885.3 (<i>z</i> = 2; [2x Wasser+ACN]-Add.); 880.7 (<i>z</i> = 2; [Wasser+AS]- Add.); 584.2 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 474.7 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x AS]-Add.); 309.5 (<i>z</i> = 6; [2x ACN+2x Natrium]-Add.)
39	901.9 (<i>z</i> = 2; [ACN+Natrium]-Add.); 598.8 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 489.5 (<i>z</i> = 4; [Wasser+AS]-Add.)
40	617.4 (<i>z</i> = 3; [ACN+AS]-Add.)
41	n/a
42	965.5 (<i>z</i> = 2; [Wasser+ACN]-Add.)
43	978.7 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)

ANHANG

Tab. 8-19: Zusammenfassung der für PEG 1500 bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse.

<i>n</i>	<i>m/z</i>
10	477.0 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.)
11	521.0 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 526.1 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
12	565.0 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 570.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 273.9 (<i>z</i> = 2)
13	608.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 613.9 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
14	653.0 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 658.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
15	696.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 702.1 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.)
16	721.8 (<i>z</i> = 1); 740.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 746.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 363.1 (<i>z</i> = 2)
17	785.1 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 789.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 393.8 (<i>z</i> = 2); 407.0 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.)
18	830.1 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 834.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 415.7 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 429.2 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.)
19	872.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 877.9 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 438.0 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 451.2 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.)
20	900.0 (<i>z</i> = 1); 916.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 921.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 459.9 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 473.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
21	960.9 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 965.8 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 490.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 495.1 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 494.7 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
22	1005.2 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1010.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 504.7 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 512.0 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 517.4 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 516.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
23	1049.0 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1054.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 534.0 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 538.9 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.)
24	1098.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 538.8 (<i>z</i> = 2); 556.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 561.5 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 558.5 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 382.1 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
25	1142.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 578.0 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 582.9 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 580.4 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 397.0 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
26	1181.2 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1186.0 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 583.1 (<i>z</i> = 2); 600.0 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 605.0 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 602.5 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 411.4 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
27	1225.0 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1230.1 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 605.3 (<i>z</i> = 2); 624.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 627.1 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 426.3 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
28	1252.2 (<i>z</i> = 1); 1269.3 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1274.1 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 627.0 (<i>z</i> = 2); 646.3 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 648.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 432.3 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 441.0 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.)

ANHANG

<i>n</i>	<i>m/z</i>
29	1296.1 (<i>z</i> = 1); 1318.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 649.0 (<i>z</i> = 2); 666.6 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 671.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 687.2 (<i>z</i> = 2; [2x Wasser+ACN]-Add.); 445.1 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 448.1 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 455.2 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
30	1362.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 671.0 (<i>z</i> = 2); 688.5 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 671.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 459.6 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 468.2 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 470.1 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
31	1406.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1422.1 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 692.9 (<i>z</i> = 2); 710.4 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 715.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 475.6 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 484.5 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 485.1 (<i>z</i> = 3; [ACN+Natrium]-Add.)
32	1450.2 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1466.1 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 732.4 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 737.1 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 490.5 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 499.2 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
33	1494.3 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 754.1 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 756.3 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 499.4 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 504.0 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 506.6 (<i>z</i> = 3; ACN-Add.); 514.0 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.)
34	1538.1 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1554.2 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 776.3 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 781.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 514.1 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 525.6 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 523.7 (<i>z</i> = 3; ACN-Add.); 528.8 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 403.3 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.)
35	1582.3 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1598.3 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 800.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 803.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 528.9 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 534.3 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 540.2 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 538.4 (<i>z</i> = 3; ACN-Add.); 541.9 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 414.0 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 420.1 (<i>z</i> = 4; [2x ACN+Natrium]-Add.)
36	1626.4 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1642.3 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 820.3 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 824.7 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 543.3 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 549.1 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 555.2 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 553.0 (<i>z</i> = 3; ACN-Add.); 558.0 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 424.6 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.)
37	1670.4 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1686.3 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 833.6 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 842.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 551.0 (<i>z</i> = 3); 562.4 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 569.5 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 567.7 (<i>z</i> = 3; ACN-Add.); 571.2 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 435.9 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.)
38	1714.4 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1730.4 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 864.0 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 868.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 565.0 (<i>z</i> = 3); 578.3 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 585.5 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 587.3 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 439.0 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 446.9 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.)

ANHANG

<i>n</i>	<i>m/z</i>
39	1758.7 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1774.4 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 886.0 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 890.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 580.2 (<i>z</i> = 3); 600.1 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 597.1 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 602.2 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 444.5 (<i>z</i> = 4; 2x Wasser-Add.); 457.6 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.)
40	1802.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1820.5 (<i>z</i> = 1; ACN-Add.); 907.9 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 912.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 594.9 (<i>z</i> = 3); 602.0 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 608.0 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 613.6 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 611.7 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 616.7 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 456.6 (<i>z</i> = 4; 2x Wasser-Add.); 468.5 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 479.6 (<i>z</i> = 4; 3x ACN-Add.)
41	1846.4 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 930.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 935.1 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 943.8 (<i>z</i> = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 609.4 (<i>z</i> = 3); 628.4 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 626.3 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 471.7 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 479.8 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.)
42	1885.7 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1890.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 952.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 957.1 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 965.8 (<i>z</i> = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 623.9 (<i>z</i> = 3); 644.1 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 641.1 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 645.9 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 483.1 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 490.7 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.)
43	1935.5 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 976.7 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 979.1 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 978.9 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 638.6 (<i>z</i> = 3); 657.6 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 655.7 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 660.7 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 670.2 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 494.8 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 501.6 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 502.4 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 507.8 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.)
44	1974.4 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 1978.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 996.1 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 1001.2 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 999.2 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 1009.8 (<i>z</i> = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 653.3 (<i>z</i> = 3); 673.5 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 670.5 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 675.7 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 684.8 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 499.5 (<i>z</i> = 4; Wasser-Add.); 512.7 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 513.1 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 518.7 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.)
45	2001.6 (<i>z</i> = 1); 2018.1 (<i>z</i> = 1; Wasser-Add.); 2023.6 (<i>z</i> = 1; Natrium-Add.); 1008.8 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 1023.5 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 1022.9 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 667.9 (<i>z</i> = 3); 685.1 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 690.3 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 699.5 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 505.4 (<i>z</i> = 4); 512.6 (<i>z</i> = 4; 2x Wasser-Add.); 516.0 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 523.7 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 529.9 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.)

ANHANG

<i>n</i>	<i>m/z</i>
46	2045.6 (<i>z</i> = 1); 1021.1 (<i>z</i> = 2); 1031.9 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 1045.1 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 1043.2 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 1054.1 (<i>z</i> = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 682.5 (<i>z</i> = 3); 694.9 (<i>z</i> = 3; 2x Wasser-Add.); 699.8 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 702.9 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 714.1 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 524.5 (<i>z</i> = 4; 2x Wasser-Add.); 527.9 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 534.4 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 521.2 (<i>z</i> = 4; Natrium-Add.); 540.7 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.)
47	1042.2 (<i>z</i> = 2); 1054.1 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 1062.2 (<i>z</i> = 2; 2x Wasser-Add.); 1067.0 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 699.8 (<i>z</i> = 3); 705.0 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 716.7 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 715.6 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 714.5 (<i>z</i> = 3; FA-Add.); 718.5 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 728.8 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 534.6 (<i>z</i> = 4; 2x Wasser-Add.); 537.8 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 542.9 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 545.8 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 551.6 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.)
48	1067.2 (<i>z</i> = 2); 1076.2 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 1089.1 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 1086.8 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 1092.7 (<i>z</i> = 2; AS-Add.); 1097.9 (<i>z</i> = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 711.9 (<i>z</i> = 3); 729.7 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 729.2 (<i>z</i> = 3; FA-Add.); 732.2 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 743.6 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 541.9 (<i>z</i> = 4; Wasser-Add.); 546.0 (<i>z</i> = 4; 2x Wasser-Add.); 550.9 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 556.4 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 557.6 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 562.5 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.)
49	1086.9 (<i>z</i> = 2); 1111.4 (<i>z</i> = 2; ACN-Add.); 726.9 (<i>z</i> = 3); 734.1 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 745.9 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 744.4 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 758.1 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 545.9 (<i>z</i> = 4); 557.1 (<i>z</i> = 4; 2x Wasser-Add.); 554.3 (<i>z</i> = 4; Natrium-Add.); 567.3 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 573.5 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.); 564.9 (<i>z</i> = 4; [2x Wasser+ACN]-Add.)
50	1119.9 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 1134.4 (<i>z</i> = 2; 2x Natrium-Add.); 1152.2 (<i>z</i> = 2; 2x ACN-Add.); 741.1 (<i>z</i> = 3); 760.1 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 761.6 (<i>z</i> = 3; [Wasser+ACN]-Add.); 773.1 (<i>z</i> = 3; [3x Wasser+ACN]-Add.); 556.7 (<i>z</i> = 4); 571.9 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 577.2 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 656.0 (<i>z</i> = 4; Natrium-Add.); 578.8 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 584.6 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.); 576.1 (<i>z</i> = 4; [2x Wasser+ACN]-Add.); 467.8 (<i>z</i> = 5; 5x Wasser-Add.)
51	1156.1 (<i>z</i> = 2; AS-Add.); 758.4 (<i>z</i> = 3); 774.0 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 773.3 (<i>z</i> = 3; 2x Natrium-Add.); 588.1 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 576.6 (<i>z</i> = 4; Natrium-Add.); 589.1 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 595.4 (<i>z</i> = 4; [Wasser+2x ACN]-Add.); 607.4 (<i>z</i> = 4; [2x Wasser+3x ACN]-Add.); 477.6 (<i>z</i> = 5; 5x Wasser-Add.)

ANHANG

<i>n</i>	<i>m/z</i>
52	1164.0 (<i>z</i> = 2; Wasser-Add.); 773.3 (<i>z</i> = 3); 778.7 (<i>z</i> = 3; Wasser-Add.); 789.8 (<i>z</i> = 3; 3x Wasser-Add.); 594.1 (<i>z</i> = 4; 3x Wasser-Add.); 599.5 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 587.4 (<i>z</i> = 4; Natrium-Add.); 600.5 (<i>z</i> = 4; 2x ACN-Add.); 618.7 (<i>z</i> = 4; [2x Wasser+3x ACN]-Add.); 488.9 (<i>z</i> = 5; [5x Wasser+Natrium]-Add.)
53	1207.2 (<i>z</i> = 2; [Wasser+ACN]-Add.); 787.9 (<i>z</i> = 3); 610.1 (<i>z</i> = 4; 4x Wasser-Add.); 598.3 (<i>z</i> = 4; Natrium-Add.); 634.2 (<i>z</i> = 4; 4x ACN-Add.)
54	811.2 (<i>z</i> = 3; Natrium-Add.); 608.2 (<i>z</i> = 4; Natrium-Add.)

ANHANG

Tab. 8-20: Potentielle Abbauprodukte der Ölsäure [164-170, 172].

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{13} [g/mol]	Art der Entstehung
Ölsäure	O-1		282.47	-
(Z)-8-Hydroperoxyoctadec-9-ensäure	O-2a		314.47	Autoxidation
(Z)-10-Hydroperoxyoctadec-8-ensäure	O-2b		314.47	Autoxidation
(Z)-11-Hydroperoxyoctadec-9-ensäure	O-2c		314.47	Autoxidation
(Z)-9-Hydroperoxyoctadec-10-ensäure	O-2d		314.47	Autoxidation

¹³ Molare Masse ermittelt mittels ChemDraw

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{13} [g/mol]	Art der Entstehung
(E)-10-Hydroperoxyoctadec-8-ensäure	O-3a		314.47	Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff (1O_2); <i>oder</i> Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3b
(E)-9-Hydroperoxyoctadec-10-ensäure	O-3b		314.47	Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff (1O_2); <i>oder</i> Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3a
(E)-11-Hydroperoxyoctadec-9-ensäure	O-3c		314.47	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3a
(E)-8-Hydroperoxyoctadec-9-ensäure	O-3d		314.47	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3b
(E)-9-Oxooctadec-10-ensäure	O-4a		296.45	Russell-Eliminierung von O-3a aus der Photooxygenierung
(E)-10-Oxooctadec-8-ensäure	O-4b		296.45	Russell-Eliminierung von O-3b aus der Photooxygenierung; <i>oder</i> Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3a
(E)-11-Oxooctadec-9-ensäure	O-4c		296.45	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3a

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{13} [g/mol]	Art der Entstehung
(E)-8-Oxooctadec-9- ensäure	O-4d		296.45	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3b
(E)-11-Hydroxyoctadec-9- ensäure	O-5a		298.47	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3a
(E)-9-Hydroxyoctadec-10- ensäure	O-5b		298.47	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3a
(E)-8-Hydroxyoctadec-9- ensäure	O-5c		298.47	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3b
(E)-10-Hydroxyoctadec-8- ensäure	O-5d		298.47	Thermische Umsetzung (40 °C, 5 h) von O-3b
8-((2S,3R)-3-Octyloxiran- 2-yl)octansäure	O-6a		298.47	Epoxidierung mit einfachem Sauerstoff (H ₂ O ₂ , org. Peroxide, Persäuren) zu <i>cis</i> - Epoxiden; <i>oder</i> Oxidation mit Radikalen (z. B. O ₂ / Aldehyd) zu <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Epoxiden

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{13} [g/mol]	Art der Entstehung
8-((2R,3S)-3-Octyloxiran-2-yl)octansäure	O-6b		298.47	Epoxidierung mit einfachem Sauerstoff (H_2O_2 , org. Peroxide, Persäuren) zu <i>cis</i> -Epoxiden
8-((2R,3R)-3-Octyloxiran-2-yl)octansäure	O-7a		298.47	Oxidation mit Radikalen (z. B. O_2 / Aldehyd) zu <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Epoxiden
8-((2S,3S)-3-Octyloxiran-2-yl)octansäure	O-7b		298.47	Oxidation mit Radikalen (z. B. O_2 / Aldehyd) zu <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Epoxiden
(9S,10S)-9,10-Dihydroxyoctadecansäure	O-8a		316.48	metallkatalysierte hydrolytische Spaltung der <i>cis</i> -Epoxide (O-6a und O-6b) zu <i>syn</i> -Diolen. Metallische Katalysatoren: W, Re, Mo
(9R,10R)-9,10-Dihydroxyoctadecansäure	O-8b		316.48	metallkatalysierte hydrolytische Spaltung der <i>cis</i> -Epoxide (O-6a und O-6b) zu <i>syn</i> -Diolen. Metallische Katalysatoren: W, Re, Mo

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{13} [g/mol]	Art der Entstehung
(9S,10R)-9,10-Dihydroxyoctadecansäure	O-9a		316.48	metallkatalysierte hydrolytische Spaltung der <i>trans</i> -Epoxide (O-7a und O-7b) zu <i>anti</i> -Diolen. Metallische Katalysatoren: W, Re, Mo
(9R,10S)-9,10-Dihydroxyoctadecansäure	O-9b		316.48	metallkatalysierte asymmetrische Sharpless-Dihydroxylierung von O-1 zu den <i>anti</i> -Diolen. Metallische Katalysatoren: Os, Ru metallkatalysierte hydrolytische Spaltung der <i>trans</i> -Epoxide (O-7a und O-7b) zu <i>anti</i> -Diolen. Metallische Katalysatoren: W, Re, Mo
Nonanal (Pelargonaldehyd)	O-10a		142.24	metallkatalysierte asymmetrische Sharpless-Dihydroxylierung von O-1 zu den <i>anti</i> -Diolen. Metallische Katalysatoren: Os, Ru Spaltprodukt nach Umlagerung zum Diol; <i>oder</i> Umsetzung mit Ozon.
9-Oxononansäure	O-10b		172.22	Spaltprodukt nach Umlagerung zum Diol. <i>oder</i> Oxidative Spaltung via Metallkatalyse. <i>oder</i> Umsetzung mit Ozon.
Nonansäure (Pelargonsäure)	O-10c		158.24	Spaltprodukt nach Umlagerung zum Diol. <i>oder</i> Oxidative Spaltung via Metallkatalyse. <i>oder</i> Umsetzung mit Ozon.

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{13} [g/mol]	Art der Entstehung
Nonandisäure (Azelainsäure)	O-10d		188.22	Spaltprodukt nach Umlagerung zum Diol. <i>oder</i> Umsetzung mit Ozon.
Octandisäure (Korksäure, Suberinsäure)	O-10e		174.20	Spaltprodukt nach Umsetzung mit Ethen.
Ölsäure	O-1		282.47	Z-9-Isomer
(Z)-Octadec-8-ensäure	O-11a		282.47	Positionsisomerisierung von O-1 (Ölsäure) nach Hydrogenierung.
(Z)-Octadec-10-ensäure	O-11b		282.47	Positionsisomerisierung von O-1 (Ölsäure) nach Hydrogenierung.
(Z)-Octadec-7-ensäure	O-11c		282.47	Positionsisomerisierung von O-11a nach Hydrogenierung.
(Z)-Octadec-11-ensäure	O-11d		282.47	Positionsisomerisierung von O-11b nach Hydrogenierung.

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{13} [g/mol]	Art der Entstehung
Elaidinsäure	O-12		282.47	<i>E</i> -9-Isomer
(<i>E</i>)-Octadec-8-ensäure	O-12a		282.47	Sterische Isomerisierung von O-11a.
(<i>E</i>)-Octadec-10-ensäure	O-12b		282.47	Sterische Isomerisierung von O-11b.
(<i>E</i>)-Octadec-7-ensäure	O-12c		282.47	Sterisch Isomerisierung von O-11c.
(<i>E</i>)-Octadec-11-ensäure	O-12d		282.47	Sterisch Isomerisierung von O-11d.

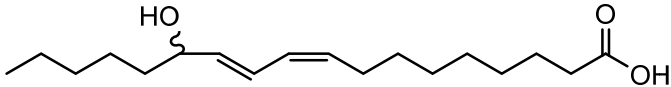
ANHANG

Tab. 8-21: Potentielle Abbauprodukte der Linolsäure [164-170, 172].

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M _r ¹⁴ [g/mol]	Art der Entstehung
Linolsäure	L-1		280.45	-
(9Z,11E)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-diensäure	L-2a		312.23	Autoxidation zu den verschiedenen Hydroperoxiden.
(9E,11E)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-diensäure	L-2b	<i>cis, trans</i>	312.23	Autoxidation zu den verschiedenen Hydroperoxiden.
(10E,12Z)-9-Hydroperoxyoctadeca-10,12-diensäure	L-2c	<i>trans, trans</i>	312.23	Autoxidation zu den verschiedenen Hydroperoxiden.
		<i>trans, cis</i>		

¹⁴ Molecular Weight ermittelt mittels ChemDraw

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(10 <i>E</i> ,12 <i>E</i>)-9-Hydroperoxyoctadeca-10,12-diensäure	L-2d		312.23	Autoxidation zu den verschiedenen Hydroperoxiden.
(10 <i>E</i> ,12 <i>E</i>)-9-Hydroperoxyoctadeca-10,12-diensäure	L-3a	<i>trans, trans</i>	312.23	Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff (1O_2)
(8 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-10-Hydroperoxyoctadeca-8,11-diensäure	L-3b		312.23	Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff (1O_2)
(9 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-12-Hydroperoxyoctadeca-9,13-diensäure	L-3c		312.23	Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff (1O_2)
(9 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-13-Hydroperoxyoctadeca-9,11-diensäure	L-3d		312.23	Photooxygenierung mit Singulett-Sauerstoff (1O_2)
(9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i>)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure	L-4a		296.45	Russell-Eliminierung; oder Bildung aus Alkoxyradikalen

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(9Z,11E)-13-Oxooctadeca-9,11-diensäure	L-4b		294.44	Russell-Eliminierung; <i>oder</i> Bildung aus Alkoxyradikalen
(S,E)-9-Hydroperoxy-11-((2S,3S)-3-pentyloxiran-2-yl)undec-10-ensäure	L-5a		328.45	Epoxidierung von L-2aS. Häufigeres Produkt.
(R,E)-9-Hydroperoxy-11-((2S,3S)-3-pentyloxiran-2-yl)undec-10-ensäure	L-5b		328.45	Epoxidierung von L-2aS. Häufigeres Produkt.
(R,Z)-11-Hydroperoxy-11-((2R,3S)-3-pentyloxiran-2-yl)undec-9-ensäure	L-5c		328.45	Epoxidierung von L-2aS. Selteneres Produkt.
(S,Z)-11-Hydroperoxy-11-((2R,3S)-3-pentyloxiran-2-yl)undec-9-ensäure	L-5d		328.45	Epoxidierung von L-2aS. Selteneres Produkt.
(S,E)-9-Hydroxy-11-((2S,3S)-3-pentyloxiran-2-yl)undec-10-ensäure	L-5e		312.45	Bildung des Alkoxyradikals (meist metallkatalysiert durch $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) aus L-5a und anschließende Übertragung eines H-Atoms (Kettenfortpflanzung).

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(<i>R,E</i>)-9-Hydroxy-11- ((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-pentyloxiran-2- yl)undec-10-ensäure	L-5f		312.45	Bildung des Alkoxyradikals (meist metallkatalysiert durch $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) aus L-5b und anschließende Übertragung eines H-Atoms (Kettenfortpflanzung).
(<i>R,Z</i>)-11-Hydroxy-11- ((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-pentyloxiran-2- yl)undec-9-ensäure	L-5g		312.45	Bildung des Alkoxyradikals (meist metallkatalysiert durch $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) aus L-5c und anschließende Übertragung eines H-Atoms (Kettenfortpflanzung).
(<i>S,Z</i>)-11-Hydroxy-11- ((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-pentyloxiran-2- yl)undec-9-ensäure	L-5h		312.45	Bildung des Alkoxyradikals (meist metallkatalysiert durch $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) aus L-5d und anschließende Übertragung eines H-Atoms (Kettenfortpflanzung).
(<i>E</i>)-9-Oxo-11-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3- pentyloxiran-2-yl)undec- 10-ensäure	L-5i		310.43	Bildung des Alkoxyradikals (meist metallkatalysiert durch $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) aus L-5a bzw. L-5b und anschließende Umlagerung zum Keton.
(<i>Z</i>)-11-Oxo-11-((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3- pentyloxiran-2-yl)undec- 9-ensäure	L-5j		310.43	Bildung des Alkoxyradikals (meist metallkatalysiert durch $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) aus L-5c bzw. L-5d und anschließende Umlagerung zum Keton.
(<i>E</i>)-11-Oxo-11-((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-3- pentyloxiran-2-yl)undec- 9-ensäure	L-5k		310.43	Bildung des Alkoxyradikals (meist metallkatalysiert durch $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) aus L-5c bzw. L-5d und anschließende Umlagerung zum Keton.

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M _r ¹⁴ [g/mol]	Art der Entstehung
8-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-3-((<i>S</i> , <i>E</i>)-2-Hydroxyoct-3-en-1-yl)oxiran-2-yl)octansäure	L-5l		312.45	Epoxidierung des <i>cis</i> -Olefins des S-Enantiomers durch Rückseitenangriff („ <i>Mihelich</i> “-Reaktion) und Spaltung des Hydroperoxids zum Alkoxy-Radikal.
(<i>E</i>)-9-Hydroxy-11-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-pentyloxiran-2-yl)undec-10-ensäure	L-6		312.45	Beispielreferenz
(<i>E</i>)-9,10,13-Trihydroxyoctadec-11-ensäure	L-6a		330.47	Solvolyse von L-6 zum Diol.
(<i>E</i>)-9,12,13-Trihydroxyoctadec-10-ensäure	L-6b		330.47	Solvolyse von L-6 zum Diol.
(<i>E</i>)-13-Hydroxy-9-oxooctadec-11-ensäure	L-6c		312.45	Solvolyse von L-6 zum Keton.
(<i>E</i>)-9-Hydroxy-13-oxooctadec-10-ensäure	L-6d		312.45	Solvolyse von L-6 zum Keton.

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(E)-Oct-2-en	L-7a		112.22	L-7a/b: β-Spaltung der Hydroperoxide von Linolsäure (L-1).
10-Oxo-8-decensäure	L-7b		184.24	Häufigste Produkte.
Pentan	L-7c		72.15	L-7c/d: β-Spaltung von Alkoxyradiakeln des L-2a. Wahrscheinlichere Produkte.
(9Z,11E)-13-Oxotrideca- 9,11-diensäure	L-7d		224.30	
Hexanal	L-7e		100.16	L-7e/f: β-Spaltung von Alkoxyradiakeln des L-2a. Seltener Produkte
(Z)-Dodeca-9,11- diensäure	L-7f		196.29	(mögliche Ursache: <i>Hook- Criegee</i> -Umlagerung in aprotischen LM).

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(9Z,11E)-13-(((E)-1-Carboxy-9-hydroxy-12-oxoheptadec-10-en-8-yl)oxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8a		606.89	Etherbildung aus Alkoxyradikalen
(9Z,11E)-13-(((E)-1-Carboxy-12-oxoheptadec-10-en-8-yl)oxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8b		590.89	Etherbildung aus Alkoxyradikalen

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(9Z,11E)-13-(((E)-1-Carboxy-12-oxoheptadec-9-en-8-yl)oxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8c		590.89	Etherbildung aus Alkoxyradikalen
(9Z,11E)-13-(((12R,E)-1-Carboxy-12-hydroxyheptadec-10-en-8-yl)oxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8d		592.90	Etherbildung aus Alkoxyradikalen

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(9Z,11E)-13-(((12R,E)-1-Carboxy-12-hydroxyheptadec-9-en-8-yl)oxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8e		592.90l	Etherbildung aus Alkoxyradikalen
(9Z,11E)-13-(((E)-1-Carboxy-11,12-dihydroperoxyheptadec-9-en-8-yl)peroxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8f		656.90	Organische Peroxid: Dimer aus L-2a

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(9Z,11E)-13-(((E)-1-Carboxy-9,12-dihydroperoxyheptadec-10-en-8-yl)peroxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8g		656.90	Organische Peroxid: Dimer aus L-2a

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(9Z,11E)-13-(((E)-1-Carboxy-9-((E)-1-carboxy-9,12-dihydroperoxyheptadec-10-en-8-yl)peroxy)-12-hydroperoxyheptadec-10-en-8-yl)peroxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8h		1001.35	Organische Peroxid: Trimer aus L-2a

ANHANG

Bezeichnung	Nummer- ierung	Struktur	M_r^{14} [g/mol]	Art der Entstehung
(9Z,11E)-13-(((E)-1-Carboxy-9-((E)-1-carboxy-11,12-dihydroperoxyheptadec-9-en-8-yl)peroxy)-12-hydroperoxyheptadec-10-en-8-yl)peroxy)octadeca-9,11-diensäure	L-8i		1001.35	Organische Peroxid: Trimer aus L-2a