

# **Monolithische Trennmedien für die Biochromatographie: Trenneffizienz, Peakkapazität und Retentionseigenschaften**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

**Dipl.Chem. Sascha Peter Quinten**

**Saarbrücken 2006**

**Tag des Kolloquiums:** 30. März 2007  
**Dekan:** Prof. Dr. K. Hegetschweiler  
**Berichterstatter:** Prof. Dr. Christian Huber  
Prof. Dr. Elmar Heinzle  
Dr. Andreas Tholey

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von September 2003 bis November 2006 am Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Herrn **Univ. Prof. Dr. Christian G. Huber**.

Obwohl diese Arbeit den Namen einer einzelnen Person trägt, wäre ihre Entstehung ohne die große Mithilfe und das enorme Engagement von vielen Personen nicht möglich gewesen. Mein großer Dank gilt daher:

in erster Linie vor allem meinem Diplom- und Doktorvater **Herrn Univ. Prof. Dr. Christian Huber** für die Stellung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung sowie für die exzellente Ausbildung zum analytischen Chemiker. Dafür dass er nicht nur in beruflichen, sondern auch in privaten Bereichen stets großes Interesse für meine Person gezeigt hat, mich stets in allen Lebenslagen tatkräftig unterstützt und durch eine Vielzahl von fachlichen aber auch privaten Diskussionen den Alltag bereichert hat,

Herrn **Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Heinz Engelhardt**, Herrn **PD Dr. Frank Steiner** sowie besonders bei Herrn **Dr. Markus Martin** (Korrekturleser) für zahlreiche Anregungen und Diskussionen im fachlichen Bereich,

Herrn **Reiner Wintringer** („de Windy“), die gute Seele des Institutes für die unzähligen Stunden die er damit verbracht hat meine Geräte und mich wieder aufzubauen und die Tatsache, dass ihm in all den Jahren nie eine Mühe zu groß oder eine Stunde zu spät war,

Frau **Christa Göllen** für die großartige Unterstützung in all meinen bürokratischen Angelegenheiten, besonders bei der Bearbeitung meiner zahlreichen Anträge und Bestellungen und der Tatsache, dass sie dabei nie die Geduld verloren hat sowie ihrer Vertretung Frau **Gabriele Krug** für ihr großes Engagement zur Überwindung bürokratischer Hindernisse.

Ich danke all meinen Kollegen für die große Unterstützung, die zur Entstehung dieser Dissertation notwendig war. Besonderer Dank gilt hierbei meinem Büroteam **Manuela Hügel**, **Verena Fraaß** und **Bilgin Vatansver** für ihr Interesse an meiner Arbeit sowie der stetigen und regelmäßigen Versorgung mit wertvollen Nahrungsmitteln. Weiterhin gilt mein spezieller Dank **Christian Schley** (de Läufer) für die unzähligen Stunden, die er sich mit mir gemeinsam bei Wind und Wetter durch den Wald gequält hat sowie **Anis Mahsunah**, **Iris Gostomski**, **Katja Melchior**,

## Danksagung

---

**Dr. Bettina Mayr, Nathanël Delmotte, Rainer Geiss, Andreas Leinenbach, Jens Mohr, Patrick Riefer** und **Dr. Hansjörg Toll** für die fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen und die Ablenkung vom Stress der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn **Univ. Prof. Oliver Kohlbacher** und Herrn **Dipl. Informatiker Marc Sturm** für die ausgezeichnete und fruchtbare Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Retentionszeitvorhersage Modells für synthetische Oligonukleotide.

Herrn **Dr. Remco Swart** und der Firma LC-Packings, A-Dionex Company, Amsterdam für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung der langen PS/DVB-Monolithen sowie die Finanzierung dieser Arbeit sowie **Herrn Dr. Jochen Saar** für die Bereitstellung der Vydac Everest C<sub>18</sub> Säule.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem ehemaligen Deutschlehrer, Herrn **Univ. Prof. Dr. Benno Resch** für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Großer Dank gilt auch der Graduiertenförderung der Konrad-Adenauer Stiftung e.V. für die Gewährung eines Promotionsstipendiums und der damit verbundenen großzügigen Finanzierung der vorliegenden Arbeit,

sowie den Mitarbeitern unserer Werkstatt, **Peter Skohoutil, Norbert Ochs, Jens Wiegert** und **Robin Adolph** für die gute Zusammenarbeit bei technischen Problemen.

Ich danke meiner verstorbenen Großmutter, **Hedwig Quinten**, die leider die Vollendung dieser Arbeit nicht mehr erleben konnte, für die große Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Bruder **Michael Quinten** sowie all meinen Freunden und Bekannten für ihre Unterstützung und das Interesse während meiner Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Patentante **Helga Schulz** sowie ihrem Mann **Peter Schulz**, die durch ihr stetes und unaufhörliches Engagement sowie ihrem großen Interesse an meiner Person einen wichtigen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet haben.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin **Caroline Schmidt** für ihre große Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen **Eltern Peter und Karin Quinten**, die mir durch ihre Unterstützung, Geduld und Hilfe dieses Studium erst ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>XV</b>
<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>XX</b>
<b>1. Einführung in die Trennung von Biomolekülen</b> .....	<b>2</b>
1.1. Problemstellung der modernen Bioanalytik .....	2
1.2. Einführung in die Analytik von Nucleinsäuren, Proteinen und Peptiden .....	3
1.2.1. Nucleinsäuren – Struktur und Funktion .....	3
1.2.2. Struktur und Funktion von Aminosäuren, Proteinen und Peptiden.....	9
1.2.3. Chromatographische Trennmethoden für Biomoleküle .....	14
1.2.4. Miniaturisierte Trenntechniken .....	19
1.2.5. Massenspektrometrie.....	21
1.2.6. Zielsetzung dieser Arbeit.....	28
1.2.7. Literatur zum Allgemeinen Teil.....	30
<b>2. Lange und kurze PS/DVB-Monolithen für die Trennung von Bioanalyten in der IP-RP-HPLC</b> .....	<b>35</b>
2.1. Einführung und Problemstellung .....	35
2.2. Theoretische Grundlagen.....	36
2.2.1. Definition wichtiger chromatographischer Parameter in der Hochleistungsflüssigchromatographie .....	36
2.2.2. Modelle zur Beschreibung der Gradientelution .....	44
2.3. Experimenteller Teil.....	56
2.3.1. Chemikalien .....	56
2.3.2. Geräte und Säulen .....	57
2.3.3. Verdau der Proteinmischungen.....	58
2.3.4. In der Studie verwendete Proben.....	59

2.3.5. Massenspektrometrische Bedingungen für die Analyse des BSA-Thyroglobulin-Verdaus .....	60
2.4. Einflusses der Säulenlänge auf die Peakkapazität bei der Trennung von Protein- und Peptid-Mischungen .....	61
2.4.1. Einführung .....	61
2.4.2. Untersuchung von Inhomogenitäten bei PS/DVB-Monolithen und Einflusses der Säulenlänge auf die Trenneffizienz .....	62
2.4.3. Einfluss der Säulenlänge auf chromatographische Parameter unter Berücksichtigung des Gradient-Volumen-Konzeptes .....	69
2.4.4. Einfluss der Säulenlänge auf die chromatographischen Parameter ohne Gradient-Volumen-Konzeptes .....	92
2.4.5. Zusammenfassung .....	115
2.5. Anwendung langer Säulen und langer Gradientenzeiten für die Trennung komplexer Mischungen .....	117
2.5.1. Einführung .....	117
2.5.2. Untersuchung verschiedener Säulen-Kopplungstechniken zum Erhalt langer monolithischer Trennsäulen .....	118
2.5.3. Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer gekoppelter Säulen auf die Peakbreite und Peakkapazität .....	123
2.5.4. Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer ungekoppelter Säulen auf die chromatographischen Parameter $P_K$ und $w_b$ .....	134
2.5.5. Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer unter Verwendung langer, ungekoppelter PS/DVB-Monolithen .....	145
2.5.6. Einfluss der Flussrate auf die Peakhalbwertsbreite und die Peakkapazität bei der Trennung eines komplexen Verdaus .....	147
2.5.7. Beladbarkeit langer PS/DVB-Monolithen mittels BSA-Thyroglobulin-Verdaus und P2693 Peptid-Standard .....	150
2.5.8. Bestimmung der Permeabilität langer PS/DVB-Monolithen .....	154
2.5.9. Zusammenfassung .....	157
2.6. Literaturverzeichnis .....	160
2.7. Anhang .....	163

<b>3. Entwicklung von Retentionszeitvorhersage-Modellen für die Anwendung in der IP-RP HPLC</b> .....	181
3.1. Einführung.....	181
3.2. Literaturbeschriebene Modelle zur Vorhersage des Retentionsverhaltens in der HPLC .....	183
3.2.1. Additiv mathematisches Vorhersagemodell .....	183
3.2.2. Retentionsvorhersage mittels linearer Freier Enthalpiebeziehungen (LFER) .....	188
3.2.3. Anwendung von Quantitativen Struktur-Retentions- Beziehungen (QSRR) zur Retentionszeitvorhersage in der HPLC.....	191
3.2.4. Weitere literaturbekannte Modelle zur Vorhersage des Retentionsverhaltens in der Chromatographie .....	193
3.3. Einflussfaktoren auf das Retentionsverhalten von Oligonukleotiden in der IP-RP-HPLC .....	194
3.4. Experimenteller Teil.....	196
3.4.1. Chemikalien und Oligonukleotide.....	196
3.4.2. HPLC-Laufmittel.....	197
3.4.3. Geräte und Säulen .....	197
3.4.4. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.....	199
3.5. Eignung des Kapillar-HPLC-Systems zur präzisen und genauen Retentionsmessung .....	201
3.5.1. Einführung.....	201
3.5.2. Reproduzierbarkeit und Stabilität des Mikro-HPLC-Systems bei 70°C und unterschiedlichen Gradientbedingungen .....	204
3.5.3. Reproduzierbarkeits- und Stabilitätsuntersuchungen bei Trenntemperaturen von 40°C und 50°C .....	211
3.5.4. Zusammenfassung der Stabilitäts- und Reproduzierbarkeitsstudie für das U 3000 Mikro-HPLC-System .....	215
3.6. Verbesserung des Additiven Retentionszeit-Vorhersage-Modells.....	217
3.6.1. Einführung und Problemstellung .....	217
3.6.2. Neubestimmung der empirischen Koeffizienten des Additiven Retentionsmodells .....	219
3.6.3. Diskussion und Auswertung.....	226

3.6.4. Zusammenfassung.....	235
3.7. Retentionszeit-Vorhersage-Modell für Oligonukleotide basierend auf der Support-Vektor-Regression.....	236
3.7.1. Einführung und Problemstellung .....	236
3.7.2. Grundprinzip von Support-Vektor-Maschinen .....	237
3.7.3. Anwendung von Support-Vektor-Maschinen für die Retentionszeitvorhersage von Oligonukleotiden in der IP-RP-HPLC .....	241
3.7.4. Vorhersage der Retentionszeiten synthetischer Oligonukleotide mittels SVM-Modell.....	246
3.7.5. Vorhersage der Retentionszeiten von Hairpinstrukturen mittels Support-Vektor-Maschinen.....	257
3.7.6. Untersuchung der Leistungsfähigkeit des SVM-Vorhersagemodells anhand einer PCR-Primer Mischung.....	261
3.7.7. Zusammenfassung.....	262
3.8. Untersuchung der Leistungsfähigkeit der Vorhersage-Modelle auf unterschiedlichen stationären Phasen .....	264
3.8.1. Einführung.....	264
3.8.2. Bestimmung der Koeffizienten für das Additive Retentionsvorhersage-Modell .....	265
3.8.3. Anwendung des Additiven Retentionsvorhersagemodells auf neue stationäre Phasen .....	274
3.8.4. Vorhersage der Retentionszeiten auf einer PS/DVB-C <sub>18</sub> und einer C <sub>18</sub> -Silika-Säule unter Verwendung des SVM-Modells .....	278
3.9. Literaturverzeichnis .....	279
3.10. Anhang zum Kapitel 3.....	286



## Zusammenfassung

Trotz der jahrzehntelangen Anwendung der Chromatographie in der Routineanalytik, stellt die exakte Vorhersage der Retentionszeit immer noch ein großes Problem dar. Vor allem die enorme Komplexität der chromatographischen Vorgänge, die teilweise noch unverstanden sind, macht die exakte Retentionszeit-Vorhersage anhand der Analytstruktur extrem schwierig. Da Retentionszeit-Vorhersagen jedoch sehr nützlich für die Optimierung von Trennungen oder auch für die zuverlässige Identifizierung von Komponenten in komplexen Mischungen sind, gibt es heute eine Vielzahl von Arbeiten, die auf die unterschiedlichsten Arten versucht haben, dieses komplexe und schwierige Problem zu lösen.

Ziel dieser Arbeit war es ein Vorhersagemodell in der Ionenpaar-Umkehrphasen Chromatographie (IP-RPC) zu entwickeln, das unabhängig von chromatographischen Parametern wie Trenntemperatur oder stationärer Phase und unter Einbeziehung der Analytstruktur, eine exakte Retentionszeit-Vorhersage für Oligonukleotide erlaubt. Da einige Oligonukleotide bei bestimmten Temperaturen Sekundärstrukturen (z.B. Haarnadelstrukturen) ausbilden, stellen sie besonders hohe Anforderungen an das Vorhersage-Modell, da dieses in der Lage sein muss, diese strukturellen Veränderungen zu erkennen und in die Vorhersage mit einzubeziehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst ein von M. Gilar entwickeltes Modell [1], bei dem die Retention durch Addition empirisch ermittelter Retentionsbeiträge der individuellen Aminosäuren bzw. Nukleotide ermittelt und anschließend durch Terme korrigiert wird, die die Gesamtstruktur des Moleküls berücksichtigen, erweitert und verbessert. Im Gegensatz zum Gilar'schen Ansatz, der sein Modell zur Vermeidung möglicher Sekundärstrukturen bei einer Trenntemperaturen von 60°C auf einer Silica-C<sub>18</sub> Säule entwickelt und getestet hatte, wurde dieses Modell nun auf verschiedene stationäre Phasen (PS/DVB-Monolith, PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule und Silica-C<sub>18</sub> Säule) und verschiedene Trenntemperaturen (30-80°C) erweitert. Hierbei sollte vor allem die Anwendbarkeit des Modells, das keine strukturellen Eigenschaften der Analyten für die Vorhersage berücksichtigt, bei niedrigen Trenntemperaturen untersucht werden. Um das Modell unter den verschiedenen chromatographischen Bedingungen (stationäre Phase, Temperatur) testen zu können, mussten zuvor zunächst die Koeffizienten, die die empirischen Retentionsbeiträge der jeweiligen

Nukleobasen beinhalten, neu bestimmt werden. Durch die Verwendung von Homooligonukleotiden  $((dT)_x$ ,  $(dA)_x$ ,  $(dC)_x$  und  $(dG)_x$ ) mit verschiedenen Längen ( $x=10, 14, 18, 22$  und  $26$ ) konnten diese bei allen Trenntemperaturen und verwendeten Phasen neu bestimmt werden. Dabei stellte vor allem die Bestimmung der Koeffizienten des Guanosins, aufgrund der starken inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Nukleotiden, besonders hohe Anforderungen an die experimentellen Bedingungen. So waren diese nur für hohe Trenntemperaturen direkt experimentell zugänglich und mussten für alle anderen Temperaturen mathematisch bestimmt werden. Mittels dieser Koeffizienten wurden anschließend die Retentionszeiten von 72 synthetischen Oligonukleotiden für die verschiedenen Temperaturen und stationären Phasen berechnet und mit den experimentellen Daten verglichen. Der Testdatensatz an Oligonukleotiden bestand dabei aus 41 Oligonukleotiden, die durch Variation eines 24-mers generiert wurden sowie aus vier weiteren Sequenzen, die so ausgewählt wurden, dass sie auch bei höheren Temperaturen stabile Haarnadelstrukturen ausbilden. Die restlichen Sequenzen wurden so gewählt, dass sie einen Längenbereich zwischen 15-48 Nukleotiden abdeckten. Diese Studie hat dabei gezeigt, dass dieses Vorhersagemodell bei hohen Trenntemperaturen, bei denen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln oder partielle Doppelstränge weitestgehend unterdrückt werden, gute Ergebnisse liefert, während bei niedrigen Temperaturen der Einfluss von Sekundärstrukturen (vor allem bei den Haarnadelstrukturen) zu einer schlechten Übereinstimmung zwischen Vorhersage und Experiment führt. Durch die Einführung zusätzlicher Korrekturfaktoren konnte der relative Vorhersagefehler der berechneten Retentionszeiten soweit verbessert werden, dass Vorhersagen mit einer Genauigkeit zwischen 1.2 - 3.2% möglich waren (Ausnahme Haarnadelstrukturen).

Unsere Versuche, ein verbessertes Retentionsmodell für Oligonukleotide IP-RPC auch bei niedrigen Trenntemperaturen zu entwickeln, beruhte auf der von Schölkopf *et al.* vorgeschlagenen  $\nu$ -Supportvektorregression [2]. Diese Methode bestimmt ein Modell für einen gegebenen Datensatz so, dass gleichzeitig der Modellfehler und die Modellkomplexität minimiert werden. Das Training dieses Modells erfolgt auf einer recht geringen Anzahl von 50-100 Oligonukleotiden. In der ersten Stufe unseres Verfahrens wurde ein Testdatensatz durch genaue Messung der Retentionszeiten von 72 Oligonukleotiden erstellt. Die Bestimmung der experimentellen Daten erfolgte

dabei durch ein HPLC-System, das zuvor ausgiebigst auf seine Leistungsfähigkeit hin untersucht wurde. Das Trainieren des SVR-Modells erfolgte anschließend durch Aufteilung des Testdatensatzes in drei Teile (je 24 Datenpunkte). Zwei Drittel der Testdaten wurden für das Trainieren des SVR-Modells verwendet, das restliche Drittel der Datenpunkte wurde zur Validierung der Vorhersage benutzt (dreifache Kreuzvalidierung). Die  $R^2$  und  $Q^2$  Werte geben dabei jeweils die Korrelation des SVR-Modells auf den Trainingsdatensatz bzw. die Korrelation der vorhergesagten Retentionszeiten mit den Experimentellen an. Die Ergebnisse haben dabei gezeigt, dass mittels dieses SVM-Modells die Retentionszeiten der Oligonukleotide unter allen experimentellen Bedingungen (stationäre Phase, Trenntemperaturen) mit einer Genauigkeit von 0.7 – 1.2% vorhergesagt werden konnten. Im Gegensatz zum Additiven Vorhersagemodell konnten auch die Retentionszeiten der Haarnadelstrukturen unabhängig von den untersuchten Temperaturen, mit einer sehr hohen Genauigkeit vorhergesagt werden. Zusätzlich zur Vorhersage der 72 Oligonukleotide des Testdatensatzes wurde die Leistungsfähigkeit des Modells auch anhand einer Mischung von Oligonukleotid-Primern, die für eine multiplexe Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion verwendet wurden, untersucht. Die Stärke des Modells zeigte sich dabei darin, dass nicht nur die Retentionszeiten der relativ ungewöhnlichen A,T-reichen Sequenzen, sondern auch die Retentionsreihenfolge der kurzen Oligonukleotide, mit Ausnahme einer einzigen Inversion, bei allen untersuchten Temperaturen (40°C, 50°C und 70°C) mit einer durchschnittlichen bzw. maximalen Abweichung von 1.6 – 3.2% vorhergesagt werden konnten.

Die gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Retentionszeiten ist dabei ein eindeutiges Indiz dafür, dass die im Modell integrierten Strukturparameter die Wechselwirkungen zwischen Oligonukleotid und stationärer Phase in der IP-RPC sehr gut beschreiben und das Modell damit zur Vorhersage auch komplexer Mischungen, unter allen experimentellen Bedingungen, geeignet ist.

Die immer komplexer werdenden Probleme in der modernen Medizin, Pharmazie oder Biologie stellen immer höhere Anforderungen an die Analytik. Zur Lösung dieser neuen Fragen sind moderne Detektoren wie hochauflösende Massenspektrometer unabdingbar. Trotz der enormen Fortschritte bei der Entwicklung und Verbesserung der Massenspektrometrie als Detektionsmethode mit hoher analytischer Aussagekraft hat sich jedoch gezeigt, dass das „bottle neck“ immer noch in der Leistungsfähigkeit des Trennmediums, d.h. in der Effizienz der Trennsäule zu sehen ist. Daher ist die Neu- und Weiterentwicklung dieser Trennmedien entscheidend für die Lösung der Fragestellungen der heutigen Bioanalytik.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob die Leistungsfähigkeit von PS/DVB-Monolithen durch die Steigerung der Säulenlänge und Gradientdauer verbessert werden kann. Prinzipiell liegt dem Versuch der Steigerung der Peakkapazität durch Erhöhung der Säulenlänge die Theorie zugrunde, dass sich die Peakbasisbreiten nicht proportional zur Säulenlänge erhöhen, sondern lediglich mit der Wurzel eingehen. Verdoppelt man also die Säulenlänge, so sollte sich demnach die Peakbasisbreite nicht verdoppeln, sondern sich lediglich um Wurzel 2 erhöhen. Der sich daraus ergebende Vorteil sollte sich demnach in höheren Peakkapazitäten bei längeren Säulen widerspiegeln [3]. Bei der Anwendung langer PS/DVB-Monolithen ist dabei besonders darauf zu achten, dass der Polymerisationsprozess für diese Monolithen soweit ausgereift ist, dass es bei der Herstellung nicht zur Ausbildung lokaler Inhomogenitäten im Säulenbett kommt, da diese wiederum die Trennleistung massiv herabsetzen würden. Daher musste in einem ersten Schritt der Syntheseprozess dieser langen Trennsäulen näher untersucht und soweit optimiert werden, dass die Herstellung langer Trennsäulen ohne Inhomogenitäten möglich war.

Erste Voruntersuchungen mit langen Monolithen (150 x 0.2 mm i.D.) hatten dabei gezeigt, dass das von Huber et. al. entwickelte Syntheseprotokoll für 60 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen [4] so nicht für die Herstellung längerer Monolithen geeignet war, da diese Säulen eine zu geringe Permeabilität besaßen, was zu einem zu hohen Druckabfall in den längeren Säulen führte. Daher wurde in Zusammenarbeit mit der Firma LC-Packings zunächst das Syntheseprotokoll soweit abgewandelt, dass auch die Herstellung längerer Trennsäulen möglich war.

Dieser so modifizierte 150 mm lange PS-DVB-Monolith (150 x 0.2 mm i.D.) wurde anschließend systematisch auf das Auftreten von Inhomogenitäten sowie die Abhängigkeit der Trennleistung von der Säulenlänge untersucht. Dies wurde dadurch erreicht, dass ein 150 mm langer Monolith nacheinander in verschieden lange Teilstücke (150 mm, 75 mm und 37.5 mm) verkürzt und jede dieser Säulen mit den Probesubstanzen auf die chromatographischen Parameter Auflösung, Peakbreiten und Peakkapazität untersucht wurde. Als Probesubstanzen dienten dabei ein Peptid-Standard (P2693), eine Proteinmischung (9 Proteine) und ein Cytochrom C Verdau. Die Ergebnisse dieser ersten Studie hatten gezeigt, dass die Säulenlänge einen Einfluss auf die Trennleistung hatte und dass es bei der Polymerisation längerer Monolithen (150 mm) nicht zur Ausbildung von Inhomogenitäten gekommen war. Um die Problematik der Synthese langer Monolithen zu umgehen, wurden zusätzlich längere Monolithen (210 mm) untersucht, die durch die Kopplung eines 150 mm und eines 60 mm Monolithen hergestellt wurden. Dabei hatte sich gezeigt, dass die Kopplungstechnik einen signifikanten Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der Säule hatte und daher untersucht und verbessert werden musste. Durch diese Verbesserung der Kopplungstechnik konnte die Peakkapazität im Verlauf dieser Studie annähernd verdoppelt werden. Trotz dieser Verbesserungen hatten die Ergebnisse jedoch gezeigt, dass die höchsten Peakkapazitäten mit ungekoppelten Säulen erreicht wurden. Daher wurden für die restlichen Studien die Synthesevorschriften soweit modifiziert, dass auch die Herstellung längerer ungekoppelter Monolithen (210-300 x 0.2 mm i.D.) möglich war.

Zusätzlich zur Säulenlänge wurde auch der Einfluss des Gradient-Volumen-Konzeptes (GVK) auf die Trennleistung der Säulen untersucht. Das Prinzip des GVK besteht dabei darin, dass die Gradientenlaufzeit systematisch an die jeweilige Säulenlänge angepasst wird, um dadurch bestehende und optimierte Gradienten problemlos an verschiedene Säulendimensionen oder Flussraten anpassen zu können.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte neben der Säulenlänge auch der Einfluss der Gradientenlaufzeit auf die Peakkapazität untersucht werden. Dazu wurden mehrere längere ungekoppelte Monolithen (150-300 mm) mittels HPLC und HPLC-MS (ESI-Tof-Massenspektrometer) sowie Gradientenlaufzeiten zwischen 1-9h auf ihre Leistungsfähigkeit hin getestet. Die Verwendung eines Massenspektrometers als

Detektor war notwendig, da aufgrund der Komplexität des als Probe verwendeten BSA-Thyroglobulin-Verdaus die Bestimmung der relevanten chromatographischen Parameter (Peakbreiten) aus den reinen UV-Daten, wegen zahlreicher Koelutionen der Analyten, nur schwierig möglich war. Zusätzlich zur Säulenlänge und Gradientdauer wurde auch der Einfluss der Flussraten (1.0  $\mu\text{l}/\text{min}$  – 2.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) auf die Peakkapazität untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Säulenlänge und der Gradientdauer zu einer signifikanten Verbesserung der Peakkapazitäten führten, während der Säulenfluss keinen entscheidenden Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der Trennsäule hatte. So konnten mit den neuen, längeren Trennsäulen, unter Verwendung langer Gradienten (9h), Peakkapazitäten bis annähernd 1000 generiert werden. Auch die postulierte Theorie, dass sich die Peakbasisbreite zur Säulenlänge nicht proportional, sondern lediglich mit Wurzel der Säulenlänge ändert, konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Eine Verdopplung der Säulenlänge um einen Faktor von  $m$  führte daher zu einer Erhöhung der Peakbasisbreite um Faktor einer Wurzel  $m$ . Somit konnte durch die erhaltenen Ergebnisse gezeigt werden, dass PS/DVB-Monolithen bestens für die Lösung sehr komplexer Trennprobleme geeignet sind.

## Literaturverzeichnis

1. M. Gilar, K. J. Fountain, Y. Budman, U. D. Neue, K. R. Yardley, P. D. Rainville, R. J. Russell 2nd and J. C. Gebler, *J Chromatogr A*, 958 (2002) 167.
2. B. Schölkopf, R. Bartlett, A. Smola and R. Williamson, in L. Niklasson, M. Boden and T. Ziemke (Eds.), *Proc. Eighth Int'l Conf. Artificial Neural Networks*, 1998, p. 111.
3. L. R. Snyder and Cs. Horvath, *High-Performance Liquid Chromatography*, Academic Press, New York, 1980, Vol. 1, p. 207.
4. C. G. Huber, A. Premstaller and H. Oberacher, *Method and Apparatus for Separating Polynucleotides Using Monolithic Capillary Columns*, US patent application U. S., 60/178.553 .

## Abstract

Because of the increasing need for linkers, primers and probes, single-stranded oligonucleotides have become very important in biochemistry, molecular biology, and medicine. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC) has become one of the most important and efficient methods for the separation of oligonucleotides. In spite of the broad application of IP-RP-HPLC, no reliable models are available so far for the prediction of oligonucleotides retention as a function of their sequence. Solvophobic and electrostatic interactions are mainly responsible for retention in IP-RP-HPLC of oligonucleotides. However, secondary structures such as base stacking and/or hairpin formation are also known to influence retention. The focus of this work was to develop a model that allows the prediction of retention times under different chromatographic conditions like stationary phase or separation temperature variations directly from the oligonucleotide sequence.

In the first part of our study we used an existing mathematical prediction model which was developed by M. Gilar and tried to improve the quality of that model. The retention prediction of this model is based on empirical coefficients which are specific for each nucleotide, each stationary phase and each separation temperature. Therefore the first challenge was to determine these coefficients for all temperatures and all separation conditions (stationary phases). To determine these specific coefficients, different homooligonucleotide standards in the length from 10-26 were chromatographed under the different experimental conditions. Due to strong intra- and intermolecular interaction, especially the determination of coefficients of the longer (dG)<sub>x</sub>-homooligonucleotids (x=14-26) was difficult at temperatures lower than 70°C. Therefore these coefficients were calculated from the measured data at 70°C by a mathematical method. The biggest disadvantage of the mathematical model is the fact that it does not consider secondary structural parameters of the analytes for the prediction of the retention times and therefore the prediction results via this model lead to a bad correlation between the experimental and predicted retention times. Especially the prediction of retention times of hairpin structures at low temperatures yielded unacceptable results. The results of this study reveal that prediction models which do not include structural parameters of the analytes are not really applicable for the retention prediction of oligonucleotides especially at low separation

temperature. Therefore we tried to develop a new prediction model which includes these structural parameters.

For setting up a new model for chromatographic retention, the elution times of 72 oligonucleotides with different lengths and sequences were measured on a 60 x 0.2 mm i.d. monolithic poly-(styrene/divinylbenzene) column and a 50 x 4.6 mm i.d. column packed with 2  $\mu\text{m}$  poly-(styrene/divinylbenzene- $\text{C}_{18}$ ) particles using different separation temperatures. To determine the influence of the sequence on retention 41 of the oligonucleotide sequences were generated by variation of a 24-mer. To take into account other possible secondary structures, four further sequences were selected that form stable hairpin structures even at higher temperatures. The remaining sequences were finally selected so that they covered a length range of 15-48 nucleotides.

A mathematical model was built using the retention data in connection with the principle of statistical learning theory (support vector regression-SVR). The training properties incorporated into the model included oligonucleotide length and base composition, base stacking energies, as well as secondary structures due to hairpin formation. To train our model the dataset of the 72 oligonucleotides was divided into three parts (each of 24 data points) and two thirds of the data were used to train the SVR model whereas the remaining third was used for validation of the prediction (Triple cross-validation). In each case, the values of  $R^2$  and  $Q^2$  represent the correlation of the SVR model with the training dataset and the correlation of the predicted retention times with the experimental times, respectively.

The model yielded excellent fits in a temperature range of 30-80 °C and allowed the prediction of retention time of any 13-50-mer oligonucleotide not used in the training of the model with an accuracy of better than 2%. Finally, the method was utilized for the prediction of mixtures of primers utilized in multiplex polymerase chain reactions. As already seen for the 72 oligonucleotides, the model was able to predict the retention times of the primer mixture correctly, except the inversion of two primers, at all separation temperatures (40°C, 50°C and 70°C). The retention times were predicted with an average and maximum deviation of 1.6 – 3.2%. The good agreement between the experimental and predicted retention times indicates that the structural parameters integrated into the model describe the interaction between the analytes and the stationary phase in IP-RPC very well.



In summary a model has been developed that for the first times allows the prediction of retention times of oligonucleotides with an accuracy better than 3%. The quality of the prediction is independent from the separation temperature and that is the advantage of the SVR model compared with other existing prediction models for oligonucleotides.

During the past years, several groups have successfully put into practice the concept of using very long columns packed with small particles in order to increase column efficiency and peak capacity. Nevertheless, while the increase in plate number with long columns run under isocratic conditions has been clearly proven, the attainable increase in peak capacity with longer columns in gradient separations remains under dispute, especially in the separation of biopolymers such as peptides or proteins. In order to gain an insight into the effect of column length on the separation power of monolithic columns, we designed a study dealing with the chromatographic performance of monoliths in peptide and protein separations. Based on the theory of Snyder an increase in column length by e.g. a factor of 2 should effect an increase in peak width by a factor of  $\sqrt{2}$ . If this model holds, then the column length should not have a large impact on total peak capacity in gradient elution, as long as the column is not overloaded.

In order to get an insight into the effect of column length on the separation power of monolithic columns, we designed a study looking at the chromatographic performance of monoliths in peptide and protein separations. A number of issues had to be considered in the design of such a study. Firstly, the influence of column length had to be studied with one piece of monolith in order to exclude variations that are a consequence of slight differences in column preparation. We planned to use a 15-cm long monolith for initial column evaluation and to trim it subsequently into smaller pieces in order to obtain shorter columns for investigation. The peptide standard P2693, a tryptic digest of cytochrome C, a mixture of 9 standard proteins and a complex BSA-thyroglobulin-digest were chosen as sample mixtures to study the separation performance. Secondly, each piece cut from the original monolith had to be investigated individually to be able to detect inhomogeneities in the column bed. Thirdly, because of different column backpressures that necessitated different primary flows in the split-pumping system, it was necessary to determine the gradient

delay time for each column to be able to inject the sample exactly at the time point when the gradient reaches the column in order not to influence the separation by isocratic elution of some compounds at the beginning of the separation. And finally, we had to take into consideration the gradient volume concept, which states that a gradient separation is relatively independent of column length and flow rate, as long as the product of gradient time and eluent flow rate remain constant. To study the effect of gradient time and gradient volume we decided to perform the column evaluation both at constant gradient volume and constant gradient time.

The 150 mm monolithic poly-(styrene/divinylbenzene) capillary columns used in this study had an internal diameter of 0.20 mm. Additional to the 150 mm monolithic column we also used longer columns (210, 250 and 300 mm) and shorter columns with a total length of 75 mm, 50 mm and 37.5 mm. The shorter columns were obtained by cutting the 150 mm column into different pieces. The resulting backpressures of 250-300 bar of the monoliths running at 1-2  $\mu\text{L}/\text{min}$  flow rates, were still well within the operating range of standard capillary HPLC equipment. The influence of column length on peak capacity was determined by using the UV data. However, due to complexity of the digest, many peptides coeluted or were only partially resolved. These coelutions result in broad peaks which makes the exact calculation of the peak capacity very difficult. Using the data obtained by the hyphenation of an Ultimate 3000 system to an ESI-TOF mass spectrometer makes it possible to avoid this problem because with these data, the extraction of ESI-TOF chromatograms for several peptides (by peptide mass) from the digest is possible. Thereby a very exact determination of the peak width and calculation of peak capacity is possible. Additionally to the influence of column length and gradient time on column efficiency, the influence of flow rate and the technique of column coupling were investigated in this study.

Using long monolithic columns and a separation time of 60 minutes, average peak widths of 9-10 s and peak capacities of approx. 400 were obtainable. Upon increasing the gradient time to 540 min, peak capacities of more than 900 were obtained with 210 mm long columns. The study revealed that high peak capacities were achievable by applying long monolithic columns and long separation times. In contrast to column length and gradient time, the flow rate showed no significant influence on peak width and peak capacity. The study also revealed that uncoupled

columns had much better separation efficiencies than coupled columns. Moderate pressure drops were sufficient to run the columns, making long poly-(styrene/divinylbenzene) monoliths suitable for the separation of complex mixtures of peptides or proteins.

## Abkürzungen und Symbole

ACN	Acetonitril
a.D.	Außendurchmesser
AM	Additives Vorhersagemodell
amu	atomare Masseneinheit
AU	Absorptionseinheit
Brad	Bradykinin
BSA	Rinderserum Albumin (engl. Bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cyt C	Cytochrom C
d.h.	das heißt
Da	Dalton (molare Masseneinheit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GVK	Gradient-Volumen-Konzept
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
i.D.	Innendurchmesser
IP	Ionenpaar
IP-RP-HPLC	Ionenpaar-Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie
k	Retentionsfaktor
K	Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-C <sub>18</sub> Säule
KNN	Künstliche neuronale Netzwerke
LC	Flüssigchromatographie
LFER	Lineare freie Enthalpiebeziehungen
LSST/LSS	Linear solvent strength theory
Lys	Lysozym
M	Poly-(Styrol/Divinylbenzol) Monolith
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Met Enk	Methionin Enkephalin
mg	Milligramm

## Abkürzungen und Symbole

---

min	Minute
mm	Millimeter
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
$M_r$	relative molare Masse
MS	Massenspektrometrie
Myo	Myoglobin
N	Bodenzahl
nm	Nanometer
NP	Normalphase
Nr.	Nummer
ODS	Octadecylsilan
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negative dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenaktivität
$P_K$	Peakkapazität
ppm	Parts per million
PS/DVB- $C_{18}$	$C_{18}$ -alkyliertes Poly-(Styrol/Divinylbenzol)
PS/DVB-Monolith	Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolith
$Q^2$	Korrelationskoeffizient (Qualität der Vorhersage der Testdaten)
QSERR	Quantitative structure-enantioselective retention relationships
QSRR	Quantitative Struktur-Retentions Beziehungen
$R^2$	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie
RSD	Relative Standardabweichung
s	Sekunde
S	Vydac Everest $C_{18}$ Säule
SD	Standardabweichung
$s_y$	Reststandardabweichung
T	Temperatur
$t_g$	Gradientdauer
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
ToF	Time of flight
RTICC	Rekonstruiertes Totales Ionenstrom Chromatogramm
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett

## Abkürzungen und Symbole

---

v/v	Volumenzusammensetzung
w/w	Zusammensetzung in Gewichtsprozent
w <sub>h</sub>	Peakhalbwertsbreite (bei 2.355σ)
w <sub>b</sub>	Peakbasisbreite (bei 4σ)
μl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

# **Kapitel 1**

---

**Theoretische Grundlagen und  
Problemstellung**

---

# 1. Einführung in die Trennung von Biomolekülen

## 1.1. Problemstellung der modernen Bioanalytik

Die immer komplexer werdenden Probleme in der modernen Medizin, Pharmazie und Biologie stellen immer höhere Anforderungen an die Analytik. Dabei sind analytische Methoden gefordert, die rasche Analysen mit maximaler Selektivität bei gleichzeitig möglichst geringen Nachweisgrenzen ermöglichen. Da in der modernen Analytik meist nur sehr kleine Probemengen zur Verfügung stehen, müssen auch die analytischen Systeme an diese erschwerten Bedingungen angepasst werden. Ein zielführender Ansatz stellt dabei die Miniaturisierung verschiedener Trenntechniken dar. Daher wurde auf diesem Feld der analytischen Chemie in den letzten Jahren große Entwicklungsarbeit geleistet [1]. Ein weiterer entscheidender Durchbruch im Bereich der modernen Bioanalytik wurde durch die Einführung und Verbesserung der Massenspektrometrie [2] als Detektionsmethode erreicht. Trotz der enormen Empfindlichkeit der modernen Massenspektrometer [3] und ihres hohen analytischen Informationsgehaltes (Struktur- und Masseninformationen) hat sich jedoch gezeigt, dass das „bottle neck“ der Analytik immer noch häufig in der Leistungsfähigkeit der verwendeten Trenntechnik, d.h. der Effizienz der Trennsäule, zu sehen ist. Daher ist die Neu- und Weiterentwicklung dieser Trennmedien entscheidend für die Lösung der Fragestellungen der heutigen Bioanalytik. Im Bereich der Miniaturisierung stellen vor allem monolithische Säulen eine signifikante Verbesserung dar, da hier die Anpassung des Systems an kleine Flüsse und Probemengen sowie die Kopplung mit der Massenspektrometrie als Detektionsmethode der Wahl [4,5] besonders gut umgesetzt werden kann [6,7]. Im besonderen Fokus der heutigen Forschung stehen dabei vor allem biologische Polymere wie DNA, Oligonukleotide, Proteine und Peptide. Wie bereits durch frühere Arbeiten von Huber et al. gezeigt werden konnte, stellen die neuen monolithischen Säulen [5,8-10], verbunden mit modernen Mikro-HPLC Systemen und leistungsfähigen Massenspektrometern, einen viel versprechenden Lösungsansatz für die Trennung dieser biologischen Polymere dar.



## 1.2. Einführung in die Analytik von Nukleinsäuren, Proteinen und Peptiden

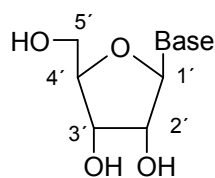
### 1.2.1. Nukleinsäuren – Struktur und Funktion

Nukleinsäuren sind für die Speicherung und den Transport der genetischen Information [11] zuständig und auch an der Proteinbiosynthese beteiligt. Man unterscheidet dabei die Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die Ribonukleinsäure (RNA). Der menschliche Organismus ist aus Genen aufgebaut, die ihrerseits wiederum aus DNA aufgebaut sind. Bei der DNA handelt es sich dabei um ein fadenförmiges Makromolekül, das aus einer Vielzahl von Desoxyribonukleotiden aufgebaut ist, die ihrerseits wiederum aus einer Nukleobase, einem Zuckermolekül und einer Phosphatgruppe bestehen. Dabei sind die Basen die Träger der genetischen Informationen, während die strukturellen Aufgaben durch den Zucker und die Phosphate wahrgenommen werden.

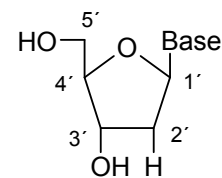
#### a) Bausteine der Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind Biopolymere, deren monomere Einheiten die sogenannten Nukleotide sind. Ein Nukleotid besteht dabei aus:

1. einem Zuckermolekül (Pentose)



**D-Ribose**

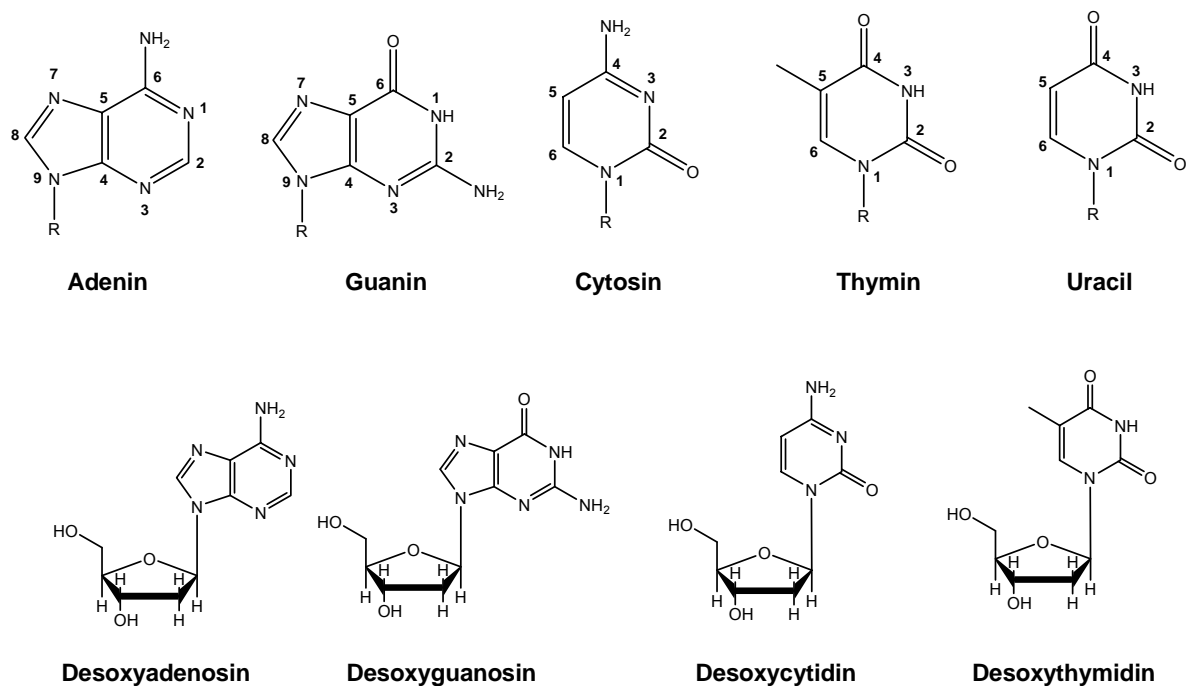


**2'-Desoxy-D-Ribose**

D-Ribosen sind dabei die Bausteine der Ribonukleinsäuren (RNA), während Desoxy-Ribosen die Desoxyribonukleinsäure (DNA) aufbauen. Der Unterschied zwischen den beiden Zuckern liegt dabei in der 2'-OH-Position.

## 2. einer Nucleobase

Betrachtet man den Aufbau, so unterscheidet man prinzipiell zwischen Purinbasen (Adenin (A), Guanin (G)) oder einer Pyrimidinbasen (Cytosin (C), Thymin (T), Uracil (U)) (**Abbildung 1.1**).

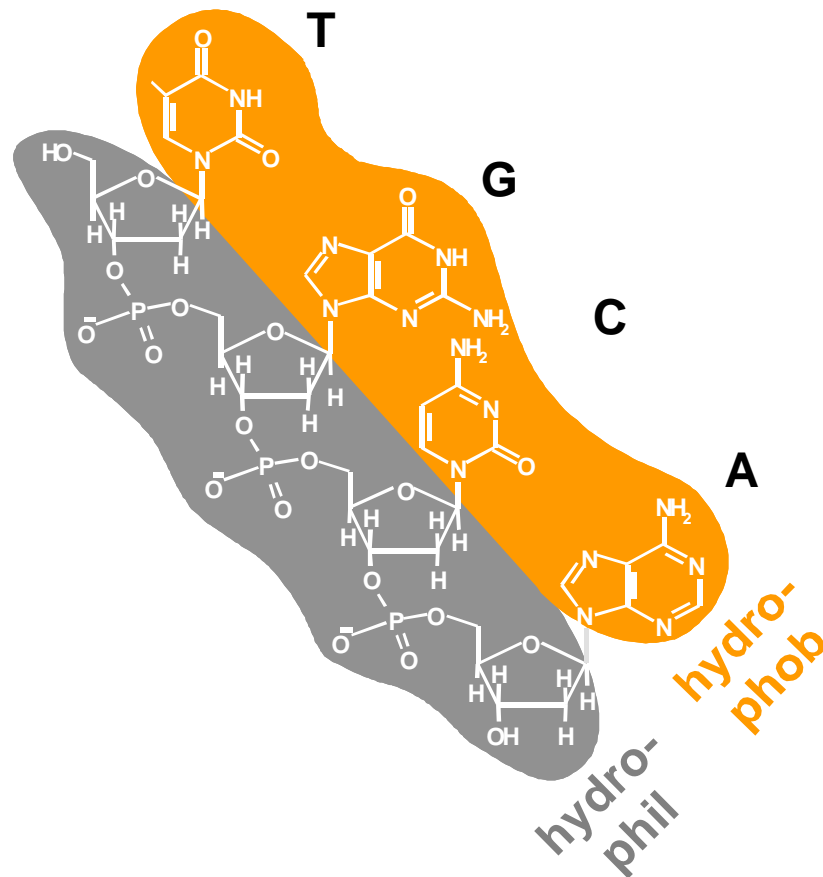


**Abbildung 1.1.** Struktur der Purin- und Pyrimidinbasen bzw. der Desoxyribonucleoside.

Die heterocyclischen Stickstoffbasen sind mittels  $\beta$ -N-glykosidischer Bindung mit dem Kohlenstoffatom an der 1'-Position des Zuckermoleküls verknüpft. Der Unterschied zwischen der DNA und RNA ist lediglich in der Verwendung einer einzigen Nucleobase zu sehen, während die drei restlichen Basen identisch sind. Dabei wird zum Aufbau der DNA die Nucleobase Thymin verwendet, während die RNA aus Uracil aufgebaut wird.

3. einer Phosphat-Gruppe (an Position 2', 3' bzw. 5')

Wie aus **Abbildung 1.2** hervorgeht, werden die Nukleotide zur Ausbildung des Polymers über 3'-5'-Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft.

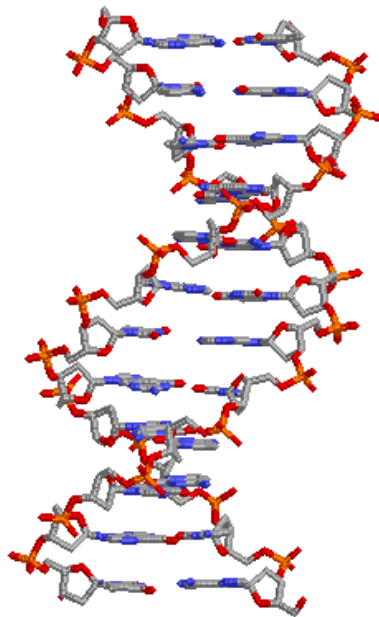


**Abbildung 1.2.** Struktur eines Tetranukleotids mit der Sequenz TGCA.

Aus dieser Verknüpfung ergibt sich, dass es zwei verschiedene Enden in der Polymerkette gibt, nämlich ein 5'-bzw. 3'-Ende. Dadurch erhält der Polymerstrang eine eindeutig definierte Richtung. Dies wird in der Nomenklatur dadurch berücksichtigt, dass die Basensequenz in 5'- nach 3'-Richtung angegeben wird. Weiterhin kann man **Abbildung 1.2** entnehmen, dass die Polymerkette einen hydrophilen und einen hydrophoben Bereich aufweist. Während das Zuckermolekül und die Phosphatgruppe für die hydrophilen Eigenschaften des Moleküls verantwortlich sind, wird die Hydrophobie durch die Stickstoffbasen bestimmt. Dabei zeigt Cytosin die geringste Hydrophobie, gefolgt von Guanin, Adenin und Thymin (C<G<A<T).

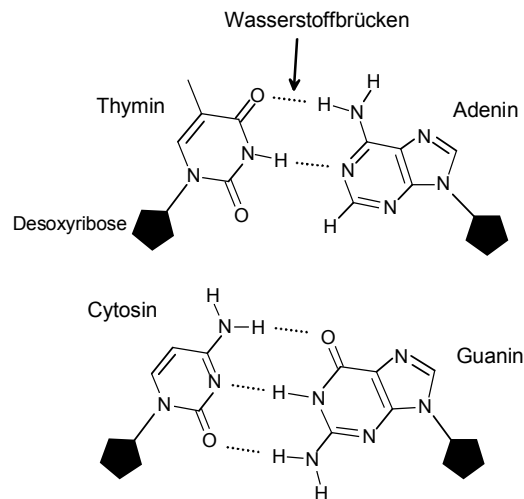
## b) Struktur von doppelsträngiger DNA und Oligonukleotiden

Die dreidimensionale Struktur, die so genannte Sekundärstruktur, war lange umstritten und wurde erst im Jahre 1953 durch James Watson und Francis Crick aufgeklärt. Nach ihrem Modell handelt es sich bei der DNA um zwei helikale Polynukleotidstränge, die sich entgegengesetzt um eine gemeinsame Achse winden (**Abbildung 1.3**)



**Abbildung 1.3.** Darstellung der von James Watson und Francis Crick gefundenen Doppelhelix-Struktur der DNA.

Jeder dieser Einzelstränge ist dabei über Wasserstoff-Brücken zwischen den komplementären Basen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin, die sich im Inneren der Helix befinden, verbunden (**Abbildung 1.4**).



**Abbildung 1.4.** Verknüpfung der Basen über Wasserstoff-Brücken.

Eine zusätzliche Stabilisierung der Struktur erfolgt dadurch, dass die einzelnen Basen, die sich nahe am Zentrum der zyklischen Helix befinden, senkrecht zur helikalen Achse gestapelt werden. Das Rückgrat der Helix wird durch die Zucker und den Phosphatrest gebildet, die sich an der Außenseite der Helix befinden. Es können beliebig viele Basen miteinander verknüpft werden. Dadurch wird die genetische Information gespeichert. Ausgehend von dieser Grundstruktur können mehrere Formen der doppelsträngigen DNA abgeleitet werden. Man unterscheidet dabei zwischen der so genannten A-, B-, C-, T-, und Z-Form der DNA.

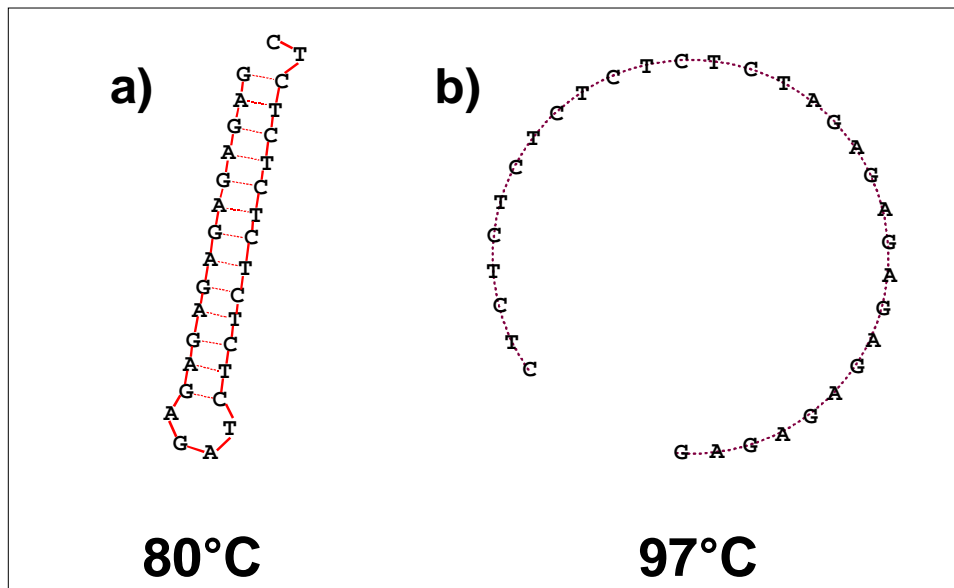
Die beiden Stränge der DNA Doppelhelix können durch Trennung der Wasserstoff-Brücken gebrochen werden. Dies kann entweder durch Erwärmung einer DNA-Lösung oder durch Säure- bzw. Alkalizugabe, die eine Ionisation der Basen zur Folge hat, erfolgen. Dieses Aufwinden der Doppelhelix wird als Schmelzen bezeichnet, da es plötzlich bei einer bestimmten Temperatur erfolgt. Der Schmelzpunkt der DNA hängt dabei stark von der Basenzusammensetzung ab, wobei der Schmelzpunkt umso höher ist, je höher der GC-Anteil an der Sequenz ist. So erhöht sich z.B. der Schmelzpunkt von 77°C auf 100°C, wenn der Anteil der GC-Paare von 20% auf 78% ansteigt [11].

Im Gegensatz zur DNA sind Oligonukleotide kovalent gebundene Ketten von Nukleotiden, deren Länge im Bereich zwischen 2 bis ca. 100 Basen liegt (**Abbildung 1.2**). Neben ihrer im Vergleich zur DNA und RNA reduzierten Länge unterscheiden sich Oligonukleotide gegenüber DNA hauptsächlich dadurch, dass sich komplementäre Basen (A-T, C-G) nicht durch Wasserstoffbrücken zu zwei helikalen

Polynukleotidsträngen, die sich um eine gemeinsame Achse winden, zusammenlagern. Dadurch liegen Oligonukleotide als unverzweigte Ketten vor, die durch das Zucker-Phosphat-Rückgrat stabilisiert werden.

Im Unterschied zur klassischen doppelsträngigen DNA zeigen Oligonukleotide eine ausgeprägte Tendenz, nicht nur intermolekulare Wechselwirkungen mit einer komplementären Sequenz eines zweiten Stranges, sondern auch intramolekulare Wechselwirkungen mit bestimmten geeigneten Abschnitten ihrer eigenen Basensequenz einzugehen. Daraus resultieren zusätzliche Sekundärstrukturen, deren Art und Ausmaß stark sequenzabhängig sind, wobei vorwiegend selbstkomplementäre Nukleotide mit einem hohen Guanosinanteil zu solchen Sekundärstrukturen neigen.

In der Folge kann es zur Ausbildung von intermolekularen Dimeren, zu Haarnadelstrukturen oder zur Ausbildung von Aggregaten kommen. Diese Sekundärstrukturen haben dabei einen erheblichen Einfluss auf das Retentionsverhalten der Oligonukleotide. Durch die Auswahl geeigneter denaturierender Bedingungen (erhöhte Temperatur [12], hoher pH-Wert [12] oder die Zugabe von denaturierenden Agentien wie Harnstoff oder Formamid [13]) kann die Ausbildung dieser Sekundärstrukturen jedoch weitgehend unterdrückt werden. Je nach Sequenz des Oligonukleotids können diese Haarnadelstrukturen jedoch auch bei sehr hohen Temperaturen extrem stabil sein. In **Abbildung 1.5** ist die simulierte Struktur eines 32mer Oligonukleotids dargestellt, das eine extrem stabile Haarnadelstruktur ausbildet. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, ist die Haarnadelstruktur auch bei 80°C (**Abbildung 1.5 (a)**) noch stabil und erst bei einer Temperatur von 97°C tritt eine vollständige Entfaltung des Oligonukleotids auf. Somit sind die intramolekularen Wechselwirkungen deutlich stabiler als die intermolekularen Wechselwirkungen.



**Abbildung 1.5.** Simulation einer Haarnadelstruktur (GAG AGA GAG AGA GAG ATC TCT CTC TCT CTC TC) bei  $T=80^{\circ}\text{C}$  und  $T=97^{\circ}\text{C}$  via Vienna RNA Package [14].

### 1.2.2. Struktur und Funktion von Aminosäuren, Proteinen und Peptiden

Proteine und Peptide spielen in fast allen biologischen Prozessen bei Mensch und Tier eine entscheidende und bedeutende Rolle [11].

Umfangreiche Untersuchungen der Biochemie haben ergeben, dass nahezu alle relevanten chemischen Reaktionen in biologischen Systemen durch spezifische Makromoleküle, die man als Enzyme bezeichnet, katalysiert werden. Es hat sich dabei gezeigt, dass fast alle bekannten Enzyme Proteine sind. Ein weiteres wichtiges Aufgabenfeld spezifischer Proteine liegt in der Speicherung und dem Transport von kleinen Molekülen und Ionen im Körper. So wird z.B. Sauerstoff in den Erythrocyten mittels Hämoglobin transportiert, während diese Aufgabe in den Muskeln durch das verwandte Protein Myoglobin wahrgenommen wird. Weitere wichtige Aufgaben kommen dem Transferrin und Ferritin zu, die für den Transport des Eisens im Blutplasma und dessen Speicherung in der Leber zuständig sind. Daneben erfüllen Proteine wichtige Aufgaben bei der Immunabwehr, der Erzeugung und Übertragung von Nervenimpulsen (Acetylcholin), der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung

(Hormone wie Insulin oder Thyreotropin), mechanischen Stützfunktionen (Zugfestigkeit von Haut und Knochen durch Faserprotein Kollagen) oder der koordinierten Bewegung (Proteine als Hauptbestandteil des Muskelgewebes).

### a) Struktur und Eigenschaften von Aminosäuren

Sowohl Proteine als auch Peptide sind aus elementaren Struktureinheiten, den Aminosäuren, aufgebaut. Eine Aminosäure besteht aus einer Aminogruppe ( $-\text{NH}_2$ ), einer Carboxylgruppe ( $-\text{COOH}$ ) und einem Rest R, anhand dessen man verschiedene Aminosäuren unterscheidet. Je nachdem ob sich die Aminogruppe am 2., 3. oder 4. Kohlenstoffatom befindet, unterscheidet man zwischen  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Aminosäuren. Aminosäuren, welche die Grundlage für natürlich vorkommende Proteine und Peptide bilden, werden als proteinogene (proteinaufbauende) Aminosäuren bezeichnet. Da alle Aminosäuren mit Ausnahme des Glycins in  $\alpha$ -Position zur Carboxylgruppe ein chirales (asymmetrisches) Kohlenstoffatom besitzen, existieren von jeder Aminosäure zwei Enantiomere, wobei bei proteinogenen Aminosäuren jedoch nur die L-Form vom menschlichen Organismus synthetisiert und verwendet werden kann. Beim menschlichen Organismus unterscheidet man 20 verschiedene genetisch codierte proteinogene Aminosäuren (**Abbildung 1.6**). Von diesen 20 Aminosäuren können 12 vom menschlichen Organismus selbst synthetisiert werden, wohingegen die restlichen 8 Aminosäuren (essentielle Aminosäuren) durch die Nahrung aufgenommen werden müssen. Benannt werden die Aminosäuren, neben ihren herkömmlichen Namensbezeichnungen, auch durch eine vereinfachte Ein- bzw. Drei-Buchstaben-Nomenklatur.



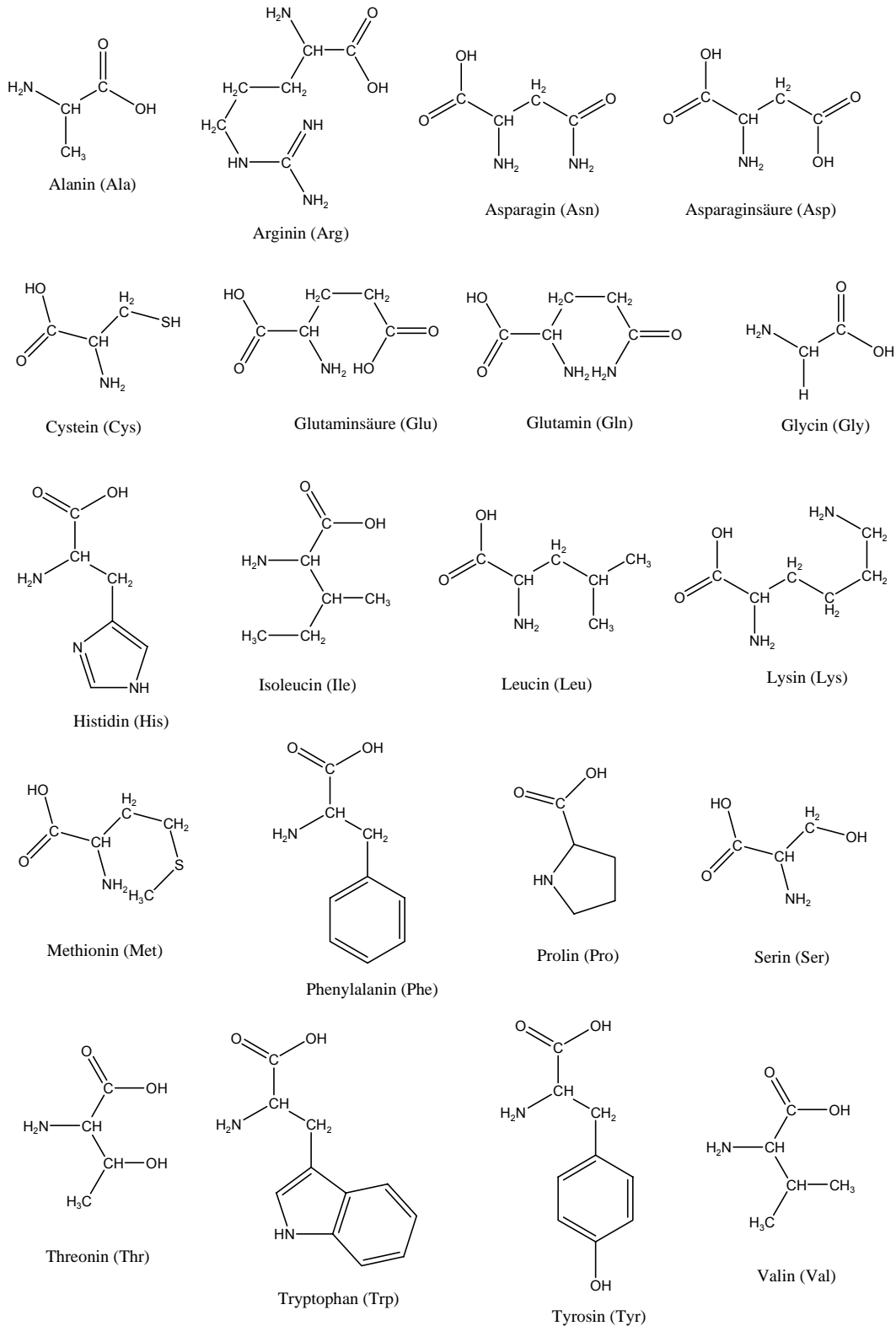


Abbildung 1.6. Strukturen der 20 proteinogenen Aminosäuren.

Man klassifiziert die Aminosäuren anhand ihrer Seitenketten in:

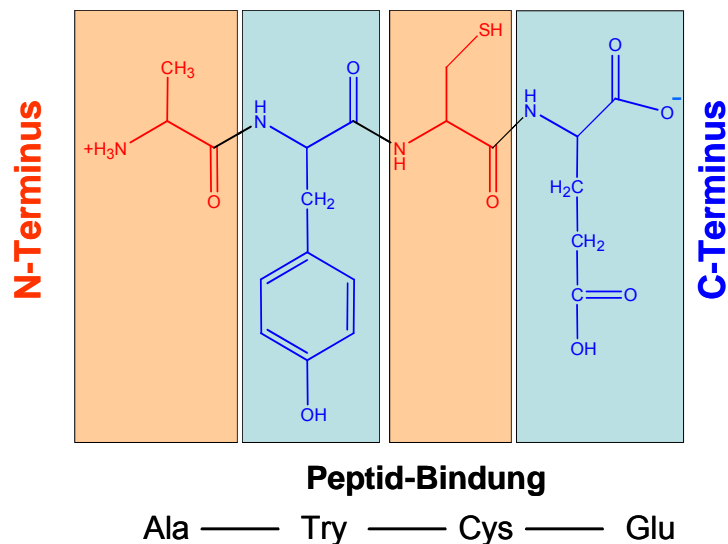
- aliphatische Aminosäuren: Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I)
- Hydroxyaminosäuren: Ser (S), Thr (T)

- Aminodicarbonsäuren: Asp (D), Glu (E)
- Aminodicarbonsäureamide: Asn (N), Gln (Q)
- basische Aminosäuren: Lys (K), Arg (R), His (H)
- schwefelhaltige Aminosäuren: Cys (C), Met (M)
- aromatische bzw. heteroaromatische Aminosäuren: Phe (F), Tyr (Y), Trp (W)

Da Aminosäuren sowohl eine saure als auch eine basische funktionelle Gruppe besitzen, werden sie als Ampholyte bezeichnet. Daher können Aminosäuren sowohl in sauren als auch basischen Lösungsmitteln gelöst werden.

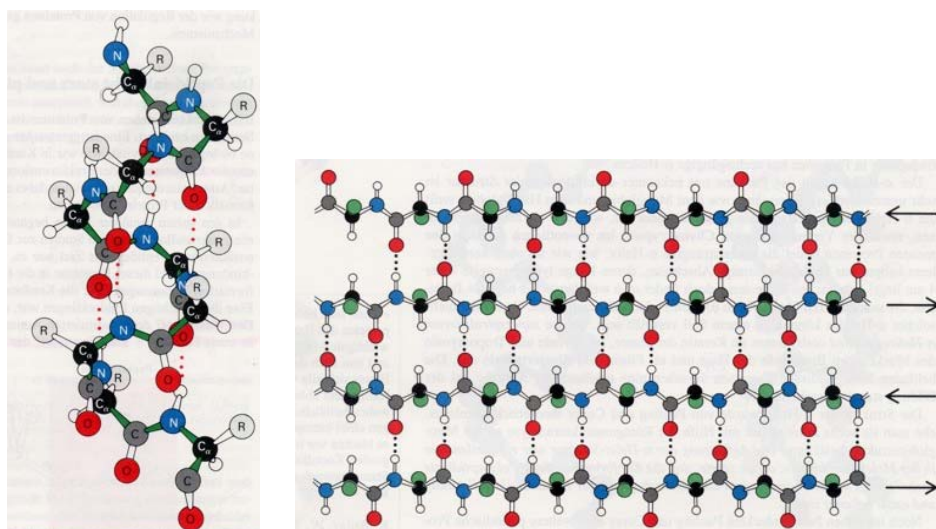
### b) Struktur und Eigenschaften von Proteinen und Peptiden

Proteine und Peptide entstehen dadurch, dass sich die  $\alpha$ -Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der  $\alpha$ -Aminogruppe einer weiteren Aminosäure durch eine Peptidbindung (Amidbindung) miteinander verknüpft. Die Verknüpfung der beiden Aminosäuren zum Dipeptid erfolgt dabei unter Abspaltung eines Wassermoleküls. Je nachdem, wie viele Aminosäuren auf diese Weise zu einer Polypeptidkette miteinander verknüpft sind, unterscheidet man zwischen Peptiden (2-100 Aminosäuren) und Proteinen (>100). Wie Nucleinsäuren besitzen auch die Polypeptidketten eine bestimmte Richtung, da sie über zwei unterschiedliche Enden verfügen. Man unterscheidet zwischen dem N-Terminus (Aminogruppe) und dem C-Terminus (Carboxylgruppe), wobei der N-Terminus stets als Beginn des Polypeptids angenommen wird. **Abbildung 1.7** zeigt beispielhaft die Struktur einer Peptidkette, die aus vier unterschiedlichen Aminosäuren (Ala-Try-Cys-Glu) aufgebaut ist. Die Anordnung verschiedener Aminosäuren in einer bestimmten Reihenfolge wird als Primärstruktur bezeichnet.



**Abbildung 1.7.** Peptidkette mit 4 unterschiedlichen Aminosäuren (Ala-Try-Cys-Glu).

Aufgrund der starren und planaren trans-Konfiguration von Peptidbindungen findet man bei Polypeptidketten bevorzugte räumliche Strukturen, die eine ganz charakteristische räumliche Anordnung benachbarter Aminosäuren nach sich zieht. Diese räumliche Anordnung der Polypeptidketten wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Die häufigsten in der Natur vorkommenden Typen der Sekundärstrukturen sind dabei die  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Faltblatt (**Abbildung 1.8**). Im Fall der  $\alpha$ -Helix liegt eine geschraubte Struktur vor, während beim  $\beta$ -Faltblatt eine fast planare Anordnung dominierend ist.



**Abbildung 1.8.** Schematische Darstellung einer  $\alpha$ -Helix und eines  $\beta$ -Faltblattes (Quelle: L. Stryer, Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 1996).

Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Helix ist die Polypeptidkette des  $\beta$ -Faltblatts fast vollständig gestreckt. Während bei der  $\alpha$ -Helix die axiale Entfernung zwischen benachbarten Aminosäuren ca. 0.15 nm beträgt, ist dieser Abstand beim  $\beta$ -Faltblatt ca. 0.35 nm lang. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Typen besteht darin, dass bei der  $\beta$ -Faltblattstruktur die Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken zwischen CO- und NH-Gruppen verschiedener Polypeptidketten erfolgt, während bei der  $\alpha$ -Helix diese Stabilisierung durch Wasserstoffbrücken derselben Kette erfolgt. Neben diesen beiden Typen unterscheidet man noch den  $\beta$ -Turn und ungeordnete Random-Coil Strukturen. Die durch die Aminosäuresequenz vorgegebenen aufeinander folgenden Sekundärstrukturen bilden schließlich die komplexe dreidimensionale Struktur des Polypeptids aus. Diese wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Diese dreidimensionalen Strukturen werden sowohl durch Disulfidbrücken (kovalente Bindungen zwischen Schwefelatomen zweier Cysteinreste) als auch durch nicht-kovalente Wasserstoffbrücken stabilisiert. Auch hydrophobe, ionische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen spielen bei der Struktur und Stabilisierung von Tertiärstrukturen eine bedeutende Rolle. Die Tertiärstruktur führt dazu, dass man Proteine in fibrilläre wasserunlösliche und globuläre wasserlösliche Proteine einteilt.

### 1.2.3. Chromatographische Trennmethoden für Biomoleküle

#### Flüssigchromatographie von Nukleinsäuren

Das in der heutigen Zeit am meisten genutzte Verfahren für die Trennung doppelsträngiger DNA-Moleküle und Oligonukleotide stellt das Verfahren der Elektrophorese in Polyacrylamid- oder Agarosegelen dar. Trotz ihrer hohen Trennleistung, der leichten Durchführbarkeit mit einfachen und kostengünstigen Mitteln und der Möglichkeit der simultanen Analyse mehrerer Proben stellt die Gelelektrophorese eine aufwändige und zeitintensive Methode dar. Ein weiterer Schwachpunkt dieses Analyseverfahren ist, dass keine Automatisierung möglich ist. Sowohl die Verwendung toxischer Chemikalien als auch die Probleme der Rückgewinnung der Probe aus den Gelen, die nur unter erheblichem Zeitaufwand realisiert werden kann, stellen weitere Nachteile dieses Verfahrens dar. Da die DNA

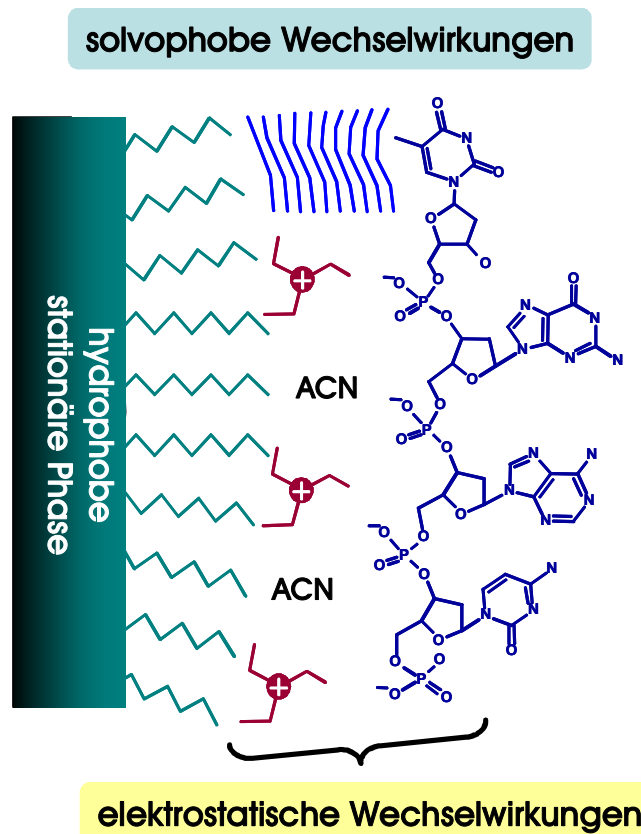
gleichzeitig nur in geringen Ausbeuten erhalten wird und zusätzlich oft auch noch mit Gelkomponenten verunreinigt ist, die eventuelle nachfolgende enzymatische Reaktionen inhibieren können, hat man bereits früh nach alternativen Trennverfahren gesucht.

Da sowohl die DNA als auch die Oligonukleotide Polynukleotide sind, besitzen diese eine Reihe von Eigenschaften, die ihre direkte Trennung durch verschiedene chromatographische Verfahren erlaubt.

- Oligonukleotide sind Polyanionen, die sich je nach Länge in ihrer Ladung unterscheiden, und können daher durch Ionenaustausch- und Ionenpaar-Chromatographie getrennt werden.
- Sie enthalten Nukleobasen, deren Zusammensetzung und Sequenz ihr Verhalten auf Umkehrphasen bestimmen.
- Sie können durch Größenausschlusschromatographie und Slalomchromatographie getrennt werden, sofern sie sich in ihrer Größe bzw. Flexibilität unterscheiden.

Während man bei der Trennung von Nukleinsäuren mittels Größenausschluss- und Slalom-Chromatographie nur geringe Selektivität erhält, konzentriert sich die Weiterentwicklung neuer stationärer Phasen auf die Anionenaustausch- und die Ionenpaar-Chromatographie [15,16] sowie die Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie (IP-RP-HPLC) [17-20] (**Abbildung 1.9**). Da die Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie in dieser Arbeit sowohl für die Trennung von Oligonukleotiden als auch für die Trennung von Proteinen und Peptiden verwendet wurde, wird ihr Prinzip nun näher erläutert.

In der Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie besteht das Trennsystem aus einer hydrophoben stationären Phase und einem hydroorganischen Eluenten, der ein amphiphiles Ion, ein üblicherweise kleines anorganisches Gegenion und einen organischen Modifier enthält (**Abbildung 1.9**).



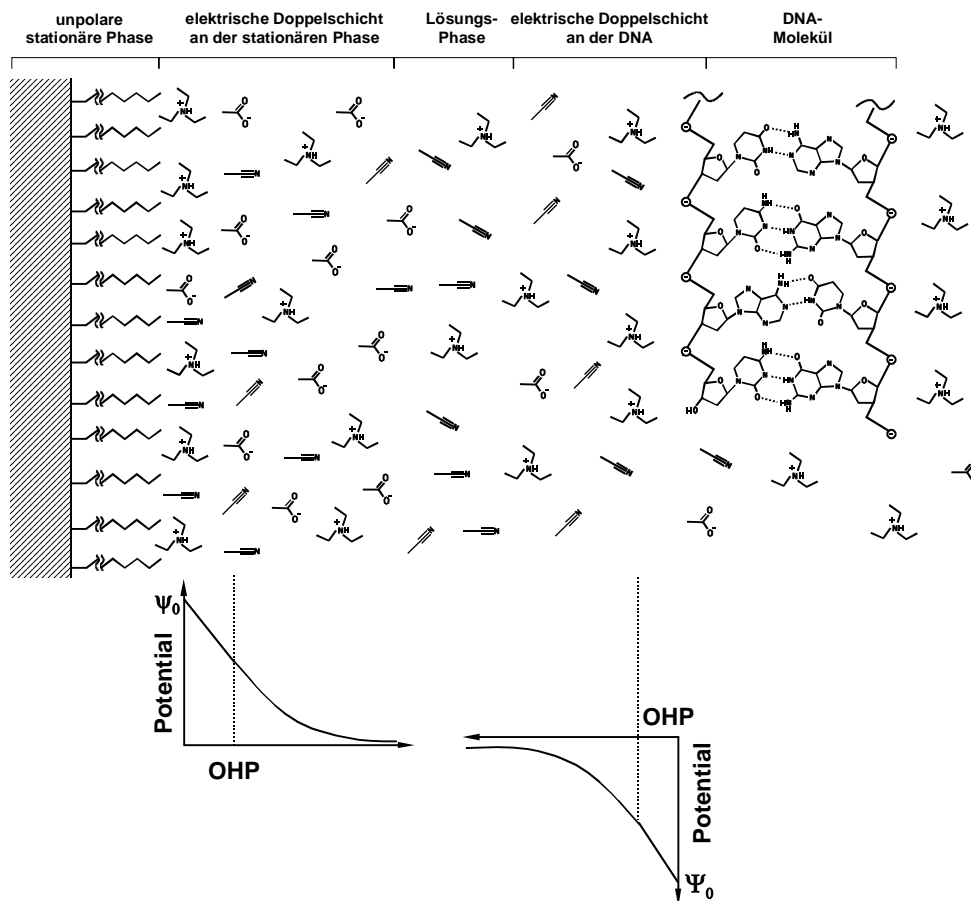
**Abbildung 1.9.** Mechanismus für die Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie von Oligonukleotiden.

Ein Amphiphil ist per Definition ein Molekül, das einen hydrophoben und einen hydrophilen geladenen Teil enthält. Für die Trennung von Oligonukleotiden (Anionen) werden dabei meist als Amphiphile Tri- bzw. Tetraalkylammoniumionen mit Alkylresten von Methyl bis Butyl verwendet. Da Nucleinsäuren einen  $pK_a$ -Wert von  $\leq 1$  aufweisen liegen diese somit als negativ geladenes Polyanion vor. Daher können die Nucleinsäuren mit ihren negativ geladenen Phosphatgruppen mit den positiv geladenen Alkylammoniumionen in Wechselwirkung treten. Als organische Modifier werden in der Nucleinsäureanalytik überwiegend Acetonitril, Methanol oder Isopropanol verwendet.

Prinzipiell sind in der Literatur drei verschiedene Modelle zur Beschreibung der Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgeführt.

Beim ersten Modell handelt es sich um das so genannte Ionenpaar-Modell [21-23]. In diesem Modell kommt es in einem ersten Schritt in der mobilen Phase zur Ausbildung eines Ionenpaars, welches anschließend aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Amphiphils mit der hydrophoben stationären Phase wechselwirkt.

Dadurch kommt es aufgrund von solvophoben Wechselwirkungen zur Adsorption an der stationären Phase und zur Ausbildung der positiven Oberflächenladung, mit der die Nukleinsäure wechselwirken kann. Neben diesem Ionenpaar-Modell wird in der Literatur noch ein weiteres Modell, das so genannte dynamische Ionenaustausch-Modell [24-26], diskutiert. Bei diesem Ansatz geht man davon aus, dass zunächst das Ionenpaarreagenz aufgrund seiner hydrophoben Oberfläche an der stationären Phase adsorbiert wird und dort zum Aufbau einer positiven Oberflächenladung führt. Mit dieser kann dann die Nukleinsäure wechselwirken. Neben diesen beiden stöchiometrischen Modellen wurde von Stahlberg [27,28] auch ein nicht-stöchiometrisches Modell zur Erklärung der IP-RP-HPLC eingeführt. Das Stahlberg-Modell wird auch als elektrostatisches Doppelschicht-Modell bezeichnet.



**Abbildung 1.10.** Potentialverlauf durch die elektrolytische Doppelschicht für Octadecylsilica als stationärer Phase.

Die Grundlage dieses Modells bildet dabei die Bildung einer elektrischen Doppelschicht an der Grenzschicht zwischen stationärer und mobiler Phase. Diese

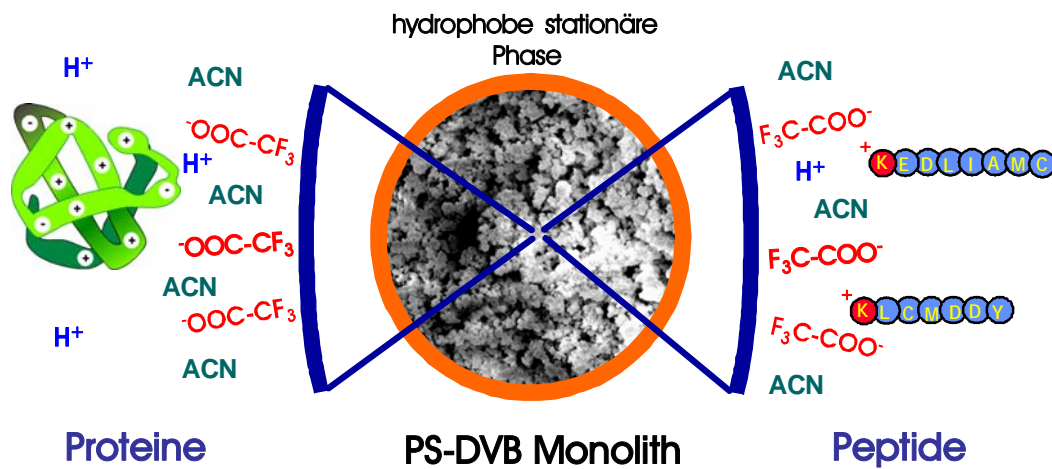
Doppelschicht wird durch die Adsorption des Ionenpaarreagens an der stationären Phase hervorgerufen (**Abbildung 1.10**). Das durch diese Überschussladungen erzeugte positive Oberflächenpotential führt nun dazu, dass es zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit den entgegengesetzt geladenen Analytmolekülen kommt. Dabei wird die Stärke der Wechselwirkungen sowohl von der Größe des Oberflächenpotentials als auch von der Größe der vorhandenen Kontaktfläche bestimmt. Erhöht man nun im Verlauf der Gradientelution die Konzentration an organischem Modifier, so verdrängt dieser das Ionenpaarreagenz von der Oberfläche der stationären Phase. Dadurch wird die Oberflächenladung herabgesetzt und es kommt zu einer längenabhängigen Elution der Nucleinsäuren. Da der organische Modifier gleichzeitig noch ein mehr oder weniger starker organischer Eluent ist, kommt es neben der Herabsetzung der Oberflächenladung auch noch zu direkten Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Bereich der Nucleinsäuren (**Abbildung 1.2**), was ebenfalls eine längen- und sequenzabhängigen Elution der Analytmoleküle nach sich zieht.

## Flüssigchromatographie von Proteinen und Peptiden

Prinzipiell können für die Trennung von Proteinen und Peptiden weitgehend die gleichen chromatographischen Verfahren wie für die Trennung von Nucleinsäuren verwendet werden, da auch Aminosäuren über funktionelle Gruppen verfügen, die je nach pH-Wert zu einer positiven bzw. negativen Ladung führen. Auch für Proteine und Peptide stellt die Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie ein leistungsfähiges Trennverfahren dar, wobei der Unterschied zur Analytik von Nucleinsäuren mittels (IP-RP-HPLC) nur durch das Vorzeichen der Oberflächenladung der stationären Phase beschrieben wird. Während bei der Nucleinsäureanalytik (Polyanion) überwiegend Tri- bzw. Tetraalkylammoniumionen eingesetzt werden (bewirken positive Oberflächenladung), verwendet man zur Trennung von Proteinen und Peptiden bevorzugt saure Amphiphile wie z.B. Trifluoressigsäure (TFA). Aufgrund von solvophoben Wechselwirkungen (vgl. Analytik der Nucleinsäuren) kommt es zur Adsorption des amphiphilen Ionenpaarreagens an der stationären Phase, und dadurch zur Ausbildung einer negativen Oberflächenladung. Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen



der geladenen Oberfläche und den geladenen Peptiden und Proteinen werden diese an der Oberfläche retardiert (**Abbildung 1.11**).



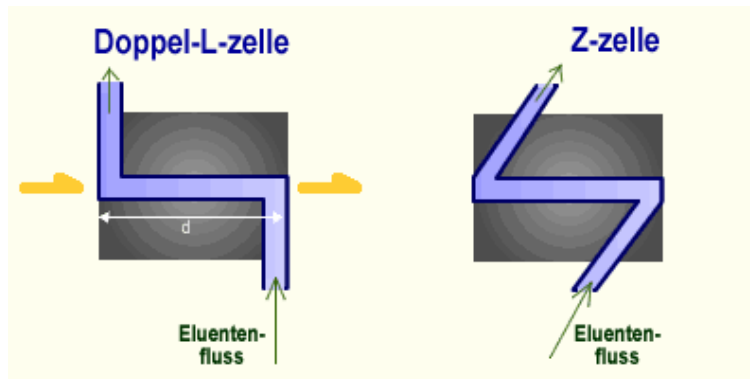
**Abbildung 1.11.** Mechanismus für die Ionenaar-Umkehrphasen-Chromatographie von Proteinen und Peptiden.

#### 1.2.4. Miniaturisierte Trenntechniken

Im Gegensatz zur konventionellen Chromatographie, die in ihren Ursprüngen auf den russischen Botaniker Mikhail Semenowitch Tswett (1872-1919) zurückgeht und von Horvath und Huber [29] in Form der modernen Hochleistungsflüssig-Chromatographie (HPLC) in den 60er Jahren eingeführt wurde, gehen erste Arbeiten im Bereich der Miniaturisierung von HPLC-Systemen auf das Ende der 70er Jahre zurück [30-32].

Die größten Vorteile dieser miniaturisierten Trenntechniken sind darin zu sehen, dass mit ihnen die Analytik sehr kleiner Probemengen problemlos möglich ist, und auch die Kopplung mit der Massenspektrometrie [33,34] realisiert werden konnte. Weiterhin verfügen moderne Mikro-HPLC-Säulen über sehr hohe Trennleistungen [35], die die Trennung hoch komplexer Probenmischungen, wie z.B. die Analytik menschlicher Wachstumshormone [36] oder die Anwendung in der Drogenanalytik [37-39], erlauben. Die erhöhte Trennleistung moderner Mikro-HPLC-Säulen kann durch ihre sehr homogene Packungsstruktur und ihre verringerte Flussdispersion erklärt werden.

Um Mikro-HPLC Anlagen leistungsfähig betreiben zu können, musste, neben der Entwicklung neuer miniaturisierter Pump- und Injektionssystem (siehe Testergebnisse des Ultimate 3000 Systems in Kapitel 3 dieser Arbeit), vor allem erhebliche Entwicklungsarbeit im Bereich der Detektorzellen gemacht werden, da durch die Miniaturisierung die Detektorvolumina von typischerweise ca. 10000 nl (konventionelle HPLC) auf wenige Nanoliter reduziert werden müssen.



**Abbildung 1.12.** Detektorzellen unterschiedlichen Designs für Anwendung in Mikro-HPLC-Systemen (Quelle: Staatsexamensarbeit Rainer Geiß, Inst. für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Univ. des Saarlandes, Saarbücken, 2005).

Prinzipiell unterscheidet man bei der UV/Vis-Detektion zwischen off- und on-column Detektion, wobei für die off-column-Detektion U- bzw. Z-Zellen (**Abbildung 1.12**) [7,31,40] oder Bubble-Zellen verwendet werden. Durch die spezielle Form der U- bzw. Z-Zellen, die aus einem einzigen Stück Silica-Kapillare gefertigt werden, wird es ermöglicht, dass trotz des stark reduzierten Volumens (bestimmt durch Innendurchmesser der Kapillare) ein ausreichend langer Lichtweg für die Absorption entsteht. Im Fall dieser Zelltypen wird der Lichtstrahl parallel zum Fluss eingestrahlt. Die Empfindlichkeit der Detektorzellen wird dabei durch die Länge der verwendeten Kapillaren bestimmt (Lambert-Beersches Gesetz:  $E=I/I_0=\epsilon \cdot c \cdot d$ ).

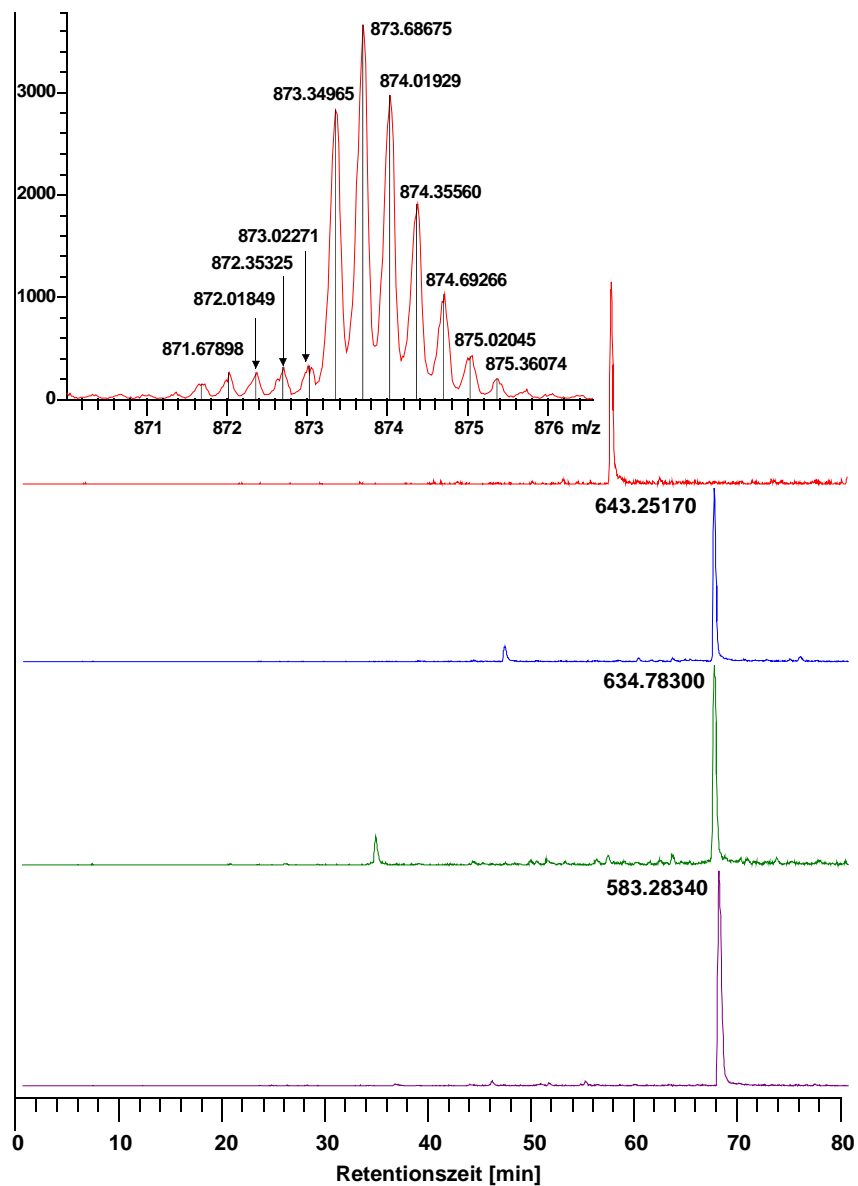
## 1.2.5. Massenspektrometrie

### Einleitung

Aufgrund der enormen Fortschritte der letzten Jahrzehnte hat sich die Massenspektrometrie [2] zu einem extrem leistungsfähigen Instrument der modernen Analytik entwickelt. Neben ihrer geringen Nachweisgrenze [3] zeichnet sich die Massenspektrometrie vor allem durch ihren hohen analytischen Informationsgehalt aus. In ihren Anfängen jedoch war das Einsatzgebiet der Massenspektrometrie, z.B. für die Analytik von Nukleinsäuren, aufgrund der polyanionischen Natur und der hohen molekularen Massen der Analyten, stark eingeschränkt. So wurden erste Studien an Oligonukleotiden mit einer Masse bis zu 5000 Da mittels „fast atom bombardment“ durchgeführt [41,42]. Den entscheidenden Durchbruch für die Anwendung der Massenspektrometrie für Biomoleküle brachte erst die Entwicklung der Elektrospray-Ionisation (ESI) und der Matrix-unterstützten Laser Desorption/Ionisation (MALDI) [43-45]. Mit diesen Techniken war erstmals die Analytik intakter Nukleinsäuren und Proteine sowie die Kopplung mit Flüssigphasentrenntechniken problemlos möglich.

Kapitel 2 dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung und Anwendung von neu entwickelten, langen PS/DVB-Monolithen (150-300 X 0.2 mm i.D) als Trennsäulen in der Bioanalytik. Zur Charakterisierung der Leistungsfähigkeit der neuen Trennmedien wurde ein komplexer BSA-Thyroglobulin-Verdau unter verschiedenen Bedingungen (Länge der Trennsäule, Variation von Gradientendauer und Flussrate) chromatographiert, und anhand der experimentellen Messdaten relevante Parameter wie Auflösung, Peakbreiten und Peakkapazitäten bestimmt. Die Komplexität der verwendeten Probe führte dazu, dass es zur Koelution zahlreicher Analyten (Peptide) kam. Daher war die Bestimmung der zur Charakterisierung notwendigen chromatographischen Parameter, wie z.B. der Peakbreiten, aus den reinen UV-Daten nicht mehr möglich. Daher wurde, zusätzlich zur UV-Detektion, ein hochauflösendes Micro-Tof-Massenspektrometer der Firma Bruker als Detektor verwendet, da es hiermit möglich war, trotz der Koelution zahlreicher Peptide über die Auswertung der Einzelionenspuren die notwendigen Daten zu erhalten. Die

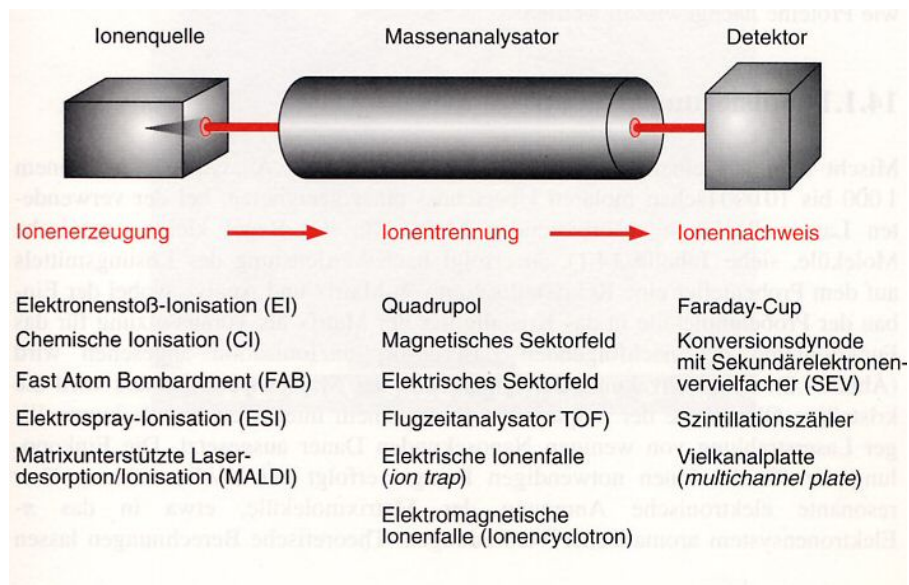
Bestimmung der Peakbreiten mittels Einzelionenspuren ist exemplarisch in **Abbildung 1.13** dargestellt.



**Abbildung 1.13.** Overlay von vier verschiedenen Peptiden (Einzelionenspuren) eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus, gemessen auf einem gekoppelten 210 X 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen. Die Auflösung des Massenspektrometers wird exemplarisch anhand eines Peptides mit dem m/z-Verhältnis von 873.68675 demonstriert.

Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers ist in **Abbildung 1.14** dargestellt. Im Wesentlichen besteht ein Massenspektrometer dabei aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Dabei ist die Ionenquelle für die Erzeugung der gasförmigen Ionen zuständig, während der Massenanalysator

die erzeugten Ionen hinsichtlich ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) auftrennt. Je nach Aufbau unterscheidet man zwischen dem Quadrupol-, dem Sektorfeld-, dem Flugzeit-, dem Ionenfallen- und dem Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer. Der Detektor wiederum ist für die eigentliche Erzeugung des Massenspektrums verantwortlich. Anhand dessen kann abgelesen werden, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet wurden.



**Abbildung 1.14.** Prinzipieller Aufbau eines Massenspektrometers, eingeteilt nach verschiedenen Komponenten (Quelle: Bioanalytik, F. Lottspeich, H. Zorbas, Spektrum Akad. Verlag, 1998).

Neben der Unterscheidung nach verschiedenen Massenanalysatoren ist vor allem die Ionisationstechnik entscheidend für die Einstufung des Massenspektrometers.

### Prinzip der Elektrospray-Ionisation

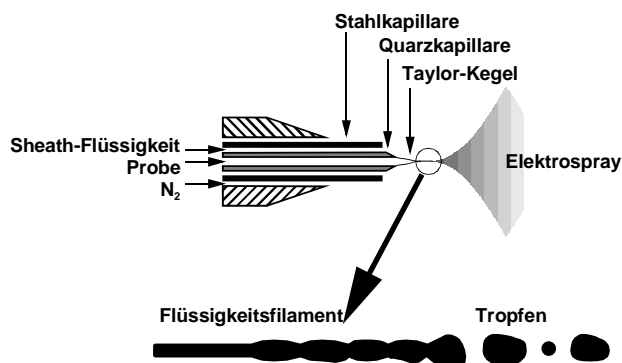
Die Elektrospray-Ionisation [46-49] hat sich seit ihrer Einführung als leistungsfähige und schonende Ionisationsmethode für die Analyse von Biomolekülen (Nukleinsäuren, Proteine, Peptide, Kohlenhydrate, Glykoproteine) etabliert. Dieses Ionisationsverfahren ist besonders für die Analytik biologischer Proben geeignet, da es in der Lage ist, hochmolekulare und thermisch nicht verdampfbare Moleküle ohne Fragmentierung in die Gasphase zu überführen. Dabei kann der eigentliche Elektrospray-Ionisationsprozess in zwei Prozesse gegliedert werden [50,51]:

- Die Bildung von elektrisch geladenen Tröpfchen aus der zuströmenden Probelösung
- Der Transfer von Ionen aus dem Tröpfchen in die Gasphase unter dem Einfluss eines starken elektrischen Feldes

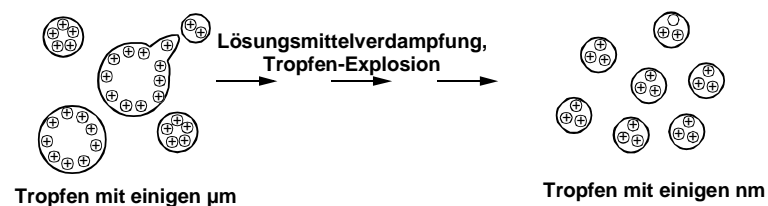
Das Grundprinzip der Elektrospray-Ionisation beruht darauf, dass die Probelösung kontinuierlich mit Flussraten im Bereich von wenigen Mikrolitern bis hin zu wenigen Nanolitern pro Minute in die Quelle, in der Atmosphärendruck herrscht, gepumpt und dort mit Hilfe eines Zerstäubergases vernebelt wird. Dieser Umstand prädestiniert diese Ionisationsform besonders für die Kopplung mit der Flüssigchromatographie. Zusätzlich wird durch Anlegen eines elektrischen Potentials (einige kV) an die Transferkapillare eine Elektrolyse der flüssigen Phase angeregt, an deren Ende die Bildung von Überschussladungen steht. Ob dabei positiv oder negativ geladene Überschussladungen entstehen, kann durch die Polarität der angelegten Spannung gesteuert werden (**Abbildung 1.15 (a)**). Durch die Abstoßung der gleichnamig geladenen Ladungen kommt es zur Reduktion der Oberflächenspannung, was zur Ausbildung des so genannten Taylor-Kegels führt. Dieser nun geht in ein dünnes Flüssigkeitsfilament über, aus dem sich schließlich aufgrund der mechanischen Flussinstabilität einzelne Tröpfchen bilden. Durch permanentes Verdampfen des Lösemittels (**Abbildung 1.15 (b)**) kommt es zu immer stärkerem Schrumpfen der Tröpfchen, bis schließlich die Rayleigh-Grenze überschritten wird, bei der die elektrostatische Abstoßung der Tröpfchen größer ist als die Oberflächenspannung. Dies wiederum führt zum Zerplatzen der Tröpfchen und zur Bildung weiterer, kleiner Flüssigkeitströpfchen, aus denen sich anschließend Ionen bilden. Für die Bildung dieser Ionen (**Abbildung 1.15 (c)**) haben sich in der Literatur zwei verschiedene Modelle etabliert. Im dem von Dole et al. eingeführten Charged-Residue-Modell schrumpfen die Tröpfchen so lange weiter, bis letztlich jeweils nur ein Ion pro Tröpfchen übrig bleibt [52]. Im Gegensatz dazu geht das von Iribarne und Thomson vorgeschlagene Ionen-Evaporations-Modell davon aus, dass Flüssigkeitströpfchen durch Abschnürung in kleinere Tröpfchen überführt werden [53], und durch diesen kontinuierlichen Vorgang der Radius des Tröpfchens stetig sinkt, bis letztlich aufgrund von Größe und Oberflächenladungsdichte das elektrostatische Feld an der

Tröpfchenoberfläche ausreichend stark ist, um die Solvatationsenergie der Ionen an der Oberfläche zu überwinden. Dadurch wird das Ion schließlich in die Gasphase überführt.

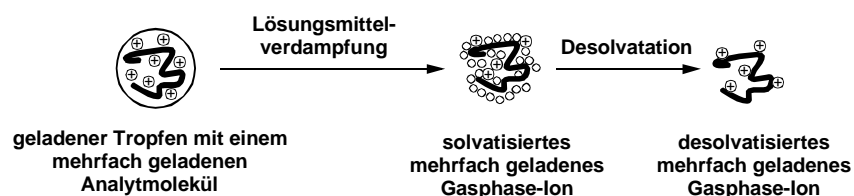
**(a) Bildung von geladenen Tröpfchen**



**(b) Schrumpfen der Tröpfchen**



**(c) Bildung von Ionen in der Gasphase**



**Abbildung 1.15.** Schematische Darstellung des ESI-Prozesses im positiven Modus. (a) Taylor-Kegel und Flüssigkeitsfilament am Ende der Kapillare, (b) Verdampfung des Lösemittels und Schrumpfen der Tröpfchen, (c) Bildung der Gasphasen-Ionen.

Nachdem die so erzeugten Ionen im Vakuum von restlichen Lösemittelmengen befreit wurden, werden sie durch das elektrische Feld fokussiert und zum Analysator transportiert. Üblicherweise ist der Messbereich von Massenspektrometern je nach Massenselektor auf  $m/z$ -Verhältnisse bis zu 3500  $m/z$  (Quadrupol bzw. Ionenfalle) oder maximal 20000  $m/z$  (ToF) limitiert. Dadurch, dass diese Ionisationsmethode das Entstehen mehrfach geladener Ionen erlaubt, können jedoch auch große

Biomoleküle mit hohen Massen analysiert werden. Da die Massenspektrometrie nicht nach der reinen Masse, sondern nach dem Verhältnis von Masse  $m$  zu Ladung  $z$  ( $m/z$ ) diskriminiert, kann so z.B. auch ein Oligonukleotid mit einer Länge von 39 Nucleotiden und einer Masse von ca. 12.000 Da aufgrund einer Ladung von 14- bei einem  $m/z$ -Verhältnis von ca. 900 detektiert werden.

### Prinzip der Flugzeit-Massenspektrometrie

Eines der modernsten und leistungsfähigsten Massenspektrometer ist das so genannte Flugzeit-Massenspektrometer (ToF, time of flight) (**Abbildung 1.16**). Das Grundprinzip der Massenbestimmung beruht bei diesem Massenanalysator auf der sehr präzisen elektronischen Messung der Flugzeit (Strecke zwischen Ionenquelle und Detektor) der im Hochvakuum erzeugten Ionen. Unter Verwendung eines elektrostatischen Feldes ( $E_{el.} = z \cdot e \cdot U$ ) von einigen keV werden die in der Quelle erzeugten Ionen auf eine kinetische Energie der Größe  $E_{kin.} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$  beschleunigt. Nach dem Verlassen der Ionenquelle durchlaufen die beschleunigten Ionen eine bestimmte Wegstrecke im feldfreien Raum und werden dort nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt. Eine Auftrennung der Ionen nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis ist daher möglich, da bei gleicher Beschleunigungsspannung Ionen mit unterschiedlichen Massen auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt werden. Aus der bekannten Beschleunigungsspannung und der Flugstrecke (ca. 1-4 m) kann nun mit Hilfe der gemessenen Flugzeit (von wenigen  $\mu s$  bis zu 100  $\mu s$ ) mit Hilfe der Bewegungsgleichung der Mechanik ( $v = s \cdot t^{-1}$ ) das  $m/z$ -Verhältnis der zu analysierenden Ionen wie folgt bestimmt werden:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U \cdot t^2}{s^2}$$

$m$  = Masse der Ions [kg]

$z$  = Ladungszahl

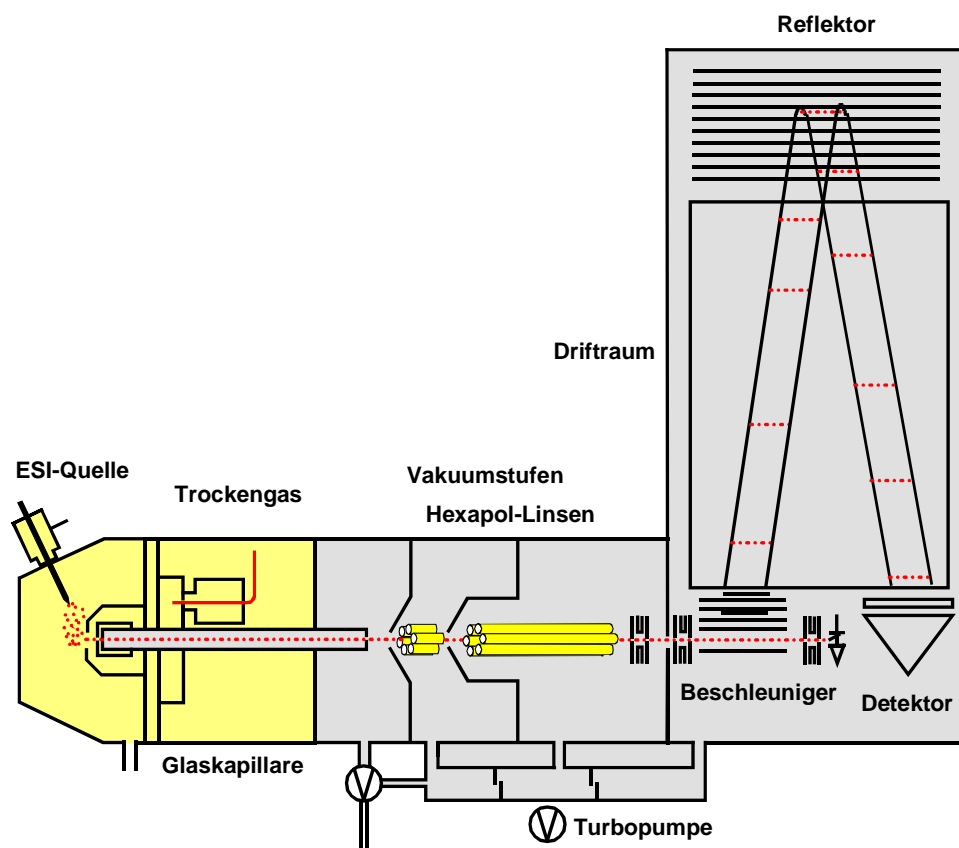
$U$  = Beschleunigungsspannung [V]

$t$  = Zeit [s]

$s$  = Flugstrecke [m]

$e$  = Elementarladung [C]





**Abbildung 1.16.** Schematischer Aufbau des verwendeten „micro-ToF“-Flugzeit-Massenspektrometers (Quelle: Diplomarbeit Andreas Leinenbach, Inst. für Instr. Analytik und Bioanalytik, Univ. des Saarlandes, Saarbrücken, 2005).

Die größten Vorteile des Flugzeit-Massenspektrometers sind das hohe Auflösungsvermögen (bis zu 10.000), die hohe Genauigkeit der Massenbestimmung (bis zu 2 ppm), die hohe Scangeschwindigkeit sowie der große detektierbare Massenbereich (50 bis 20.000 m/z).

### Kopplung der Massenspektrometrie mit der HPLC

Wie aus den vorangegangenen Kapiteln ersichtlich, stellen sowohl die Mikro-HPLC als auch die Massenspektrometrie, jedes für sich, extrem leistungsfähige und unverzichtbare Instrumente der modernen Bioanalytik dar. Ein weiterer erheblicher Fortschritt wurde dadurch erzielt, dass es gelungen ist, diese beiden effizienten Verfahren miteinander zu verbinden. Dabei hat sich vor allem die Elektrospray-Ionisation wegen ihrer Fähigkeit, Ionen aus der flüssigen Phase schonend und

unfragmentiert in die Gasphase zu überführen, in Kombination mit der Mikro-HPLC und ihren niedrigen Flussraten als besonders geeignet erwiesen. Das größte Problem bei der Kopplung beider Verfahren ist oft in der Unverträglichkeit der in der HPLC verwendeten Laufmittelzusätze zu sehen. So sind z.B. die in der Protein- und Peptidanalytik gebräuchlichen Laufmittelzusätze, wie Phosphorsäure oder Trifluoressigsäure, schlecht oder nur in sehr geringen Konzentrationen für die Massenspektrometrie geeignet. Auch Salze, nicht flüchtige organische Verbindungen oder starke Elektrolyte können zu Verstopfungen der Sprayquelle führen oder wirken sich negativ auf die Leistungsfähigkeit des Massenspektrometers aus und müssen durch Alternativen ersetzt werden. Einige weiterführende Arbeiten zu diesem Thema wurden von H. Toll im Bereich der Proteine und Peptid-Analytik [54] und von B. M. Mayr im Bereich der Nukleinsäureanalytik [55] durchgeführt.

### **1.2.6. Zielsetzung dieser Arbeit**

#### **Entwicklung eines Modells zur Retentionszeitvorhersage synthetischer Oligonukleotide**

Ziel dieser Arbeit war es, ein universell einsetzbares Retentionszeitvorhersagemodell für Oligonukleotide in der IP-RP HPLC zu entwickeln, das unabhängig von experimentellen Parametern wie mobiler und stationärer Phase oder Trenntemperatur das Retentionsverhalten von Oligonukleotiden vorhersagt. Ein besonderer Schwerpunkt sollte dabei darauf liegen, dass dieses neue Modell auch schwer zugängliche strukturelle Eigenschaften der Analyten berücksichtigt und in die Vorhersage einbezieht. Dazu wurde das im Bereich der Informatik und Mathematik bereits für die verschiedensten Anwendungen genutzte Verfahren der Supportvektormaschinen (SVMs) für die Vorhersage der Retention von Oligonukleotiden unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen (Säule, Temperatur) angewendet. Die Leistungsfähigkeit des neuen Vorhersagemodells wurde anhand einer komplexen Realprobe, bestehend aus 7 biologisch relevanten

Multiplex-PCR-Primern, bzw. verschiedener Haarnadelstrukturen, die auch bei erhöhten Temperaturen stabil sind, untersucht.

### **Untersuchung der Leistungsfähigkeit langer PS/DVB-Monolithen für die Trennung komplexer Bioanalyten mittels IP-RP-HPLC**

In diesem Teil der Arbeit sollte versucht werden, die bestehenden und etablierten Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen (60 X 0.2 mm i.D.) soweit zu verbessern, dass diese für die hohen Ansprüche der modernen analytischen Fragestellungen (hohe Peakkapazitäten bei hoher Trenneffizienz) geeignet sind. Diese geforderte Steigerung der Peakkapazität und Trenneffizienz sollte dabei durch Verwendung langer PS/DVB-Monolithen (150-300 X 0.2 mm i.D.) sowie langer Gradientzeiten erreicht werden.

Um lange PS/DVB-Trennsäulen zu erhalten, konnte jedoch das von Huber *et. al.* entwickelte Syntheseprotokoll [56] nicht übernommen werden, da es damit bei längeren Monolithen zum Auftreten von Inhomogenitäten innerhalb der stationären Phase kam. Da ein entscheidender Faktor für die Leistungsfähigkeit eines Polymer-Monolithen in der Homogenität seiner stationären Phase zu sehen ist, wurde der Polymerisationsprozess für lange PS/DVB-Monolithen systematisch auf das Auftreten solch störender Inhomogenitäten hin untersucht. Dadurch wurde der Herstellungsprozess soweit optimiert, dass das Auftreten dieser Inhomogenitäten auch bei langen Monolithen vermieden werden konnte.

Die so verbesserten langen PS/DVB-Monolithen wurden im zweiten Teil dieser Arbeit mittels verschiedener Bioanalyten sowie UV- und MS-Detektion auf ihre chromatographische Leistungsfähigkeit hin untersucht. Für diese Charakterisierung wurde dabei der Einfluss der Säulenlänge, der Gradientdauer, der Flussrate und der Säulenkopplungstechnik auf die Peakkapazität, die relative Retention, die Peakbreite, die Auflösung und die Trenneffizienz untersucht.

### 1.2.7. Literatur zum Allgemeinen Teil

1. M. Novotny, *J. Chromatogr. B*, 689 (1997) 55.
2. P. Price, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2 (1991) 336.
3. P. E. Andren, M. R. Emmett and R. M. Caprioli, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5 (1994) 867.
4. K. B. Tomer, M. A. Moseley, L. J. Deterding and C. E. Parker, *Mass Spectrom. Rev.*, 13 (1994) 431.
5. A. Premstaller, H. Oberacher and C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4386.
6. J. P. Chervet, C. J. Meijvogel, M. Ursem and J. P. Salzmänn, *LC GC*, 10 (1992) 140.
7. J. P. Chervet, M. Ursem and J. P. Salzmänn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1507.
8. F. Svec, T. Tennikova and Z. Deyl, *Monolithic Materials*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
9. A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A.-M. Timperio, L. Zolla, J.-P. Chervet, N. Cavusoglu, A. Van Dorsselaer and C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2390.
10. W. Walcher, H. Oberacher, S. Troiani, G. Hölzl, P. Oefner, L. Zolla and C. G. Huber, *J. Chromatogr. B*, 782 (2002) 111.
11. L. Stryer, *Biochemistry*, 4th edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1995.
12. M. W. Germann, R. T. Pon and J. Sande van de, *Anal. Biochem.*, 165 (1987) 399.
13. K. Majumder, P. K. Latha and S. K. Brahmachari, *J. Chromatogr.*, 355 (1986) 328.

14. I. Hofacker, *Vienna RNA Package, RNA Secondary Structure Prediction and Comparison* [Web Page], April 2006. Available at <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/>, accessed June 2006.
15. Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige and K. Matsubara, *J. Chromatogr.*, 265 (1983) 342.
16. E. Westman, S. Eriksson, T. Laas, P.-A. Pernemalm and S.-E. Skold, *Anal. Biochem.*, 166 (1987) 158.
17. C. G. Huber, P. J. Oefner and G. K. Bonn, *Anal. Biochem.*, 212 (1993) 351.
18. C. G. Huber, P. J. Oefner, E. Preuss and G. K. Bonn, *Nucleic Acids Res.*, 21 (1993) 1061.
19. S. Eriksson, G. Glad, P.-A. Pernemalm and E. Westman, *J. Chromatogr.*, 359 (1986) 265.
20. W. Haupt and A. Pingoud, *J. Chromatogr.*, 260 (1983) 419.
21. C. Horvath, W. Melander, I. Molnar and P. Molnar, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 2295.
22. C. Horvath, W. Melander and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 129.
23. E. Tomlinson, T. M. Jefferies and C. M. Riley, *J. Chromatogr.*, 159 (1978) 315.
24. J. C. Kraak, K. M. Jonker and J. F. K. Huber, *J. Chromatogr.*, 142 (1977).
25. N. E. Hoffman and J. C. Liao, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 2231.
26. P. T. Kissinger, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 883.
27. A. Bartha and J. Stahlberg, *J. Chromatogr. A*, 668 (1994) 255.
28. J. Stahlberg, *J. Chromatogr.*, 356 (1986) 231.
29. J. F. K. Huber and J. A. R. J. Hulsmann, *Anal. Chim. Acta*, 38 (1967) 305.
30. T. Tsuda and M. Novotny, *Anal. Chem.*, 50 (1978) 632.

31. D. Ishii, K. Asai, K. Hibi, T. Jonokuchi and M. Nagaya, *J. Chromatogr.*, 144(2) (1977) 157.
32. R. P. W. Scott and P. Kucera, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 251.
33. W. M. A. Niessen and J. van der Greef, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.
34. A. L. Yergey, C. G. Edmonds, I. A. S. Lewis and M. L. Vestal, *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry-Techniques and Applications*, Plenum Press, New York, 1990.
35. K.-E. Karlsson and M. Novotny, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1662.
36. J. E. Battersby, A. W. Guzzetta and W. S. Hancock, *J. Chromatogr. B*, 662 (1994) 335.
37. J. Cai and J. Henion, *J. Chromatogr. B*, 691 (1997) 357.
38. L. Johansson, H. Karlsson and K.-E. Karlsson, *J. Chromatogr.*, 712 (1995) 149.
39. B. L. Ackermann, T. A. Gillespie, A. Todd, B. T. Regg, K. F. Austin and J. E. Coutant, *J. Mass Spectrom.*, 31 (1996) 681.
40. T. Tsuda, K. Hibi, T. Takeuchi and D. Ishii, *J. Chromatogr.*, 158 (1978) 227.
41. D. L. Vollmer and M. L. Gross, *J. Mass Spectrom.*, 30 (1995) 113.
42. L. Grotjahn and L. C. E. Taylor, *Org. Mass Spectrom.*, 20 (1985) 146.
43. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2299.
44. E. Nordhoff, F. Kirpekar and P. Roepstorff, *Mass Spectrom. Rev.*, 15 (1996) 76.
45. K. J. Wu, T. A. Shaler and C. H. Becker, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1637.
46. J. F. Banks and C. M. Whitehouse, *Methods Enzymol.*, 270 (1996) 486.
47. R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga and H. R. Udseth, *Anal.*

- Chem.*, 62 (1990) 882.
48. M. Yamashita and J. B. Fenn, *J. Chem. Phys.*, 88 (1984) 4451.
  49. M. Yamashita and J. B. Fenn, *Phys. Chem.*, 88 (1988) 4671.
  50. R. B. Cole, *Electrospray Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation & Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
  51. P. Kebarle and Y. Ho, in R. B. Cole (Editor), *Electrospray Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation & Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997, p. 3.
  52. M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, *J. Chem. Phys.*, 49 (1968) 2240.
  53. J. V. Iribarne and A. Thomson, *J. Chem. Phys.*, 64(6) (1976) 2287.
  54. H. Toll, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Saarbrücken, Germany, 2005.
  55. B. M. Mayr, Universität der Saarlandes, Saarbrücken, Saarbrücken, Germany, 2005.
  56. C. G. Huber, A. Premstaller and H. Oberacher, *Method and Apparatus for Separating Polynucleotides Using Monolithic Capillary Columns*, US patent application U. S., 60/178.553 .

# Kapitel 2

---

**Charakterisierung und  
Anwendung langer PS/DVB-  
Monolithen**

---



## 2. Lange und kurze PS/DVB-Monolithen für die Trennung von Bioanalyten in der IP-RP-HPLC

### 2.1. Einführung und Problemstellung

Während bei weniger komplexen Mischungen gute Trennleistungen oft durch Anpassung der Gradientenbedingungen [1-3] erreicht werden können, ist es für komplexe biologische oder medizinische Proben notwendig, entweder das chromatographische Verfahren zu ändern (Übergang von 1-dimensionaler auf 2-dimensionale/n-dimensionale Chromatographie [4][5,6]) oder im 1-dimensionalen Modus die Leistungsfähigkeit des Trennmediums zu verbessern. So wurde z.B. von Jim Jorgenson und Richard Smith versucht, eine Steigerung der Peakkapazität durch Verwendung langer Säulen mit kleinen Teilchen (1-2  $\mu\text{m}$ ) zu erreichen [7-13]. Durch diese langen Trennsäulen mit kleinen Teilchen werden sehr hohe Peakkapazitäten generiert (bis 1500), jedoch hat die Verwendung dieser Trennmedien den Nachteil, dass es zu sehr hohen Druckabfällen (größer 1000 bar) kommt. Daher können diese HPLC-Säulen nicht mit konventionellen HPLC-Systemen betrieben werden, was einen entscheidenden Nachteil dieses neuen, als UHPLC (**ultra high pressure liquid chromatography**) bekannten Verfahrens, darstellt [11].

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von bestehenden und bereits in den verschiedensten Anwendungsbereichen der Bioanalytik (Trennung von Oligonukleotiden, DNA, RNA, Peptiden und Proteinen) etablierten Poly-Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen (60 x 0.2 mm i.D.) [14,15], diese soweit zu verbessern, dass mit ihnen vergleichbar hohe Peakkapazitäten wie in der UHPLC erreicht werden. Durch Arbeiten von Premstaller *et. al.* konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Verwendung von 60 mm PS/DVB-Monolithen bei der Trennung tryptischer Peptide Peakkapazitäten von 250-450, bei einem gleichzeitigen Druckabfall von 120 bar, generiert werden konnten [14]. Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte eine weitere Steigerung der Peakkapazitäten durch eine Erhöhung der Säulenlänge und die Verwendung längerer Gradientenzeiten erreicht werden. Weiterhin mussten diese längeren PS/DVB-Monolithen mit konventionellen

HPLC-Systemen kompatibel sein, d.h. der Druckabfall durfte maximal 400 bar betragen. Um die Synthese längerer Monolithen (150-300 mm) zu ermöglichen, musste zunächst der Herstellungsprozess soweit optimiert werden, dass das Auftreten störender Inhomogenitäten im Säulenbett vermieden werden konnte. Zur Optimierung des Syntheseprozesses wurde zunächst ein 150 x 0.2 mm i.D. Monolith systematisch sowohl auf das Auftreten dieser Inhomogenitäten als auch auf die Abhängigkeit der Trennleistung von der Säulenlänge hin untersucht. Dies wurde dadurch erreicht, dass der 150 mm Monolith nacheinander in verschieden lange Teilstücke (150 mm, 75 mm und 37.5 mm) verkürzt und jede Säule mit den verschiedenen Probesubstanzen (9er Protein-Mischung, P2693 Peptid-Standard, Cytochrom C Verdau) auf verschiedene chromatographische Parameter (relative Retentionszeit, Auflösung und Peakkapazität) hin untersucht wurde. Nach der Optimierung des Syntheseprozesses, die in Zusammenarbeit mit der Firma LC-Packings durchgeführt wurde, wurde anschließend durch Variation der Säulenlänge (150-300 mm), der Gradientdauer (1-9h) sowie der Flussraten (1-2 µl/min) versucht, die Leistungsfähigkeit der PS/DVB-Monolithen soweit zu verbessern, dass vergleichbar hohe Peakkapazitäten wie in der UHPLC erhalten werden konnten.

## **2.2. Theoretische Grundlagen**

### **2.2.1. Definition wichtiger chromatographischer Parameter in der Hochleistungsflüssigchromatographie**

Um die Leistungsfähigkeit kurzer und langer Trennsäulen näher untersuchen zu können, müssen zunächst einige grundlegende chromatographische Parameter eingeführt werden. Dazu zählen neben der Bodenzahl und der Auflösung vor allem Begriffe wie Peakkapazität oder Retentionsfaktor. All diese Grundbegriffe stellen die Basis zum Verständnis der Prozesse während einer isokratischen oder Gradiententrennung dar. Das Verständnis dieser Prozesse ist jedoch wiederum von

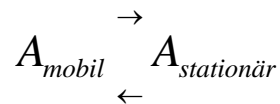
fundamentaler Bedeutung, wenn man Trennmedien für Gradiententrennungen optimieren und verbessern will.

## Relevante Kenngrößen in der HPLC

### Der Retentionsfaktor $k$

Um den Retentionsfaktor  $k$  definieren zu können, müssen zunächst einige weitere grundlegende Begriffe wie Verteilungskonstante (Verteilungskoeffizient), Retentionszeit und der Zusammenhang zwischen Retentionszeit und Verteilungskoeffizient erläutert und definiert werden [16].

Prinzipiell können die Verteilungsgleichgewichte der Chromatographie durch einfache Gleichungen ausgedrückt werden, die den Übergang eines Analyten zwischen der mobilen und stationären Phase beschreiben. So kann man für einen Analyten A dieses Verteilungsgleichgewicht wie folgt beschreiben:



Die Gleichgewichtskonstante  $K$  dieser Reaktion wird als Verteilungsquotient oder **Verteilungskonstante** (Verteilungskoeffizient) definiert.

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

**Gleichung 2.1.** Definition des Verteilungskoeffizienten  $K$  mittels der molaren Konzentration des Analyten in der stationären Phase ( $c_S$ ) und in der mobilen Phase ( $c_M$ ).

Laut IUPAC-Nomenklatur [17] ist die Verteilungskonstante wie folgt definiert:

„Die Verteilungskonstante (oft auch als Verteilungskoeffizient bezeichnet) ist das Verhältnis der Konzentrationen der Komponente in oder an der stationären Phase zu ihrer Konzentration in der mobilen Phase. Da eine Komponente in der Chromatographie in verschiedenen Formen vorliegen kann, bezieht man die Konzentration auf die insgesamt vorliegende Menge, ohne die verschiedenen Formen zu berücksichtigen. Die Konzentration in der mobilen Phase wird stets auf eine Volumeneinheit bezogen. Je nachdem welche stationäre Phase man verwendet, existieren unterschiedliche Verteilungskoeffizienten in der Chromatographie.“

Eine weitere wichtige Größe in der Chromatographie stellt die **Retentionszeit**  $t_R$  dar. Diese wird definiert als diejenige Zeit, die ein Analyt braucht, um nach der Injektion den Detektor zu erreichen. Die durchschnittliche lineare Geschwindigkeit  $\bar{v}$  für die Wanderung eines Analyten ist gegeben durch:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

**Gleichung 2.2.** Definition der durchschnittlichen Lineargeschwindigkeit  $\bar{v}$  über die Länge  $L$  der Trennsäule und der Retentionszeit  $t_R$ .

Eine vergleichbare Beziehung kann für die Moleküle der mobilen Phase hergeleitet werden. Die mittlere Lineargeschwindigkeit ist dabei wie folgt definiert:

$$u = \frac{L}{t_M}$$

**Gleichung 2.3.** Definition der mittleren Lineargeschwindigkeit über die Säulenlänge  $L$  und die Retentionszeit einer nicht retardierten Inertsubstanz.

Um eine Beziehung zwischen der Retentionszeit  $t_R$  einer Substanz und ihrer Verteilungskonstante herzuleiten, kann die Wanderungsgeschwindigkeit als ein Bruchteil der Geschwindigkeit der mobilen Phase ausgedrückt werden:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{\text{Molzahl der Analyten in der mobilen Phase}}{\text{Gesamt molzahl des Analyten}}$$

**Gleichung 2.4.** Definition der Wanderungsgeschwindigkeit als Bruchteil der Geschwindigkeit der mobilen Phase.

Hierbei ist die Anzahl der Mole des Analyten in der mobilen Phase gleich der molaren Konzentration  $c_M$  in dieser Phase multipliziert mit dem Volumen der mobilen Phase  $V_M$ . Analog ist auch die Anzahl der Mole in der stationären Phase gegeben durch das Produkt aus der Konzentration des Analyten in der stationären Phase  $c_S$  und ihrem Volumen  $V_S$ . Dadurch kann **Gleichung 2.4** wie folgt formuliert werden:

$$\bar{v} = u \cdot \frac{c_M \cdot V_M}{c_M \cdot V_M + c_S \cdot V_S} = u \cdot \frac{1}{1 + c_S \cdot V_S / c_M \cdot V_M} = u \cdot \frac{1}{1 + K \cdot V_S / V_M}$$

**Gleichung 2.5.** Zusammenhang zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Verteilungskonstante.

Der **Retentionsfaktor k** (früher auch Kapazitätsverhältnis) beschreibt das Verhältnis der Aufenthaltszeit eines Analyten in der stationären Phase zu jener in der mobilen Phase. Er wird durch die Charakteristik der beiden Phasen, das Phasenverhältnis und die Temperatur beeinflusst. Weiterhin hängt die Effizienz einer chromatographischen Trennsäule für die Trennung zweier Analyten A und B signifikant von den relativen Geschwindigkeiten ab, mit der die beiden Komponenten eluiert werden. Weiterhin ist der Retentionsfaktor ein wichtiger Parameter zur Beschreibung der Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten in der Trennsäule. Für eine beliebige Substanz A ist der Retentionsfaktor wie folgt definiert:

$$k_A = \frac{u_{A,S}}{u_{A,M}} = \frac{c_{A,S} \cdot V_{A,S}}{c_{A,M} \cdot V_{A,M}} = \frac{K_A \cdot V_S}{V_M}$$

**Gleichung 2.6.** Definition des Retentionsfaktors k einer Substanz A mittels Verteilungskoeffizient.

Unter Berücksichtigung des Zusammenhangs zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und der Verteilungskonstante (**Gleichung 2.5**) ergibt sich für den Retentionsfaktor  $k$ :

$$\bar{v} = u \cdot \frac{1}{1+k_A}$$

**Gleichung 2.7.** Zusammenhang zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Retentionsfaktor.

Durch Einsetzen von **Gleichung 2.2** und **Gleichung 2.3** in **Gleichung 2.7** erhält man:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \cdot \frac{1}{1+k_A}$$

**Gleichung 2.8.** Zusammenhang zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Retentionsfaktor.

Durch Umformung kann **Gleichung 2.8** in **Gleichung 2.9** überführt werden:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

**Gleichung 2.9.** Gleichung zur Definition des Retentionsfaktors ( $t_R$  = Retentionszeit einer Inertsubstanz (Durchflusszeit),  $t_M$  = Retentionszeit der Probe).

Prinzipiell gilt, dass eine Substanz umso schneller eluiert, je kleiner der Retentionsfaktor ist. Haben Analyten Retentionsfaktoren deutlich größer als 10, so treten sehr hohe Retentionszeiten auf. Wie im nachfolgenden Kapitel noch näher erläutert wird, unterscheiden sich die  $k$ -Werte im isokratischen Modus signifikant von denen des Gradientmodus. Während für eine isokratische Trennung konstante  $k$ -Werte erhalten werden, beobachtet man im Gradientmodus zunächst hohe  $k$ -Werte, die jedoch im Laufe der Gradientelution schrittweise absinken.

## Die Bodenzahl N

Ein quantitatives Maß für die Effizienz einer chromatographischen Säule ist neben der Bodenhöhe H die theoretische Bodenzahl N. Folgende Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen beiden Kenngrößen:

$$N = \frac{L}{H} = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{w_B} \right)^2$$

**Gleichung 2.10.** Definition der Bodenzahl N mittels Säulenlänge L und Bodenhöhe H.

Eine geringe Bodenhöhe (= hohe Trennleistung) wird erreicht, wenn bei möglichst langer Trennstrecke eine möglichst geringe Verdünnung erzielt wird. Dies ist entscheidend, wenn man die Trennleistung durch Verlängerung der Säulen steigern will. Wie aus **Gleichung 2.10** ersichtlich, hängt die Bodenzahl N von der Säulenlänge L ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Abhängigkeit der Peakkapazität von der Säulenlänge L untersucht, um so durch eine Erhöhung von L eine Verbesserung der Peakkapazitäten zu erreichen.

## Der Trennfaktor $\alpha$ (Selektivität)

In der Chromatographie gilt für zwei benachbarte Peaks  $P_1$  und  $P_2$  mit  $t_{R, P_2} > t_{R, P_1}$  folgende Beziehung für den Trennfaktor  $\alpha$ :

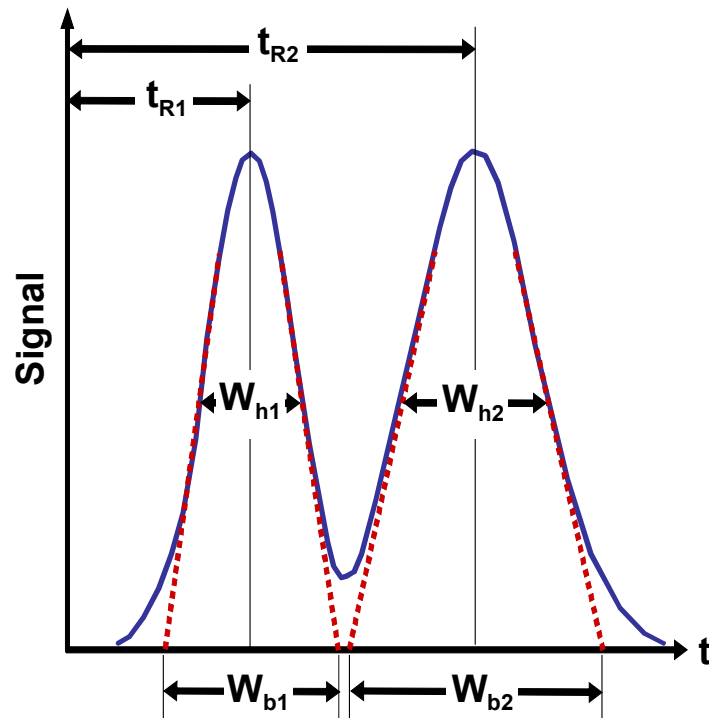
$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

**Gleichung 2.11.** Definition des Trennfaktors  $\alpha$  für zwei Peaks in der Chromatographie.

Vom Trennfaktor spricht man, wenn damit die aus dem Chromatogramm ermittelte Größe gemeint ist, während man von Selektivität spricht, um die Eigenschaft eines

chromatographischen Trennsystems, einen hohen Trennfaktor für ein bestimmtes Substanzpaar zu erzeugen, zu beschreiben.

### Die Auflösung $R_s$



**Abbildung 2.1.** Schematische Darstellung der Trennung zweier Analyten sowie der dazu notwendigen Parameter (Retentionszeit  $t_R$ , Peakhalbwertsbreite  $W_h$  und Peakbasisbreite/Peakbreite  $w_b$ ). Die Peaks werden dabei als ideale Gaußkurven angenommen.

In **Abbildung 2.1** ist die Trennung zweier Analyten schematisch dargestellt. Die Auflösung  $R_s$  einer Säule stellt ein quantitatives Maß für die Fähigkeit dar, zwei Analyten voneinander zu trennen. Sie ist wie folgt definiert:

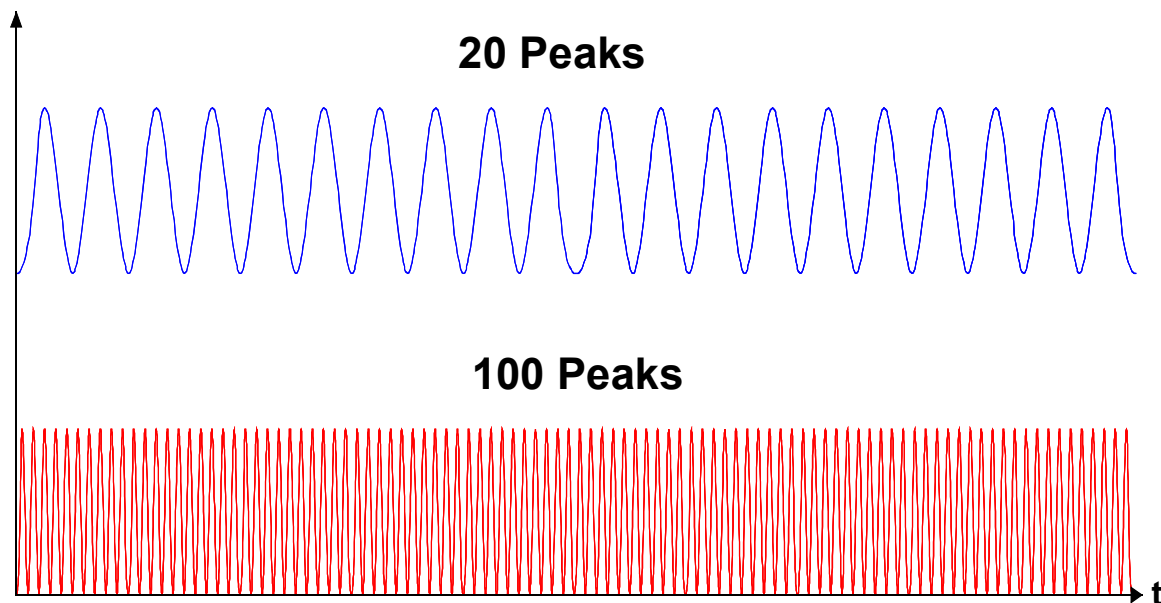


$$R_S = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k_B}{1+k_N} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

**Gleichung 2.12.** Definition der Auflösung  $R_S$  über die Trennleistung ( $\sqrt{N}$ ), der Retention ( $k$ ) und der Selektivität ( $\alpha$ ).

### Die Peakkapazität $P_K$

Um verschiedene Gradienten in der HPLC miteinander vergleichen zu können, hat es sich als sinnvoll erwiesen, eine Größe namens Peakkapazität einzuführen [18]. Die Peakkapazität ist definiert als die theoretische Anzahl von Peaks, die für einen gegebenen Gradienten und eine gegebene Auflösung maximal getrennt werden können. **Abbildung 2.2** zeigt die schematische Darstellung unterschiedlicher Peakkapazitäten für den gleichen gegebenen Gradienten.



**Abbildung 2.2.** Schematische Darstellung unterschiedlicher Peakkapazitäten.

Die Peakkapazität wird definiert als Quotienten aus der Gradientenzeit und der durchschnittlichen Peakbasisbreite (vgl. **Abbildung 2.1**). Die durchschnittliche Peakbasisbreite wird hierbei errechnet aus der Trennung der einzelnen Komponenten über die gesamte Gradientenzeit. Es gilt:

$$P_K = 1 + \frac{\text{Gradientdauer}}{\text{Peakbasisbreite}} = 1 + \frac{t_g}{w}$$

**Gleichung 2.13.** Definition der Peakkapazität anhand der Gradientdauer  $t_g$  und der mittleren Peakbasisbreite  $\bar{w}$ .

Je höher die Peakkapazität einer Trennsäule ist, umso mehr Analyten können mit einem bestimmten Gradienten voneinander getrennt werden. Hohe Peakkapazitäten sind vor allem für komplexe Mischungen essentiell.

### 2.2.2. Modelle zur Beschreibung der Gradientelution

Nach der Definition der wichtigsten chromatographischen Grundbegriffe ist vor allem die Definition des Begriffes Elutionschromatographie sowie deren beiden wichtigsten chromatographischen Verfahren, nämlich der isokratischen Elution und Gradientelution, von essentieller Bedeutung. Laut IUPAC-Nomenklatur von H. Engelhardt und L. Rohrschneider [17] ist die Elutionschromatographie wie folgt definiert:

„Bei der Elutionschromatographie befindet sich die stationäre Phase im Gleichgewicht mit der mobilen Phase, die kontinuierlich durch das Bett strömt. Die Probe wird als definierte Zone pfropfenförmig in den Strom der mobilen Phase am Säulenanfang aufgegeben. Im Idealfall sind die Analyten durch Zonen reiner Phasen voneinander getrennt. Bei der Elutionschromatographie werden die äußeren Bedingungen konstant gehalten oder programmiert verändert (z.B. Gradientelution in der HPLC)“.

Werden bei einer chromatographischen Trennung die wichtigsten Parameter wie stationäre und mobile Phase, Volumenstrom und Temperatur konstant gehalten, so spricht man in diesem Fall von einer isokratischen Elution. Dem entgegen steht das chromatographische Verfahren der Gradientelution. Bei dieser Technik können im Laufe der Trennung ein oder mehrere Parameter systematisch so verändert werden, dass dadurch eine oder mehrere chromatographische Größen beeinflusst und dadurch die Trennung der Analyten optimiert wird. Die dabei am häufigsten

angewendete Programmieretechnik ist die systematische Veränderung der Eluentenstärke in der Hochleistungsflüssigchromatographie.

Der Grund für die Einführung der Gradientelution kann mit einigen prinzipiellen Nachteilen der isokratischen Trennung begründet werden. Diese sind:

1. Die isokratische Trennung ist ineffektiv, wenn die zu trennende Probe Analyten enthält, die sich sehr stark in ihren  $k$ -Werten unterscheiden. Dies führt dazu, dass früh eluierende Substanzen scharfe Banden besitzen, während spät eluierende Analyte sehr breite Peaks besitzen. Dies führt zu einer drastischen Reduzierung der Nachweisgrenze für spät eluierende Probenbestandteile. Des Weiteren führt eine isokratische Trennung zu einer häufig unnötigen Erhöhung der Analysenzeit.
2. Im isokratischen Modus kann es zu einer starken Peakverbreiterung von spät eluierenden Substanzen kommen, was wiederum die Auflösung und Nachweisgrenze negativ beeinflusst.

Diese beschriebenen Nachteile haben zur Einführung der Gradientelution geführt, wobei ein grundlegendes Problem der Gradientelution darin liegt, dass zahlreiche wichtige chromatographische Parameter, wie z.B. die Bodenzahl  $N$ , streng genommen nur für den isokratischen Modus definiert sind und nicht einfach in den Modus der Gradientelution übertragen werden dürfen. Dies liegt daran, dass es bei der Gradientelution, im Gegensatz zur isokratischen Elution, zu einer fortwährenden Störung des thermodynamischen Gleichgewichtes kommt und daher eine Angabe von thermodynamischen Daten wie  $k$ ,  $\alpha$ ,  $H$ , ... streng genommen nicht zulässig ist. Wichtige Ansätze zur Lösung dieses Problems und Übertragung dieser Parameter von der isokratischen auf die Gradientelution wurden vor allem von L.R. Snyder entwickelt.

Zur Beschreibung und Optimierung der Gradientelution in der HPLC gibt es zwei wichtige Modelle. Neben dem von Snyder und Saunders [19-21] eingeführten Modell, das für den Fall der Adsorptionschromatographie Gleichungen für die Elutionszeit, Peakbreite und Auflösung als Funktion der Gradientensteilheit ableitet, liefert vor allem das von Elgass und Engelhardt [22,23] vorgeschlagene Modell des Gradient-Volumen-Konzeptes (GVK) wichtige theoretische Grundlagen zur Beschreibung der Gradientelution.

Neben den Arbeiten von Snyder und Elgass lieferten auch die zahlreichen Arbeiten von P. Jandera [24-29] sowie mehrerer anderen Arbeitsgruppen ([30-36]) einen wichtigen Beitrag zum theoretischen und praktischen Verständnis auf dem Gebiet der Gradientelution.

### **Theorie der Gradientelution von L. R. Snyder**

Obwohl schon frühzeitig erkannt wurde, dass sich verschiedene Lösungsmittel unterschiedlich stark auf das Elutionsverhalten der Analyten auswirken, ist der Ausnutzung dieser Tatsache erst zu Beginn der fünfziger Jahre das erste Mal in größerem Umfang Rechnung getragen worden, indem man während der Trennung systematisch die Laufmittelstärke veränderte. Erste theoretische Arbeiten auf diesem Gebiet sowie deren Nutzen für die Praxisanwendung wurden von Alm, Williams und Tiselius [37] im Jahre 1952 durchgeführt. Auf der Grundlage dieser Arbeiten wurde die Gradientelution in den folgenden Jahren auf eine Vielzahl von analytischen Problemen angewandt [38]. Einer der ersten umfassenden theoretischen Ansätze zur Beschreibung der Gradientelution in der HPLC wurde jedoch von Snyder *et. al.* erst Mitte der 60er Jahre durchgeführt [39,40]. Snyder war es auch, der in Zusammenarbeit mit D.L. Saunders Anfang der 70er Jahre die ersten Optimierungsrechnungen zur Gradientelution ausgearbeitet hat [19]. Gefolgt von den ersten theoretischen Arbeiten auf diesem Gebiet, veröffentlichten Snyder *et. al.* gegen Ende der 70er Jahre die theoretische und praktische Anwendung des bekannten Snyder'schen LSS (linear solvent strength) Konzeptes auf die RP-Chromatographie [20,21]. Nach dem LSS-Konzept gilt folgende grundlegende Beziehung:

$$\log k = \log k_w - S \cdot \varphi$$

**Gleichung 2.14.** Grundgleichung des Snyder'schen LSS-Konzeptes, wobei  $k_w$  der Retentionsfaktor in reinem Wasser ist und S die Änderung von  $\log k$  bei Änderung der Elutionszusammensetzung  $\varphi$ .

In **Gleichung 2.14** beschreibt Snyder die Änderung des k-Wertes bei Änderung der Elutionszusammensetzung  $\phi$  als Funktion des Retentionsfaktors  $k_w$  in reinem Wasser. Dieser streng lineare Zusammenhang gilt allerdings nur für einen sehr begrenzten Bereich der Elutionszusammensetzung. Abweichungen von dieser Linearität treten vor allem auf, wenn der Organikanteil in der mobilen Phase sehr gering ist.

Die Grundlage der Snyder'schen Theorie ist dabei darin zu sehen, dass die Adsorbensoberfläche molekular mit Lösemittelmolekülen belegt ist. Adsorbiert ein Analytmolekül an der Oberfläche der stationären Phase, so werden einige dieser Lösemittelmoleküle verdrängt. In der Gesamtenergiebilanz dieses Prozesses werden dabei lediglich die Energien der adsorbierten Moleküle berücksichtigt, während die Energien im gelösten Zustand vernachlässigt werden können und sich diese in der Bilanz in guter Näherung aufheben. Aus der thermodynamischen Entwicklung dieser Modellvorstellung erhält Snyder einen mathematischen Ausdruck, in welchem die Retention des Analyten als Funktion von Adsorbens-, Lösungsmittel- und Probeeigenschaften beschrieben werden kann.

$$\log K^0 = \log V_a + \alpha \cdot (S^0 - A_s \cdot \varepsilon^0)$$

**Gleichung 2.15.** Mathematische Beschreibung der Retention eines Analyten mittels thermodynamischer Beziehungen (Formel nach L.R. Snyder).

In **Gleichung 2.15** ist  $K^0$  der Verteilungskoeffizient einer Probe für das Adsorptionsgleichgewicht im linearen Bereich der Adsorptionsisothermen ( $K^0 = (V_R - V_m)/W$  mit  $V_R$ =Retentionsvolumen,  $V_m$ =Volumen der mobilen Phase in der Säule und  $W$ =Masse des Adsorbens in der Säule). Normalerweise ist der dimensionslose Verteilungskoeffizient definiert als der Quotient aus dem Volumen der stationären Phase ( $V_s$ ) und dem Volumen der mobilen Phase ( $V_m$ ). Da jedoch das Volumen der stationären Phase nicht in ml angegeben werden kann, hat L.R. Snyder die Oberfläche der stationären Phase als Bezugsgröße gewählt, was dazu führt, dass der Verteilungskoeffizient nun eine Dimension erhält. Daher kann man an dieser Stelle auch von einem Absorptionskoeffizienten anstelle eines Verteilungskoeffizienten sprechen. Statt des Verteilungskoeffizienten verwendet man heute in der HPLC den Retentionsfaktor  $k$  (vgl. Kapitel 2.2.1). Weiterhin steht die

Variable  $V_a$  für das Volumen des adsorbierten Lösungsmittels auf einem Gramm stationärer Phase, während  $\alpha$  für den „Oberflächenaktivitätskoeffizienten“ des Adsorbens steht. Dieser ist von der chemischen Beschaffenheit des Adsorbens und von der auf ihm adsorbierten Wassermenge abhängig. In **Gleichung 2.15** steht  $S^0$  für die Adsorptionsenergie eines Analyten bei Standardaktivität des Adsorbens ( $\alpha=1$  per Definition),  $A_s$  für das Verhältnis des Oberflächenbedarfs des Probemoleküls auf der stationären und dem Oberflächenbedarf des Lösungsmittelmoleküls und  $\epsilon^0$  stellt ein Maß für die Elutionsstärke eines Eluenten dar. Mittels **Gleichung 2.15** konnte Snyder nun die Elutionskraft eines Eluenten aus den k-Werten einer Messung ermitteln und dadurch seine fundamentale Gleichung zur Beschreibung der Gradientelution (**Gleichung 2.14**) herleiten. Dabei geht die Snyder'sche Theorie davon aus, dass, wenn man zu einem schwach eluierenden Lösungsmittel schrittweise eine stärker eluierende Komponente hinzu gibt, sich die Elutionskraft dieses Gemisches zunächst stark erhöht, wobei sich diese Erhöhung in der Elutionskraft jedoch mit zunehmendem Anteil an der stärker eluierenden Komponente abschwächt. Dieser Sprung in der Elutionskraft im Bereich von geringen Zusätzen an der stärker eluierenden Komponente ist umso größer, je mehr sich die beiden Eluenten in ihrer Elutionskraft unterscheiden. Laut Snyder kann eine Gradientelution dann als optimal angesehen werden, wenn sie eine optimale Auflösung der Peaks über den gesamten Gradientbereich gewährleistet. Als optimal wird dabei angesehen, wenn zwei Paare von Peaks, die die gleiche relative Retention besitzen und während der Gradientelution an verschiedenen Stellen im Chromatogramm auftauchen, mit gleicher Auflösung voneinander getrennt werden [19]. In seiner Arbeit hat Snyder gezeigt, dass dieses optimale Verhalten entweder durch eine stufenweise Erhöhung der Elutionskraft oder durch eine kontinuierliche Elutionskrafterhöhung erhalten werden kann. Für die kontinuierliche Erhöhung der Elutionsstärke, die das gebräuchlichste Verfahren in der modernen HPLC darstellt, bedeutet dies, dass pro Volumeneinheit des durch die Säule geflossenen Eluenten der k-Wert um einen konstanten Faktor sinken muss (vgl. Erläuterungen im späteren Teil dieses Kapitels). Dies entspricht einer linearen Erhöhung der Elutionskraft (LSS-Gradient: linear solvent strength). Ein LSS-Gradient kann erhalten werden, indem man die Zusammensetzung des Eluenten so ändert, dass sich  $\epsilon^0$  linear mit der Zeit im Verlauf der Gradientelution erhöht.

Wie bereits erwähnt, ist die theoretische Beschreibung der Gradientelution schwierig, da wichtige chromatographische Parameter streng genommen nur für eine isokratische Elution definiert sind. Da jedoch viele experimentelle Variablen (chromatographische Parameter) sowohl im isokratischen als auch im Gradientmodus einen vergleichbaren Einfluss auf die Trennung haben, versuchte Snyder, die im isokratischen Modus definierten Parameter auf die Gradientelution zu übertragen. Im Gegensatz zur isokratischen Trennung hat man bei der Gradientelution zwei unterschiedliche Laufmittel A und B, wobei B eine höhere Elutionsstärke besitzt, was in der RP-Chromatographie einem höheren Organikanteil entspricht. Eine grundlegende Beziehung zur Beschreibung der Gradientelution liegt dabei in der Definition der Gradientsteilheit. Laut Snyder ist diese definiert als der Quotient aus der Änderung des Volumens des Laufmittels B pro Zeiteinheit  $t$ . Unter Einbeziehung dieser Definition der Gradientsteilheit definierte nun Snyder die wichtigsten chromatographischen Parameter auch für die Gradientelution.

Dabei wurde zunächst das Verhalten der Peakhalbwertsbreiten für die isokratische- und Gradientelution miteinander verglichen. Das Verhalten dieser wichtigen chromatographischen Größe ist vor allem für den Versuch der Steigerung der Peakkapazität einer Säule durch Erhöhung der Säulenlänge oder Gradientdauer wichtig, da die Peakkapazität als Quotient aus Gradientdauer und dem Mittelwert der Peakbasisbreiten aller getrennten Substanzen definiert ist. Nach Snyder liegen der Bandenverbreiterung bei der Gradientelution hauptsächlich drei Effekte zu Grunde:

- die Verbreiterung in der Säule bedingt durch Packungsqualität, Diffusionsprozesse usw. (vgl. Theorie der Bandenverbreiterung Kapitel 2.2.1)
- der momentane  $k$ -Wert zum Zeitpunkt der Elution
- die Kompression des Peaks in der Säule, verursacht durch die schnelle Wanderung des hinteren Peakteils im Vergleich zum vorderen Peakteil dadurch, dass eine Beschleunigung durch Erhöhung der Elutionskraft erfolgt

Da zwangsläufig sowohl die Erhöhung der Gradientdauer als auch die Vergrößerung der Trennstrecke (Säulenlänge) zu einer Erhöhung der Peakhalbwertsbreiten führt (längere Verweildauer des Analyten im System und damit Erhöhung der Verdünnung der Probenzone (vgl. Theorie der Bandenverbreiterung Kapitel 2.2.1)), ist es

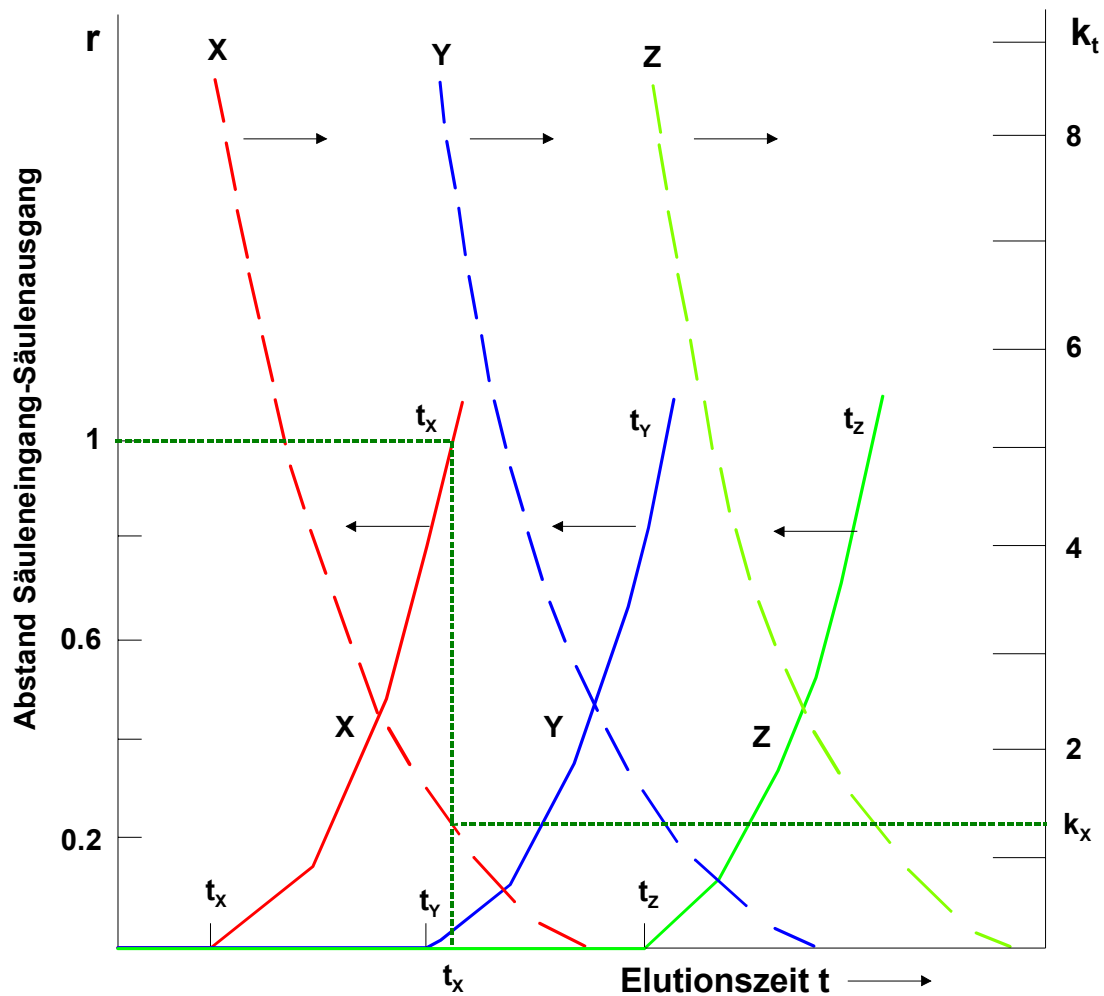
besonders wichtig, dass sich diese Erhöhung der Peakhalbwertsbreiten auf alle Substanzpeaks (früh und spät eluierende) gleich auswirkt. Wäre dies nicht der Fall, d.h. würden spät eluierende Peaks im Vergleich zu früh eluierenden Peaks überproportional verbreitert, so würde dies zu einer zusätzlichen Erhöhung der mittleren Peakhalbwertsbreite (relevante Größe zur Berechnung der Peakkapazität) führen, da die mittlere Peakhalbwertsbreite die Summe aller Peakhalbwertsbreiten (früh und spät eluierende Peaks) der Probe ist. Damit wäre eine Steigerung der Peakkapazität der Säule durch Veränderung dieser beiden Parameter (Säulenlänge, Gradientdauer) nicht möglich.

Neben vergleichbaren Peakhalbwertsbreiten für früh und spät eluierende Peaks ist für die Steigerung der Peakkapazitäten vor allem auch das Verhältnis wichtig, wie sich eine Vergrößerung der Säulenlänge oder der Gradientdauer auf die Peakhalbwertsbreiten auswirken. Der Zusammenhang zwischen Erhöhung der Säulenlänge und der damit verbundenen Vergrößerung der Peakhalbwertsbreiten wird im späteren Teil dieses Kapitels hergeleitet.

Während bei der isokratischen Elution die Peakhalbwertsbreiten (Bandenbreite der Peaks) mit zunehmenden  $k$ -Werten stark ansteigen, können dagegen im Gradientmodus für früh und spät eluierende Peaks vergleichbare Peakhalbwertsbreiten beobachtet werden. Dieses wichtige Verhalten von spät eluierender Peaks, welches eine wichtige Voraussetzung zur Optimierung der Peakkapazität darstellt, kann anhand der Snyder-Theorie mittels relativer Retentionsfaktoren erklärt werden und ist in **Abbildung 2.3** grafisch illustriert.

In **Abbildung 2.3** ist das Wanderungsverhalten dreier unterschiedlicher Substanzen X, Y und Z in Abhängigkeit der Elutionszeit für die Gradientelution dargestellt. Dabei ist auf der linken Ordinate der Abstand  $r$  zwischen Säulenkopf ( $r=0$ ) und Säulenende ( $r=1$ ), auf der rechten Ordinate das Verhalten des Retentionsfaktors  $k$  in Abhängigkeit der Elutionszeit und auf der Abszisse die Elutionszeit  $t$  dargestellt. Dabei sind die  $k$ -Werte der Substanzen X, Y und Z ( $k_X < k_Y < k_Z$ ) so gewählt, dass diese zu Beginn der Gradientelution ( $t=0$ ) am Säulenkopf vollständig adsorbiert ( $k > 10$ ) werden und erst bei einer bestimmten, für jede Substanz charakteristischen Elutionsstärke mit der Wanderung durch die Säule beginnen (durchgezogene Linien). Der Zeitpunkt des Erreichens dieser substanzcharakteristischen Elutionsstärke beträgt für Substanz X  $t_x$ , für Substanz Y  $t_y$  und für Substanz Z  $t_z$ .





**Abbildung 2.3.** Illustration der Bandenmigration einer Substanz X, Y und Z während der Gradientelution (durchgezogene Linie = Migration der Probenbande durch die Säule in Abhängigkeit der Elutionszeit; gestrichelte Linie = Änderung der  $k$ -Werte von X, Y und Z in Abhängigkeit der Elutionszeit; gepunktete Linie = exemplarische Bestimmung des  $k$ -Wertes von X beim Verlassen der Säule).

Da im Laufe der Gradientelution die Konzentration der organischen Komponente stetig erhöht wird, beschleunigt sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten durch die Säule und die  $k$ -Werte sinken (gekrümmte gestrichelte Linie). Während der Migration der Analyten durch die Trennsäule kommt es dabei permanent zu einer Wechselwirkung zwischen den Analyten und stationärer bzw. mobiler Phase. Erreicht eine Substanz das Ende der Trennsäule ( $r=1$ ), so kann der dazugehörige  $k$ -Wert der Substanz dadurch bestimmt werden, dass man ausgehend von der Abstands-Elutionszeit-Beziehung (durchgezogene Linie) das Lot auf die  $k$ -Wert-Elutionszeit-

Beziehung (gestrichelte Linie) fällt (gepunktete Linie), und danach den dazugehörigen Wert auf der rechten Ordinate abliest. Vergleicht man nun die mittleren k-Werte der Substanzen X, Y und Z, so erhält man für alle Analyten vergleichbar große k-Werte. Dies kommt laut Snyder dadurch zustande, dass alle drei Substanzen ein vergleichbares Verhalten in der Trennsäule zeigen, d.h. zunächst am Säulenkopf adsorbiert werden und der Migrationsvorgang erst bei einer spezifischen Eluentenstärke beginnt. Weiterhin setzt Snyder voraus, dass sich alle Substanzen mit annähernd vergleichbarer Geschwindigkeit durch die Trennsäule bewegen (gleiche Steigung der gestrichelten Linie). Basierend auf diesen Annahmen haben sowohl früh (Substanz X) als auch spät eluierende Substanzen (Z) vergleichbare k-Werte und gemäß **Gleichung 2.16** damit auch vergleichbare Peakhalbwertsbreiten.

$$w = (4 / \sqrt{N}) \cdot t_0 \cdot (1 + k)$$

**Gleichung 2.16.** Zusammenhang zwischen Peakbasisbreite  $w$  und Retentionsfaktor  $k$  ( $N$ =Bodenzahl der Säule).

Mittels **Gleichung 2.16**, die aus den Beziehungen von **Gleichung 2.9** und **Gleichung 2.10** hergeleitet werden kann, setzt Snyder die Peakhalbwertsbreite in direkter Beziehung zum Retentionsfaktor  $k$ .

Bezieht man in **Gleichung 2.16** noch die Tatsache mit ein, dass die Peaks beschleunigt durch die Säule eluieren und, da die Elutionskraft „vor“ dem Peak geringer als „hinter“ dem Peak ist, der hintere Teil des Peaks gestaucht wird, so kann der Zusammenhang zwischen Peakbasisbreite und Retentionsfaktor auch wie folgt dargestellt werden:

$$w = (4 / \sqrt{N}) \cdot t_0 \cdot (1 + k) \cdot G$$

**Gleichung 2.17.** Zusammenhang zwischen Peakbasisbreite  $w$  und Retentionsfaktor  $k$  unter Einbeziehung des Stauchungsfaktors  $G$ .

Da durch die Snyder-Theorie bewiesen wurde, dass früh und spät eluierende Peaks vergleichbare Peakhalbwertsbreiten haben, ist es nun möglich zu erklären, warum die Peakkapazität durch Vergrößerung der Säulenlänge gesteigert werden kann. Dazu konnte, basierend auf den in Kapitel 2.2.1 definierten Beziehungen für die Bodenzahl  $N$  und die Bodenhöhe  $H$ , eine Gleichung für den fundamentalen Zusammenhang zwischen Säulenlänge und Peakhalbwertsbreite hergeleitet werden. Aus der Definition der Bodenhöhe  $H$  über die Längenvarianz ( $\sigma$ ) des Peaks und der Säulenlänge  $L$  und unter Einbeziehung von **Gleichung 2.10** folgt:

$$(1) \quad N = \frac{L}{H} \quad \text{und} \quad (2) \quad H = \frac{\sigma^2}{L}$$

$$(3) \quad w = \left(4 / \sqrt{L \cdot \frac{1}{H}}\right) \cdot t_0 \cdot (1 + k)$$

**Gleichung 2.18.** Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreite.

Für eine beliebige Variation  $m$  der Säulenlänge ergibt sich folgende Beziehung zwischen Säulenlänge und Peakhalbwertsbreite:

$$\sigma_m = \sqrt{m} \cdot \sigma_1$$

**Gleichung 2.19.** Gleichung für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge.

Wie aus **Gleichung 2.19** ersichtlich, führt eine Steigerung der Säulenlänge um Faktor  $m$  zu einem Anstieg der Peakhalbwertsbreite um Faktor  $\sqrt{m}$ . Daher führt eine Steigerung der Säulenlänge zu einer signifikanten Verbesserung der Peakkapazität  $P_K$ . Ähnliche Ergebnisse wurden auch von P. Lu *et al.* bei der Untersuchung der Säuleneffizienz in Abhängigkeit von der Säulenlänge erhalten [41].

## Das Gradient-Volumen-Konzept (GVK) von Elgass und Engelhardt

Ein weiterer wichtiger Ansatz zur Beschreibung und Optimierung von Gradientelutionen wurde Anfang der 80er Jahre von Elgass und Engelhardt eingeführt. [22,23,42]. Dabei handelt es sich um das so genannte Gradient-Volumen-Konzept (GVK), bei dem prinzipiell zwischen den drei Bereichen Spurenanalytik, optimale Auflösung und Multikomponententrennung unterschieden wird. Zur Einteilung in die drei Bereiche wird als Maß das Vielfache des Leersäulenvolumens  $V_c$  gewählt. So treten bei sehr steilen Gradienten ( $V_g \approx 5 \cdot V_c$ ) extrem schmale Peaks auf, was besonders im Bereich der Spurenanalytik zur Steigerung der Nachweisgrenze ausgenutzt werden kann. Ein Nachteil der Verwendung steiler Gradienten ist jedoch, dass in der kurzen Gradientdauer nur sehr wenige Peaks aufgetrennt werden können, d.h. nur eine sehr geringe Peakkapazität vorliegt. Liegt das Gradientenvolumen  $V_g$  im Bereich zwischen  $10-15 \cdot V_c$ , so spricht man von der „optimalen Auflösung“ einer Trennung, während Gradientenvolumina von mehr als  $15 \cdot V_c$  zur Multikomponentenanalyse verwendet werden können.

Eine der größten Leistungen dieses Konzeptes besteht darin, dass es mittels dieses Verfahrens problemlos und einfach möglich ist, eine bereits für die Bedingungen A (Säule, Gradientdauer, Fluss) optimierte Gradiententrennung ohne größere Verluste an Trennleistung auf neue Bedingungen B (Variation der Säulendimension/Säulenlänge, oder des Flusses) zu übertragen.

Die Basis des Gradient-Volumen-Konzeptes bildet das in der Trennung verwendete Gradientenvolumen. Dieses kann gemäß **Gleichung 2.20** berechnet werden:

$$V_g = t_g \cdot F$$

**Gleichung 2.20.** Gleichung zur Berechnung des Gradientenvolumen  $V_g$  mittels Gradientdauer  $t_g$  und Fluss  $F$ .

Hierbei ist  $t_g$  die Gradientdauer und  $F$  der Volumenstrom. Das Gradient-Volumen-Konzept besagt, dass, solange sowohl das Gradientenvolumen als auch die Säulenparameter konstant gehalten werden, alle Komponenten einer Probe immer bei gleicher Eluentzusammensetzung eluieren. Behält man nun die Anfangs- und

Endbedingungen der Gradiententrennung (Anfangs- und Endkonzentration an Laufmittel A bzw. B) bei, so kann die Zahl der getrennten Komponenten dadurch erhöht werden (Steigerung der Peakkapazität), indem man einen flacheren Gradienten verwendet (Steigung  $\Delta\%B / t$  geringer, wenn B das stärkere Elutionsmittel ist) [23]. Diese Steigerung der Peakkapazität ist jedoch mit einer Erhöhung der Analysenzeit  $t$  sowie einer Verringerung der Nachweisgrenze verbunden.

Bei der Übertragung eines optimierten Gradienten von Säulenlänge A auf Säulenlänge B gemäß Gradient-Volumen-Konzept muss die Gradientenzeit gemäß **Gleichung 2.21 (7)** angepasst werden:

$$(1): \frac{V_g}{V_c} = \text{const.}$$

d.f. für die Übertragung von Säule 1 auf Säule 2:

$$(2): \frac{V_{g1}}{V_{c1}} = \frac{V_{g2}}{V_{c2}}$$

$$(3): V_{g2} = V_{g1} \cdot \frac{V_{c2}}{V_{c1}}$$

Wenn gilt: Länge Säule 2 = 2·Länge Säule 1 (gleicher Innendurchmesser) folgt:

$$(4): V_{c2} = 2 \cdot V_{c1}$$

$$\text{mit: (5): } V_c = L \cdot A_c = r_c^3 \cdot \pi \cdot L = \frac{d_c^2}{4} \cdot \pi \cdot L$$

$$(6): V_{g2} = 2 \cdot V_{g1}$$

$$\text{d.f.: (7): } t_{g2} = 2 \cdot t_{g1}$$

**Gleichung 2.21.** Herleitung der Anpassung der Gradientdauer bei der Übertragung einer Trennung von Säulenlänge 1 auf Säulenlänge 2 (Verdopplung der Säulenlänge). ( $V_g$ =Gradientvolumen,  $V_c$ =Leervolumen der Säule,  $L$ =Säulenlänge,  $A_c$ =Innendurchmesser der Säule,  $t_g$ =Gradientdauer).

Dies bedeutet, dass bei einer Verdopplung der Säulenlänge auch die Gradientdauer verdoppelt werden muss, damit das Gradientvolumen konstant bleibt. Eine vergleichbare Beziehung gilt, wenn man durch Anwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes die Analysengeschwindigkeit erhöhen will. Verdoppelt man zwecks Reduzierung der Analysenzeit den Fluss, so muss man die Gradientdauer halbieren und erreicht so eine Halbierung der Analysenzeit. Ziel der Anwendung des GVK in dieser Arbeit war es, durch Variation der Säulenlänge und Gradientdauer die Peakkapazitäten zu erhöhen. Weiterhin wurde zur Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge auf die Peakkapazität ein 150 mm Monolith systematisch auf den Zusammenhang zwischen  $L$  und  $w_b$  untersucht. Zu diesem Zweck musste die Gradientzeit mittels GVK an die Säulenlänge angepasst werden.

## 2.3. Experimenteller Teil

### 2.3.1. Chemikalien

Acetonitril (HPLC, far UV) wurde von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland), bezogen. Trifluoressigsäure (TFA), Iodessigsäure, Harnstoff (reinst), Ammoniumhydrogencarbonat und das Protein Thyroglobulin wurden von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) erworben. Salzsäure (konz.) wurde von Fisher Scientific (Loughborough, UK) gekauft, während das bei allen Versuchen verwendete Wasser mit einem Wasseraufbereiter der Marke Purelab Ultra Genetic (Reinstwasser) der

Firma Elga (Siershahn, Deutschland) hergestellt wurde. Die Proteine Ribonuklease A, Cytochrom C, Lysozym,  $\alpha$ -Lactalbumin, Conalbumin, Myoglobin,  $\beta$ -Lactoglobulin A+B, Catalase, Albumin sowie der Peptid-Standard P2693, die benzoylierten Dialyseschläuche (cut off: 2000 Da) und die Dithiothreitol-Lösung und die 2-Mercaptoethanol-Lösung wurden von Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen. Trypsin (sequencing grade) wurde bei Promega (Madison, MA, USA) gekauft. Das verwendete Argon und Helium stammten von der Firma Praxair (Luxemburg).

### **2.3.2. Geräte und Säulen**

#### **Die Mikro-HPLC-Systeme für die Monolithenstudie**

Die grundlegenden Untersuchungen des 150 mm Monolithen (Studie 1) wurden auf einem Ultimate Kapillar/Nano-HPLC-System der Firma LC-Packings-A Dionex Company (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Dieses bestand aus einer Mikropumpe, einem Famos Well-Plate-Microautosampler, einem Säulenofen, einer Helium-Entgasung und einem UV-Detektor (Modell UVD-3000) mit einer 3 nl-Z-Detektorzelle. Die Messungen des zweiten Teils dieser Arbeit, der sich mit langen Monolithen (150 – 300 mm) befasste, wurde mit dem in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Mikro-Kapillar/Nano-HPLC-System (Modell Ultimate 3000) durchgeführt.

#### **Massenspektrometer und sonstige Geräte**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das chromatographische System bestehend aus dem Kapillar/Nano-HPLC-System und den PS/DVB-Monolithen, mit einem Flugzeit-Massenspektrometer (micrOTOF) der Firma Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland) gekoppelt. Die Bestimmung der Permeabilität langer Monolithen wurde mittels einer Niederdruckgradienten-Mikropumpe Modell Rheos 2000 der Firma Flux Instruments (Basel, Schweiz) durchgeführt. Die Entgasung der HPLC-Apparatur wurde mittels eines Vakuumentgasers Modell ERC 3215 $\alpha$  der Firma ERC Inc. (Kawaguchi, Japan)

realisiert. Zum Verdauen der Proteinmischungen wurde ein Thermomixer Modell Comfort der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet.

### Verwendete Trennsäulen

Für die vorliegende Studie wurden Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen unterschiedlicher Längen (37.5 mm – 300 mm) verwendet. Diese wurden durch leichte Variation des von Huber *et. al.* ausgearbeiteten Syntheseprotokolls [43] hergestellt. Durch Zugabe von zusätzlichen 5% THF wurde die Permeabilität der Trennsäulen soweit verbessert, dass die Herstellung längerer Monolithen ermöglicht wurde. Diese Monolithen wurden von der Firma LC-Packing (Amsterdam) zur Verfügung gestellt.

### 2.3.3. Verdau der Proteinmischungen

#### Der BSA-Thyroglobulin-Verdau

Um den BSA-Thyroglobulin-Verdau herzustellen, wurden entsprechende Mengen der beiden Proteine (Albumin (Rind),  $M=66430$  Da, monomer,  $0.62$  pmol/ $\mu$ l; Thyroglobulin (Schilddrüse, Rind),  $M=660000$  Da, homodimer,  $0.84$  pmol/ $\mu$ l) jeweils in einem Milliliter  $8$  M Harnstoff und  $0.5$  M Ammoniumhydrogencarbonat gelöst und nach dem Entgasen mit Argon für  $30$  min bei  $38^\circ\text{C}$  denaturiert. Danach erfolgte die Zugabe von  $50$   $\mu$ l  $0.3$  M Dithiothreitol-Lösung. Anschließend wurde die Proteinmischung für  $4$  Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  reduziert. Durch die Zugabe von  $20$   $\mu$ l einer  $2$  M Iodessigsäure-Lösung unter Eiskühlung und Lichtausschluss wurden die beiden Proteine für  $15$  min alkyliert. Zur Entfernung des überschüssigen Carboxylierungsmittels wurden die Gemische mit  $40$   $\mu$ l einer  $1$  M 2-Mercaptoethanol-Lösung versetzt und anschließend  $15$  min gerührt. Die Mischung der reduzierten und alkylierten Proteine wurde jeweils in einen Dialyseschlauch überführt und gegen  $1$  L entionisiertes Wasser für  $22$  Stunden dialysiert. Zu den Dialysaten wurde anschließend  $33$   $\mu$ g Trypsin in  $30$   $\mu$ l  $50$  mM Essigsäurelösung gegeben und diese



Mischung für weitere 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl Trifluoressigsäure wurde der Verdau anschließend gestoppt.

### Der Cytochrom C Verdau

Da der Verdau des Cytochrom C unter herkömmlichen Bedingungen (siehe BSA-Thyroglobulin-Verdau) zu schlechten Ergebnissen geführt hatte, wurde dieser mittels Rapigest™ durchgeführt. Der Verdau wurde dabei so angelegt, dass seine Konzentration 148 pmol/µl betrug.

Dazu wurden 1.776 mg des Proteins eingewogen und mittels 1000 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurden 80 µl Proteinlösung mit 4.21 µl Rapigest 2% versetzt, so dass nun die Konzentration an Rapigest 0.1% im Vial betrug. Die Mischung wurde zunächst 2 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert und anschließend 30 min bei 30°C belassen. Währenddessen wurde das Trypsin aktiviert. Danach wurden 2.84 µl Trypsin (1 µg Trypsin auf 50 µg Cytochrom C; in einem Vial sind 142 µg Cytochrom C enthalten) dazugegeben und die Mischung 90 min bei 500 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 8 µl 500 mM Salzsäure (=45.95 mM) (Konz. an HCl im Vial soll zwischen 30-50 mM betragen) wird die Lösung 45 min bei 37°C und 500 rpm inkubiert und anschließend bei 13000 rpm zentrifugiert (Abtrennung des weißen Niederschlags). Es wurden 95 µl des Cytochrom C Verdau mit einer Konzentration von 125 pmol/µl erhalten.

### 2.3.4. In der Studie verwendete Proben

Zur Überprüfung der chromatographischen Leistungsfähigkeit der PS/DVB-Monolithen wurden im ersten Teil der Studie neben der 9er Proteinmischung auch der Peptid-Standard P2693 und ein Cytochrom C Verdau verwendet. Zusätzlich wurden im zweiten Teil der Arbeit die Peakkapazität und die Beladbarkeit langer Monolithen (150-300 x 0.2 mm i.D.) mittels eines komplexen BSA-Thyroglobulin-Verdau (vgl. 2.3.3) bestimmt. Die im Standard (P2693) enthaltenen Peptide sowie die in der Proteinmischung enthaltenen Proteine sind in nachfolgender **Tabelle 2.1**

dargestellt. Dabei wurden die Peptide/Proteine in der Tabelle so angeordnet, dass ihre numerische Reihenfolge auch der experimentell bestimmten Retentionsreihenfolge entspricht. Die in der Studie verwendete Konzentration betrug für den Peptid-Standard 0.5 ng/µl und für die Protein-Mischung 10 ng/µl.

**Tabelle 2.1.** Aufstellung der Proben, die in der Monolithenstudie verwendet wurden. Die Proben sind dabei so angeordnet, dass ihre Reihenfolge der experimentell bestimmten Retentionsreihenfolge entspricht.

Retentionsreihenfolge	P 2693 Peptid-Standard	Protein-Mischung
1	Bradikinin-Fragment [1-5]	Ribonuklease A
2	Vasopressin [Arg <sup>8</sup> ]	Cytochrom C
3	Methionin Enkephalin	Lysozym
4	Leucin Enkephalin	α-Lactalbumin
5	Oxytocin	Conalbumin
6	Bradikinin	Myoglobin
7	LHRH Decapeptid	β-Lactoglobulin B
8	Bombesin	β-Lactoglobulin A
9	Substanz P	Catalase

### 2.3.5. Massenspektrometrische Bedingungen für die Analyse des BSA-Thyroglobulin-Verdaus

Tuningparameter des ESI-ToF-Massenspektrometers, die zur Analyse des BSA-Thyroglobulin-Verdaus verwendet wurden:

- Scan Bereich (standard) : 100-3000 m/z
- Modus : Positiv
- Trockengas : 4.0 l/min
- Sprühgas : 0.2 bar
- Capillary Exit : 133.9 V
- Hexapole RF : 362.9 V
- Skimmer 1 : 41.9 V
- Hexapole 1 : 32.2 V

## 2.4. Einflusses der Säulenlänge auf die Peakkapazität bei der Trennung von Protein- und Peptid-Mischungen

### 2.4.1. Einführung

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt, lag das Ziel dieser Arbeit darin, in Zusammenarbeit mit der Firma LC-Packings Amsterdam den Polymerisationsprozess bestehender und bereits in den verschiedensten Bereichen der modernen Bioanalytik (DNA, Protein- und Peptidanalytik) etablierter PS/DVB-Monolithen (zur Zeit kommerziell als 50 x 0.2 mm i.d. bzw. 50 x 0.1 mm i.d. verfügbar) eingehend zu untersuchen und anschließend soweit zu verbessern, dass die Herstellung langer und sehr langer Trennsäulen (150 – 300 mm) möglich war. Durch die Erhöhung der Säulenlänge sollte die Peakkapazität erheblich gesteigert werden (vgl. Theorie im Allgemeinen Teil), um dadurch die Anwendbarkeit der Trennmedien für sehr komplexe Probengemische zu verbessern. Erste Voruntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit hatten bereits gezeigt, dass die Steigerung der Säulenlängen mit den bestehenden Syntheseprotokollen für die 60 x 0.2 mm i.d. Monolithen nicht möglich war, da die so hergestellten längeren Monolithen (150 x 0.2 mm i.d.) einen zu großen Druckabfall (ca. 380 bar bei F=900 nl/min) besaßen. Zusätzlich war bereits aus früheren Arbeiten von Huber *et. al.* bekannt, dass es bei der Herstellung längerer Monolithen immer wieder zum Auftreten von Inhomogenitäten während des Syntheseprozesses kam, die zu einer drastischen Verschlechterung der Trenneffizienz der Säulen geführt hatten. Daher musste der Syntheseprozess soweit verändert werden, dass die Porosität der Säulen erhöht werden konnte, um auch bei längeren Säulen einen akzeptablen Druckabfall zu erhalten. Um die Trennleistung zu erhalten, musste dabei gleichzeitig das Auftreten der störenden Inhomogenitäten vermieden werden.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, dass neben der Untersuchung des Syntheseprozesses auf Inhomogenitäten auch die Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge auf die chromatographische Trennleistung erlaubte.

## 2.4.2. Untersuchung von Inhomogenitäten bei PS/DVB-Monolithen und Einflusses der Säulenlänge auf die Trenneffizienz

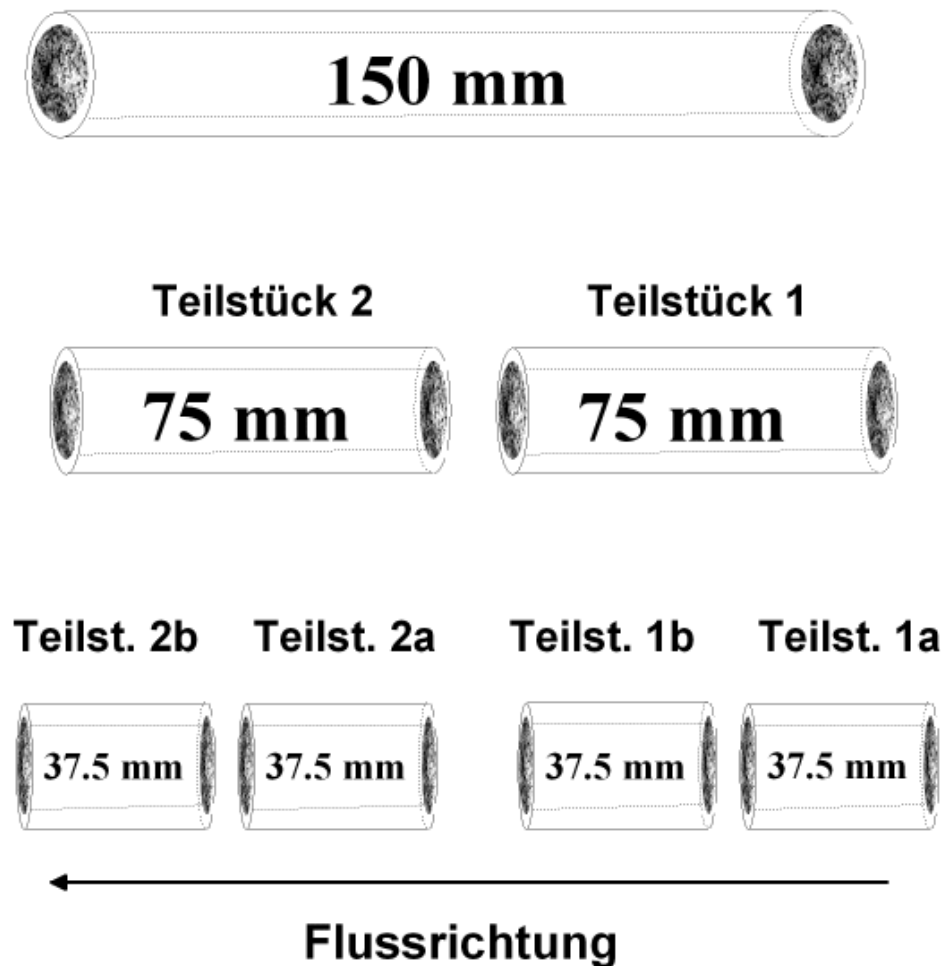
Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe das Auftreten von Inhomogenitäten während des Syntheseprozesses langer Monolithen sowie der Einfluss der Säulenlänge auf die chromatographische Leistungsfähigkeit näher untersucht werden konnte. Dazu musste eine Vielzahl von Einflussfaktoren beachtet und näher untersucht werden.

Zuerst wurden dazu zunächst ein 150 mm langer Monolith untersucht (Bereitstellung des Monolithen durch die Firma LC-Packings), dessen Porosität durch den Zusatz von 5% THF soweit modifiziert wurde, dass bei einem Fluss von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  ein akzeptabler Druckabfall (ca. 200 bar) erhalten wurde. Dieser Monolith wurde zunächst im Gradientmodus mittels verschiedener Analyten (P2693 Peptid-Standard, 9er Protein Mischung und eines Cytochrom C Verdaus) auf seine chromatographische Leistungsfähigkeit untersucht. Als relevante Parameter für die Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge auf die Trenneffizienz sowie dem Auftreten von Inhomogenitäten wurden dabei die Peakhalbwertsbreiten, die relativen Retentionszeiten und die Peakkapazitäten untersucht. Nach der vollständigen Charakterisierung des 150 mm Monolithen, wurde dieser anschließend in der Mitte in zwei gleich lange 75 mm Teilstücke (Teilstück 1 und 2) geteilt und jeder dieser kürzeren Teilstücke unter den gleichen Bedingungen (Temperatur, Säulenfluss, Proben) wie der ursprüngliche 150 mm Monolith untersucht. Eine schematische Darstellung dieses Verfahrens ist in **Abbildung 2.4** dargestellt.

Wäre es während des Syntheseprozesses zur Ausbildung störender Inhomogenitäten gekommen, so könnten diese dadurch festgestellt werden, dass sich die beiden gleich langen 75 mm Teilstücke signifikant in ihrer chromatographischen Leistungsfähigkeit unterscheiden. Gleichzeitig kann mittels der beiden kürzeren 75 mm Monolithen der Einfluss der Säulenlänge auf die relative Retentionszeit, die Peakbasisbreite und die Peakkapazität untersucht werden.

Obwohl für Proteine und Peptide das On-Off-Modell (vgl. Allgemeiner Teil) angenommen werden kann, d.h. man davon ausgehen kann, dass diese am Säulenkopf vollständig solange adsorbiert werden, bis eine ausreichend hohe und analytenspezifische Eluentstärke erreicht ist, sollten mögliche störende und

unerwünschte Bandenverbreiterungseffekte infolge einer vorzeitigen isokratischen Elution der Analyten dadurch ausgeschlossen werden, dass die Analyten erst beim tatsächlichen Eintreffen des Gradienten am Säulenkopf in den Volumenstrom injiziert werden.



**Abbildung 2.4.** Schematische Darstellung der Vorgehensweise der Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge auf die chromatographische Leistungsfähigkeit bzw. das Auftreten von Inhomogenitäten während des Syntheseprozesses. Dabei wird ein 150 mm Monolith stufenweise zunächst in je zwei 75 mm Teilstücke zerlegt, bzw. anschließend werden die beiden 75 mm Teilstücke in je vier 37.5 mm lange Teilstücke zerlegt und jedes Teilstück wird einzeln untersucht.

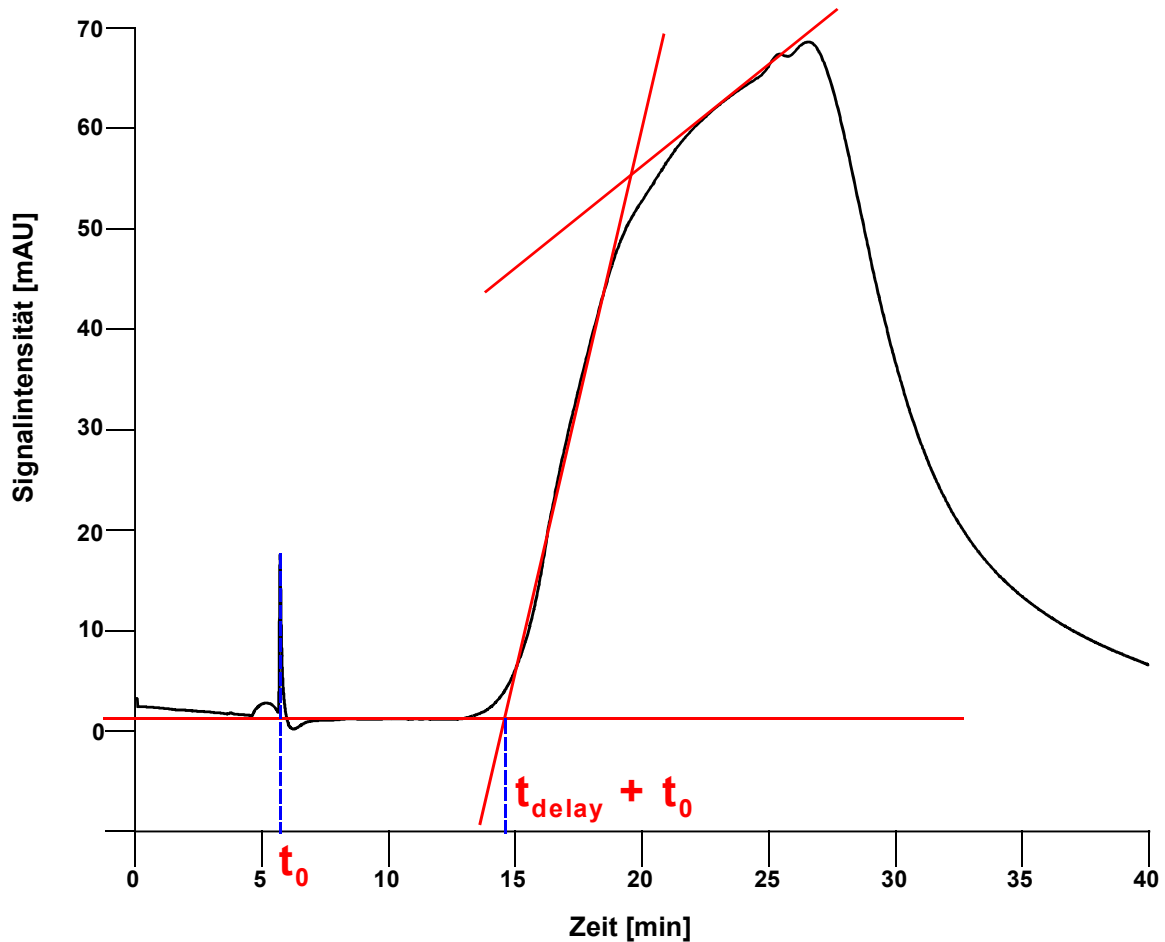
Für die zeitliche Verzögerung zwischen der Abmischung des Gradienten in der Mischkammer und dem Auftreffen des Gradienten am Säulenkopf ist die

zurückzulegende Flussstrecke zwischen Mischkammer und Säulenkopf verantwortlich. Die dafür benötigte Zeit hängt signifikant vom Primärfluss des HPLC-Systems, also dem Fluss zwischen Mischkammer und Splittsystem, ab. Da unterschiedlich lange Säulen einen unterschiedlich hohen Druckabfall generieren, kommt es dazu, dass das HPLC-System, das mit einem so genannten „aktiven Splitt“ arbeitet, zur Erzeugung eines konstanten Säulenflusses von 2.0 µl/min (Säulenfluss für alle Säulenlängen gleich) nach dem Splittsystem für verschiedene Säulenlängen unterschiedliche Primärflüsse benötigt. Je kürzer die Säule, desto geringer der Druckabfall und desto niedriger ist der Primärfluss im HPLC-System, der für einen konstanten Säulenfluss von 2.0 µl/min benötigt wird. Dies führt jedoch dazu, dass die zeitliche Verzögerung zwischen der Gradientabmischung in der Mischkammer und dem Auftreffen am Säulenkopf umso größer wird, je kürzer die Säule wird. Da es trotz der Annahme des On-Off-Modells immer zusätzlich zu einer unerwünschten isokratischen Elution einzelner Analyten in der Probe kommen kann, könnte der Verzicht auf eine zeitlich verzögerte Injektion (Injektion der Probe in den Gradienten) dazu führen, dass diese isokratisch eluierenden Analyten, je nach Säulenlänge, einer unterschiedlich großen zusätzlichen Bandenverbreiterung unterworfen sind. Je niedriger der Primärfluss ist, desto länger braucht der Gradient von der Mischkammer zum Säulenkopf (und zu den bereits vorzeitig isokratisch eluierenden Analyten) und desto höher ist damit die Verweildauer der bereits isokratisch eluierenden Analyten im Volumenstrom, was wiederum zu einer zusätzlichen Bandenverbreiterung führt. Da aufgrund dieses Vorgangs die Messergebnisse für lange und kurze Monolithen nicht direkt miteinander vergleichbar wären, wurde für diese Studie das Verfahren der „verzögerten“ Injektion, d.h. der Injektion der Analyten in den Gradienten, gewählt. Um die Analyten direkt in den Gradienten injizieren zu können, musste die Zeit, die der Eluent für die Strecke zwischen Mischkammer und Injektionsventil benötigt, für jede Säulenlänge und jede Säule jeweils neu und spezifisch bestimmt werden. Diese Zeit kann gemäß folgender Gleichung berechnet werden:

$$t_{\text{Injektion}} = t_{\text{delay}} - t_0$$

**Gleichung 2.22.** Gleichung zur Berechnung der Verzögerungszeit für eine Injektion der Probe in den Gradienten.

Um die säulen- und längenspezifischen Werte für  $t_{\text{delay}}$  und  $t_0$  experimentell zu ermitteln, wurde für jede Säule jeweils ein linearer Gradient von 0-100% verwendet. Dabei enthielt das Laufmittel B neben 80% Acetonitril noch zusätzlich 100 ppm des UV-aktiven Inertmarkers Thioharnstoffes. Da der Inertmarker nicht auf der Säule retardiert wird, kann dadurch die Durchflusszeit  $t_0$  der Säule bestimmt werden. Da Thioharnstoff gleichzeitig bei einer Wellenlänge von 210nm eine UV-Aktivität zeigt, konnte dieser auch zur Bestimmung der Delay-Zeit eingesetzt werden. Um die Delay-Zeit, d.h. die Zeit zwischen Abmischung des Gradienten in der Mischkammer und Eintreffen des Gradienten im Detektor, bestimmen zu können, wurde ein extrem steiler Gradient mit einer Steigung von 50% B/min gewählt. Trifft nun dieses UV-aktive Laufmittel im Detektor ein, d.h. es wurde die Strecke zwischen Mischkammer und Detektor, so führt dies dazu, dass dies als Anstieg der Signalintensität wahrgenommen wird. Aufgrund der Steilheit des Gradienten kommt es dabei zu einem massiven Anstieg des Detektorsignals. Legt man an die Steigung des gemessenen Graphen eine Tangente an, so kann man durch den Schnittpunkt dieser Tangente mit einer zweiten Tangente an die Basislinie die Delay-Zeit ( $t_{\text{delay}}$ ) bestimmen. Dieses ist exemplarisch in **Abbildung 2.5** für einen 210 mm Monolithen dargestellt. Aus diesen experimentellen Daten für  $t_{\text{delay}}$  und  $t_0$  kann nun mittels **Gleichung 2.22** die Zeit für die verzögerte Injektion der Probe bestimmt werden.



**Abbildung 2.5.** Bestimmung der Delay-Zeit für eine verzögerte Injektion der Probe. Säule: PS/DVB-Monolith, 210 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B), A+ 80% ACN und 100ppm Thioharnstoff; linearer Gradient: 0-100% B in 2 min; Fluss: 2µl/min; Temperatur: 55°C; Probe: 2 ppm Thioharnstoff.

Nach der vollständigen Charakterisierung der beiden 75 mm Teilstücke (1 und 2) wurde jedes dieser Teilstücke wiederum in zwei gleich lange Teilstücke (37.5 mm) zerlegt (**Abbildung 2.4**). Auch diese kürzeren Teilstücke wurden wiederum wie die 75 mm Monolithen auf das Auftreten von Inhomogenitäten und Einfluss der Säulenlänge auf die Trennleistung untersucht.

Um einen bestehenden und optimierten Gradienten von Säulenlänge A auf Säulenlänge B ( $A < B$  oder  $A > B$ ) übertragen zu können, muss neben der Neubestimmungen der Zeit für die verzögerte Probeninjektion auch die Theorie des Gradient-Volumen-Konzepts (GVK) berücksichtigt werden. Dieses Konzept, das bereits im Allgemeinen Teil dieser Arbeit näher erläutert wurde, ermöglicht die Anpassung bestehender Gradientbedingungen an neue Säulenlängen und

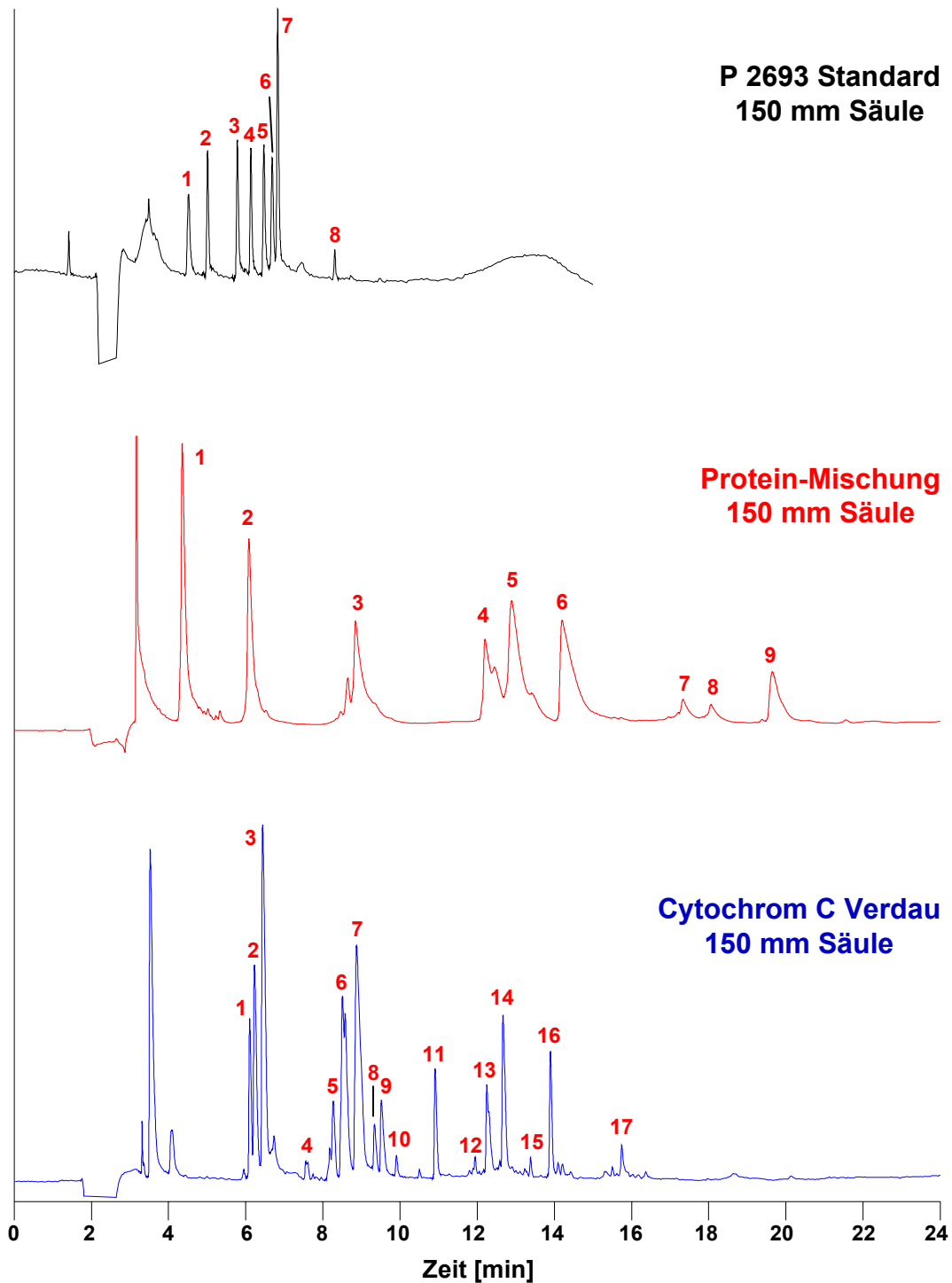


Flussraten, ohne dabei die Effizienz der Trennung zu verschlechtern. Um den Einfluss des GVK näher untersuchen zu können, wurden alle Messungen sowohl mit als auch ohne Verwendung des GVK (für alle Säulenlängen) durchgeführt. Alle weiteren experimentellen Bedingungen wurden für alle Säulenlängen konstant gehalten. Die Flussrate betrug dabei unabhängig von der Säulenlänge 2.0 µl/min, die Trenntemperatur 55°C und es wurden 0.25 ng des P2693 Peptid-Standards, 10 ng der Protein-Mischung und 6.25 pmol (=81 ng) des Cytochrom C Verdaus als Proben verwendet. Im Rahmen dieser Studie wurden zwei verschiedene 150 mm Monolithen untersucht. Ein Überblick über die verwendeten Gradienten (bei Anwendung des GVK) ist in **Tabelle 2.2** gegeben.

**Tabelle 2.2.** Mittels Gradient-Volumen-Konzept bestimmte Gradientenzeiten für die verschiedenen Säulenlängen.

Säulenlänge	150 mm	75 mm	37.5 mm
Probe	Gradientzeit [min]		
Peptid-Standard (P2693)	7.50	3.75	1.88
Protein-Mischung	18.50	9.25	4.63
Cytochrom C Verdau	25.00	12.50	6.25

Ein Beispiel für die Trennung des P2693 Peptid-Standards, der 9er Protein-Mischung und des Cytochrom C Verdaus auf einem 150 mm Monolithen ist in **Abbildung 2.6** dargestellt. Die Zuordnung der einzelnen Peaks zu den entsprechenden Proteinen bzw. Peptide des Standards kann mittels **Tabelle 2.1** durchgeführt werden. Die Peptide des Cytochrom C Verdaus wurden einfach von 1-17 durchnummeriert, ohne dass eine spezielle Zuordnung dieser Peptide erfolgte.



**Abbildung 2.6.** Trennung eines P2693 Peptid-Standards, einer 9er Protein-Mischung und eines Cytochrom C Verdau auf einem 150 x 0.2 mm i.d. PS/DVB-Monolithen (22-03-2005 #4).

Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: 0-50.4% ACN in 7.5 min (P2693), 16-32% ACN in 18.5 min (Proteine), 0-80% ACN in 25 min (Verdau); Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 55°C; Probe: 0.25 ng P2693, 10 ng Proteine und 81 ng Cytochrom C.

Wie aus **Abbildung 2.6** ersichtlich, konnten sowohl die Peptide des Standards, die Peptide des Cytochrom C Verdau als auch die Proteine der Mischung mittels des 150 x 0.2 mm i.D. Monolithen aufgetrennt werden. Für die Peptide des Standards wurde dabei eine durchschnittliche Peakhalbwertsbreite von 0.03 min (1.8 sek.), für die Proteine eine durchschnittliche Peakhalbwertsbreite von 0.15 min (9 sek.) und für die Peptide des Cytochrom C Verdaus eine durchschnittliche Peakhalbwertsbreite von 0.06 min (3.6 sek.) bestimmt.

Die Ergebnisse für die Trennung der Proben auf kürzeren Säulen sowie die dabei gemessenen Peakhalbwertsbreiten bzw. berechneten Peakkapazitäten sind im nachfolgenden Kapitel dieser Arbeit aufgeführt. Dabei werden zunächst die Ergebnisse mit Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes (Kapitel 2.4.3) vorgestellt, während die Ergebnisse ohne Anwendung des GVK in Kapitel 2.4.4 behandelt werden.

### **2.4.3. Einfluss der Säulenlänge auf chromatographische Parameter unter Berücksichtigung des Gradient-Volumen-Konzeptes**

In diesem Kapitel wird anhand verschiedener Säulenlängen (150 mm, 75 mm und 37.5 mm) der Einfluss der Säulenlänge auf die chromatographischen Parameter der Retentionszeit, der Peakbasisbreite, der Auflösung und der Peakkapazität untersucht. Dazu wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, zwei 150 mm PS/DVB-Monolithen (interne Bezeichnung der Säulen: Säule 1: 22-03-2005 #3, Säule 2: 22-03-2005 #4) stufenweise in kürzere Teilstücke zerlegt, und jeder dieser Teilmonolithen wurde anhand verschiedener Proben (Peptid-Standard, Protein-Mischung und Cytochrom C Verdau) auf seine Trenneffizienz untersucht.

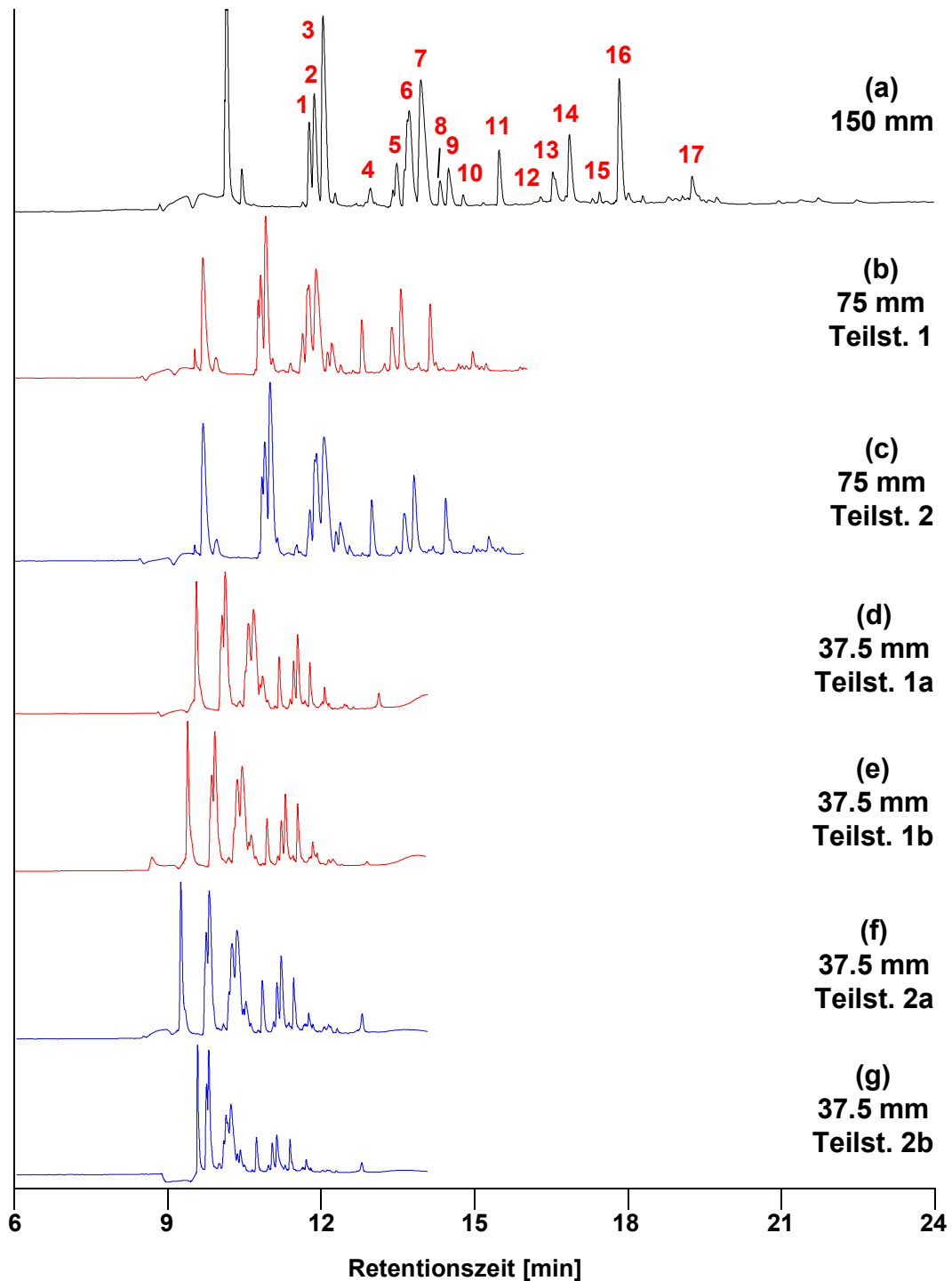
#### **1. Einfluss der Säulenlänge auf die relative Retentionszeit und die Auflösung**

Um den Einfluss der Säulenlänge auf die Auflösung und die chromatographische Retention besser untersuchen zu können, war es notwendig, zunächst die

experimentellen Daten zu normalisieren und die Größe der relativen Retentionszeit  $t_{\text{relativ}}$  einzuführen. Dazu wurde zunächst anhand der experimentellen Retentionszeiten der jeweiligen Messung ein „Zeit-Fenster“ so definiert, dass dem erst eluierenden Peak 0% und dem letzt eluierenden Peak 100% auf der Zeitskala zugeordnet werden konnten. Die Retentionszeiten aller weiteren Peaks wurden nun „relativ“ zu diesem Zeitfenster eingeordnet. Mittels dieser normalisierten relativen Retentionszeiten konnten nun Änderungen in den Retentionszeiten bzw. Änderungen in den Auflösungen zwischen zwei Peaks relativ einfach festgestellt und grafisch dargestellt werden. Ändert sich die Auflösung zwischen zwei Peaks bei der Variation der Säulenlänge, so ändern sich deren relative Retentionszeiten und dieses kann anhand der grafischen Darstellung durch eine Abweichung von der idealen „Linie“ abgelesen werden.

Wie aus dem Chromatogramm in **Abbildung 2.7** (a) ersichtlich, können nahezu alle 17 untersuchten Peptide mit dem 150 mm Monolithen aufgetrennt werden. Lediglich bei Peak 1 und 2 konnte keine vollständige Basislinientrennung erhalten werden.

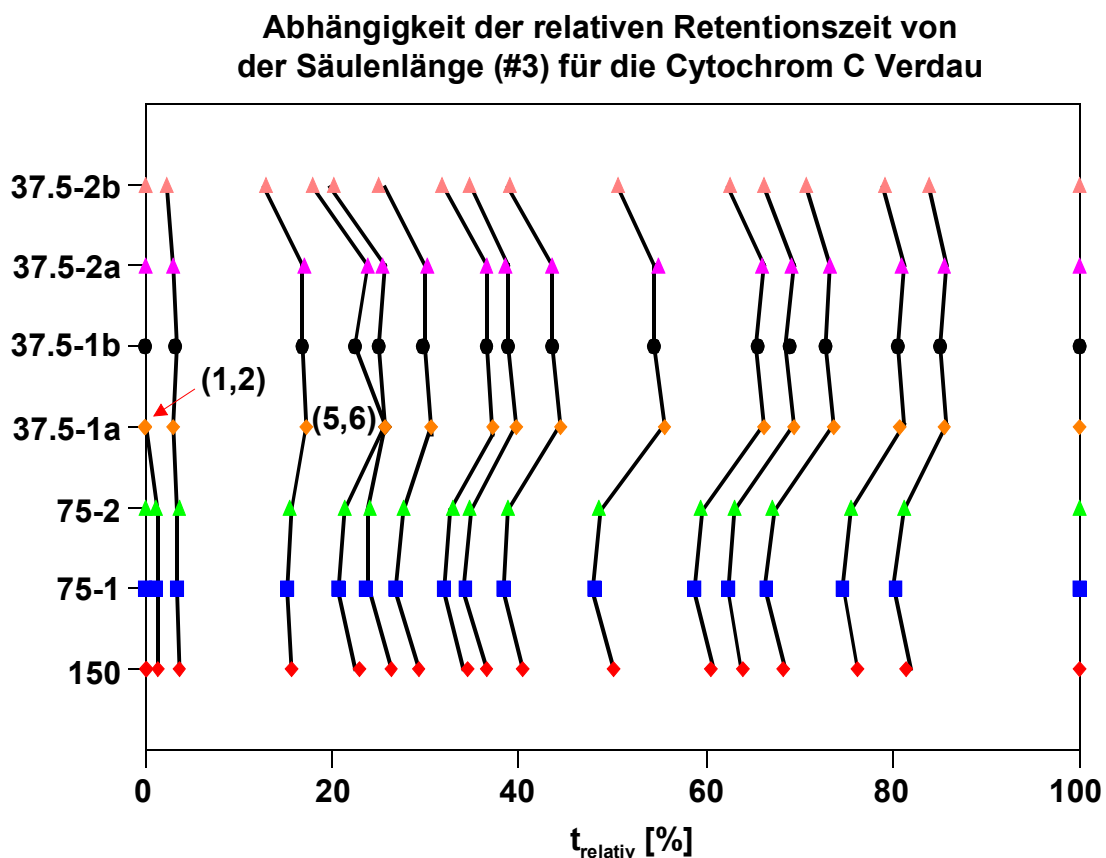
Vergleicht man das Chromatogramm der Trennung des Verdaus auf dem 150 mm Monolithen (**Abbildung 2.7** (a)) mit den Chromatogrammen der Trennungen auf den kürzeren 75 mm Teilstücken (**Abbildung 2.7** (b) u. (c)), so sieht man, dass sich im Vergleich zur langen Säule die Trenneffizienz etwas verschlechtert hat. Dies kann anhand der Abnahme der Auflösung zwischen Peak 1 und 2 bzw. zwischen Peak 5 und 6 festgestellt werden. Weiterhin kann aus den Chromatogrammen entnommen werden, dass beide Teilstücke annähernd vergleichbare Trennergebnisse liefern. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die Ausbildung von Inhomogenitäten während des Polymerisationsprozesses weitgehend vermieden werden konnte. Vergleicht man die Ergebnisse des 150 mm Monolithen und der beiden 75 mm Teilstücke mit denen der vier kürzeren 37.5 mm Teilstücke (**Abbildung 2.7** (d)-(g)), so kann ein signifikanter Verlust an Trenneffizienz festgestellt werden.



**Abbildung 2.7.** Trennung eines Cytochrom C Verdaus auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005#3) mit Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes. Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: (a) 0-80% ACN in 25 min, (b,c) 0-80% ACN in 12.5 min, (d-g) 0-80% ACN in 6.25 min; Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 55°C; 214 nm; Probe: 81 ng Cytochrom C.

Um diese merkbare Änderung des Retentionsverhaltens näher untersuchen zu können, wurden die relativen Retentionszeiten der einzelnen Peaks berechnet und gegen die entsprechenden Säulenlängen aufgetragen. Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind in **Abbildung 2.8** grafisch dargestellt. Dabei sind auf der x-Achse die relative Retentionszeit  $t_{\text{relativ}}$  gegen die verschiedenen Säulenlängen (vgl. **Abbildung 2.4**) aufgetragen.

Wie aus den Chromatogrammen in **Abbildung 2.7** (d) – (g) ersichtlich, führt die Halbierung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm dazu, dass die Peaks 1 und 2 bzw. 5 und 6 (Säule 37.5-1a) zu einem Doppelpeak überlagern. Diese Peaküberlagerungen können auch mit Hilfe der Auftragung der relativen Retentionszeiten gegen die Säulenlängen (**Abbildung 2.8**) festgestellt werden.



**Abbildung 2.8.** Normalisierte Retentionszeiten für die Trennung eines Cytochrom C Verdaus auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005 #3) unter Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes.

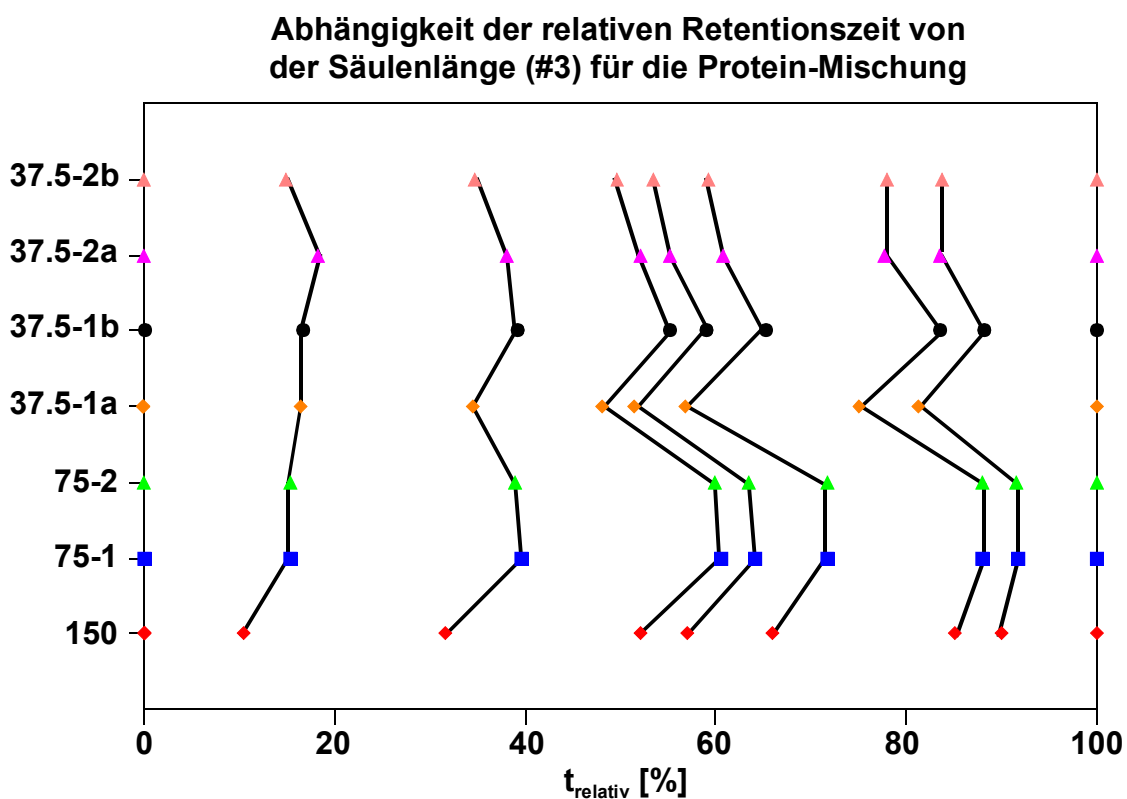
Aus **Abbildung 2.8** kann ebenfalls abgelesen werden, dass für die Trennung des Cytochrom C Verdaus auf allen untersuchten Säulenlängen nur eine sehr geringe Schwankung der relativen Retentionszeiten festzustellen ist.

Insgesamt kann aus **Abbildung 2.7** und **Abbildung 2.8** gefolgert werden, dass die Trennleistung einer Säule signifikant mit der Säulenlänge korreliert. Je kürzer die Trennsäule, desto geringer ist auch ihre Trenneffizienz. Während die Trennung des komplexen Verdaus auf den längeren Monolithen (75 mm und 150 mm) möglich war, kommt es auf den kürzeren Trennsäulen (37.5 mm) zu einem massiven Verlust an Auflösung und zur Überlagerung einzelner Peaks. Vergleicht man jedoch die Trenneffizienz von Säulen gleicher Länge miteinander, so erhält man sowohl für die beiden 75 mm Teilstücken als auch für die vier 37.5 mm Teilstücke relativ vergleichbare Trenneffizienzen. Lediglich das Teilstück 37.5-1a zeigt für den Verdau eine etwas reduzierte Trennleistung, da hier, im Gegensatz zu den anderen 37.5 mm Säulen, die Peaks 5 und 6 koelulieren.

Aufgrund dieser vergleichbaren Trenneffizienzen kann daraus für den ursprünglichen 150 mm Monolithen geschlossen werden, dass die Polymerisation weitgehend homogen verlaufen ist und es nicht zu Ausbildung störender Fehlstellen im Säulenbett gekommen ist. Da auch für den zweiten 150 mm Monolithen (22-03-2005 #4) vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Homogenität des Säulenbettes erhalten wurden, kann daraus abschließend gefolgert werden, dass die Synthese längerer Monolithen möglich und auf hohem Niveau reproduzierbar ist (vgl. Daten für Säule #3 und #4). Diese reproduzierbare Kontrolle des Syntheseprozesses ist eine der Grundvoraussetzungen für die Anwendung und Untersuchung längerer Monolithen bei komplexen biologischen und medizinischen Trennproblemen.

Vergleichbare Ergebnisse für die Abhängigkeit der Trenneffizienz von der Säulenlänge wurden auch für die Trennung des Peptid-Standards (**Abbildung 2.48**) und der Protein-Mischung (**Abbildung 2.49**) erhalten. Die Auftragung der relativen Retentionszeiten gegen die Säulenlängen ist für die Protein-Mischung in **Abbildung 2.9** dargestellt. Vergleicht man die relativen Retentionszeiten der Protein-Mischung mit denen des Cytochrom C Verdaus, so sieht man, dass hier die Schwankungen der relativen Retentionszeiten etwas größer sind, es jedoch im Gegensatz zum Verdau, nicht zu einer Koelution mehrerer Substanzen kommt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich die Retentionszeiten der Proteine stärker als die der Peptide des

Verdaus unterscheiden und somit die Auflösung zwischen den einzelnen Peaks größer ist. Somit führt der auch für die Protein-Mischung beobachtete massive Verlust an Trenneffizienz bei der Reduzierung der Säulenlänge zwar auch zu einer Verschlechterung der Trennleistung und damit zu einer Verschlechterung der Auflösung zwischen den einzelnen Peaks, was jedoch, wegen der größeren Unterschiede in den Retentionszeiten, nicht zu einer Koelution führt. Dieser Verlust an Trennleistung ist vor allem zwischen Peak 4 und 5 erkennbar. Hat man auf dem 150 mm Monolithen noch eine sehr gute Basislinientrennung der beiden Analyten, so verschlechtert sich diese signifikant mit der Reduzierung der Säulenlänge.



**Abbildung 2.9.** Normalisierte Retentionszeiten für die Trennung einer 9er Protein-Mischung auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005 #3) unter Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes.

Vergleicht man die Leistungsfähigkeit von Säulen gleicher Länge miteinander (Säule #3 und #4), so erhält man, wie bereits für den Verdau festgestellt, für ihre Trenneffizienzen weitgehend vergleichbare Ergebnisse. Dies kann wiederum als ein eindeutiges Indiz für die weitgehende Homogenität des ursprünglichen 150 mm Monolithen angesehen werden.



## 2. Einfluss der Säulenlänge auf die Peakbasisbreite/Peakhalbwertsbreite

In diesem Kapitel wird der Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreite ( $w_h$ ) untersucht. Sowohl die Peakhalbwertsbreite ( $2,355\sigma$ ) als auch die Peakbasisbreite/Peakbreite ( $w_b, 4\sigma$ ) sind wichtige Parameter für die Berechnung der Peakkapazitäten einer Trennsäule. Daher sind diese Parameter entscheidend bei der Beurteilung, ob eine Erhöhung der Säulenlänge zu einer Verbesserung der Trennleistung der Säule führt. Wie bereits im theoretischen Teil dieser Arbeit erläutert (Kapitel 3), sollte im Idealfall folgende grundlegende Beziehung (**Gleichung 2.23**) für die Abhängigkeit der Peakbasisbreite von der Säulenlänge gelten:

$$\sigma_m = \sqrt{m} \cdot \sigma_1$$

**Gleichung 2.23.** Abhängigkeit der Peakbreite  $\sigma$  von der Säulenlänge. Erhöht man die Länge um den Faktor  $m$ , so steigert sich die Peakbreite  $\sigma$  um den Faktor  $\sqrt{m}$  ( $\sigma_m$ =Peakbreite der um Faktor  $m$  verlängerten Säule,  $\sigma_1$ =Peakbreite der „kürzeren“ Säule,  $m$ =Faktor der Säulenverlängerung).

Wie in **Gleichung 2.23** dargestellt, sollte sich die Peakbreite, bei der Erhöhung der Säulenlänge um Faktor  $m$ , nicht proportional, sondern nur um den Faktor  $\sqrt{m}$  erhöhen. Somit sollte sich bei einer Verdopplung der Säulenlänge ( $m=2$ ) die Peakbreite lediglich um Faktor  $\sqrt{2}$  (1.4142) erhöhen. Da die Peakkapazität sich aus dem Quotienten von Gradientdauer und Peakbasisbreite ( $P_K=1+t_g/w_b$ ) berechnet, sollte somit eine Erhöhung der Säulenlänge um  $m$  zu einer signifikanten Verbesserung der Peakkapazität und damit zur Verbesserung der Trennleistung einer Säule führen.

Um den Einfluss der Säulenlänge auf die Peakbreite bzw. Peakhalbwertsbreite untersuchen zu können, wurden jeweils 3 Wiederholungsmessungen pro Säulenlänge und Probe (P2693, Protein-Mischung, Verdau) durchgeführt. Anhand der experimentellen Daten (Chromatogramme) wurden anschließend die Peakhalbwertsbreiten (Peakbasisbreiten) für die einzelnen Peptide (P2693, Cytochrom C Verdau) bzw. Proteine (Protein-Mischung) bestimmt und in Abhängigkeit der Säulenlänge aufgetragen. Die experimentell bestimmten mittleren

Peakbasisbreiten sind in nachfolgender **Tabelle 2.3** für Säule #3 und Säule #4 (und deren kürzere Teilstücke) tabellarisch zusammengestellt. Die Daten für den Peptid-Standard sind im Anhang dieses Kapitels in **Tabelle 2.17**, die Daten für die Protein-Mischung in **Tabelle 2.18** aufgeführt. Die Peakbasisbreite ( $4\sigma$ ) kann aus der Peakhalbwertsbreite ( $w_h$ ) durch Multiplikation mit dem Faktor  $2.355/4$  ( $\approx 1,699$ ) berechnet werden.

**Tabelle 2.3.** Tabellarische Zusammenstellung der bestimmten mittleren Peakbasisbreiten sowie der berechneten Peakkapazitäten für die beiden 150 mm Monolithen (22-03-2005 #3 und #4) sowie deren kürzere Teilstücke.

<b>Cytochrom C Verdau</b>				
<b>Säule</b>	<b>Säulenlänge [mm]</b>	<b><math>w_{h \text{ mittel}}</math> [min]</b>	<b><math>w_{b \text{ mittel}}</math> [min]</b>	<b><math>P_{\text{mittel}}</math></b>
<b>22-03-2005 # 4</b>	150	0.063	0.108	233
<b>Teilstück 1</b>	75	0.048	0.081	156
<b>Teilstück 2</b>	75	0.055	0.094	134
<b>Teilstück 1a</b>	37.5	0.060	0.102	62
<b>Teilstück 1b</b>	37.5	0.061	0.104	61
<b>Teilstück 2a</b>	37.5	0.051	0.086	73
<b>Teilstück 2b</b>	37.5	0.053	0.090	70
<b>22-03-2005 # 3</b>	150	0.071	0.121	208
<b>Teilstück 1</b>	75	0.056	0.095	133
<b>Teilstück 2</b>	75	0.063	0.106	118
<b>Teilstück 1a</b>	37.5	0.057	0.097	66
<b>Teilstück 1b</b>	37.5	0.055	0.093	68
<b>Teilstück 2a</b>	37.5	0.056	0.095	66
<b>Teilstück 2b</b>	37.5	0.043	0.074	86

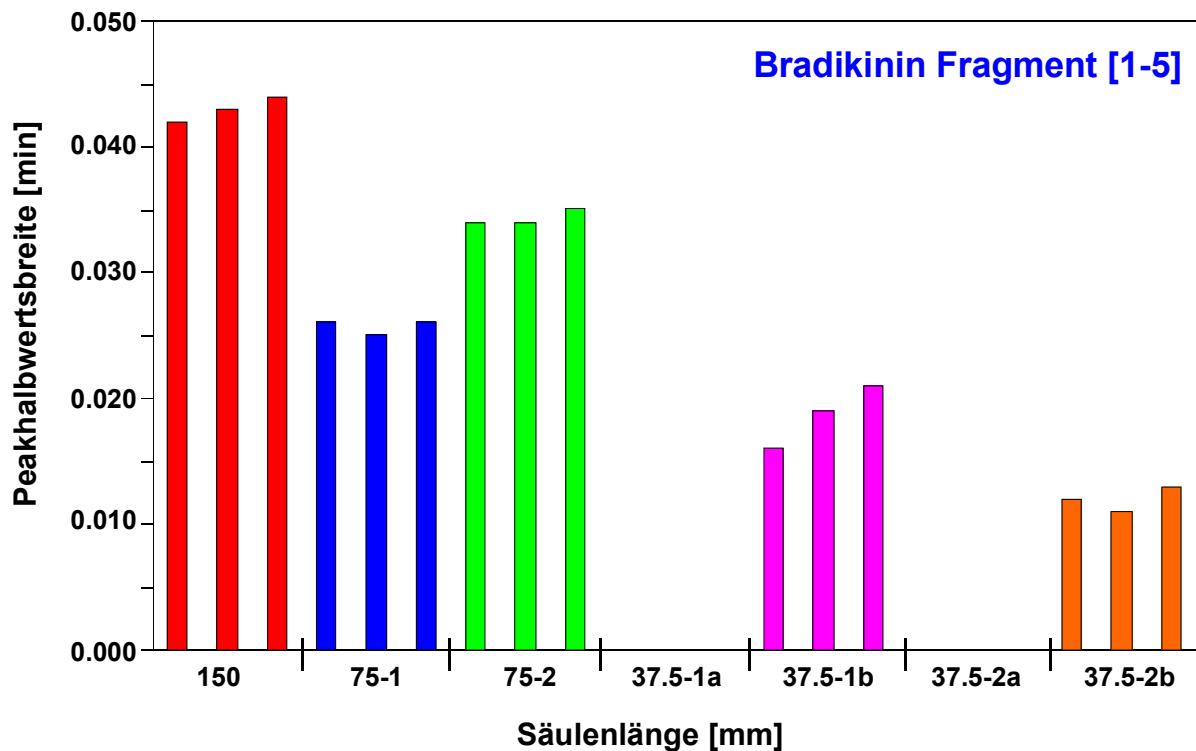
a) Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreite der Peptide des P2693 Standards und des Cytochrom C Verdaus

In diesem Kapitel wird der Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreiten der einzelnen Peptide des Peptid-Standards P2693 und des Cytochrom C Verdaus diskutiert. Exemplarisch für die erhaltenen Ergebnisse werden die Resultate für das Bradikinin Fragment [1-5] (**Abbildung 2.10**) und das Vasopressin [Arg<sup>8</sup>] (**Abbildung 2.11**) vorgestellt. Dabei wurden diese beiden Peptide so ausgewählt, dass die bestimmte Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge in guter

(Bradikinin Fragment [1-5]), bzw. schlechter (Vasopressin [Arg<sup>8</sup>]) Übereinstimmung mit dem erwarteten Verhalten (**Gleichung 2.23**) stand.

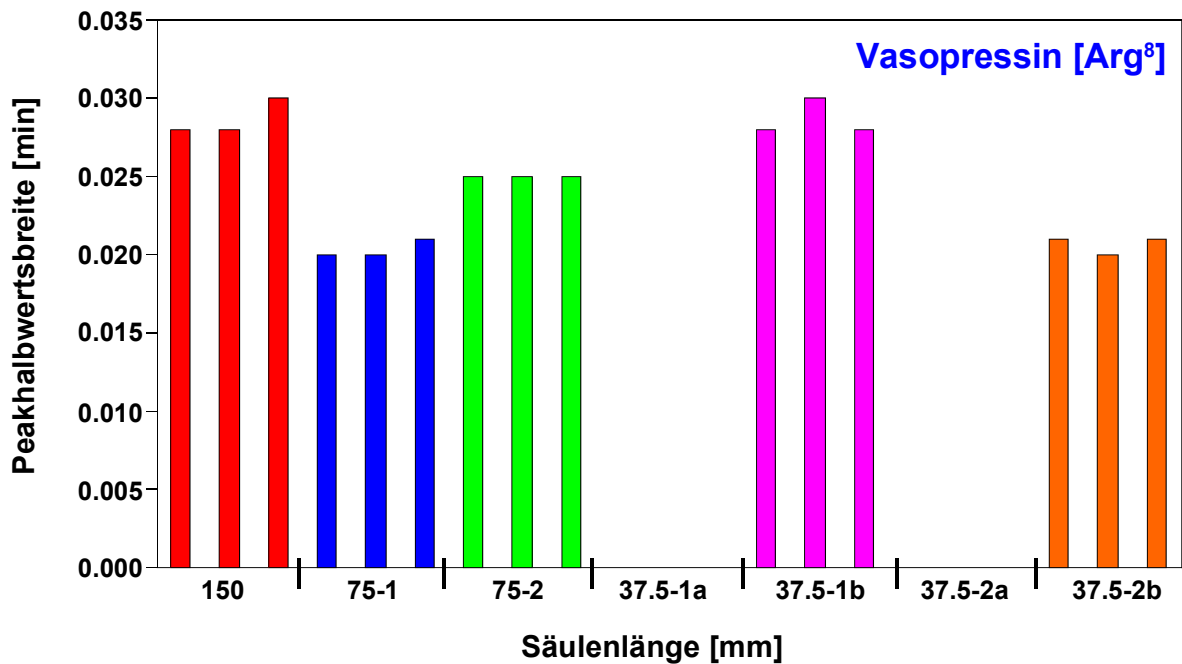
Wie bereits aus den Ergebnissen dieser beiden Analyten ersichtlich, konnte leider kein einheitlicher Trend für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge gefunden werden. Während das Bradikinin eine relativ gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment zeigt, zeigen die Ergebnisse für das Vasopressin ein völlig entgegengesetztes Verhalten. So konnten für das Bradikinin Peakhalbwertsbreiten zwischen 0.042-0.044 min für die 150 mm Säule ( $w_{h \text{ mittel}} = 0.043 \text{ min}$ ) und Peakhalbwertsbreiten zwischen 0.025-0.035 min ( $w_{h \text{ mittel}} = 0.030 \text{ min}$ ) für die 75 mm Säulen bestimmt werden. Somit verringern sich die Peakhalbwertsbreiten bei der Halbierung der Säulenlänge um Faktor 1.43, was in sehr guter Übereinstimmung mit dem erwarteten Wert von  $\sqrt{2}$  (1.41) steht (Abweichung von 1.4%). Für die 37.5 mm Monolithen konnten Peakhalbwertsbreiten zwischen 0.011-0.021 min bestimmt werden. Verkürzt man die Länge der Trennsäule von 75 mm auf 37.5 mm (Faktor 2), so reduzieren sich die Peakhalbwertsbreiten um Faktor 1.86 (erwartet 1.41). Somit wurde auch für die Halbierung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm eine akzeptable Übereinstimmung, wenn auch signifikant schlechtere Übereinstimmung zwischen Theorie und experimentellen Werten gefunden (Abweichung 31.9%). Diese deutlich schlechtere Übereinstimmung kann dadurch erklärt werden, dass die Trennleistung der kürzesten Säulen, im Vergleich zu den beiden längeren Monolithen (vgl. Kapitel 2.4.3-1), signifikant schlechter ist und es somit zu einer zusätzlichen Bandenverbreiterung während der Trennung kommt.

Reduziert man also die Länge der Trennsäulen um Faktor 4 (150 mm – 37.5 mm), so verringern sich dabei die Peakhalbwertsbreiten um einen Faktor 2.69 (erwartet  $\sqrt{4}$ ). Dies entspricht einer Abweichung von 34.5% zwischen Theorie und Experiment (**Gleichung 2.23**), was jedoch aufgrund der Komplexität des Experiments und der Proben in einem akzeptablen Bereich liegt.



**Abbildung 2.10.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für ein Peptid des P2693 Peptid-Standards (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Bradikinin Fragments [1-5] weicht jedoch das Vasopressin [Arg<sup>8</sup>] sehr deutlich vom erwarteten Verhalten ab. Die Ergebnisse für Vasopressin sind in **Abbildung 2.11** dargestellt. Wie bereits für Bradikinin beobachtet, kommt es auch bei Vasopressin zu keiner großen Streuung der Messwerte innerhalb der 3 Wiederholungsmessungen, jedoch kann hier, im Gegensatz zu Bradikinin, kein einheitlicher Trend erkannt werden.



**Abbildung 2.11.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für ein Peptid des P2693 Peptid-Standards (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

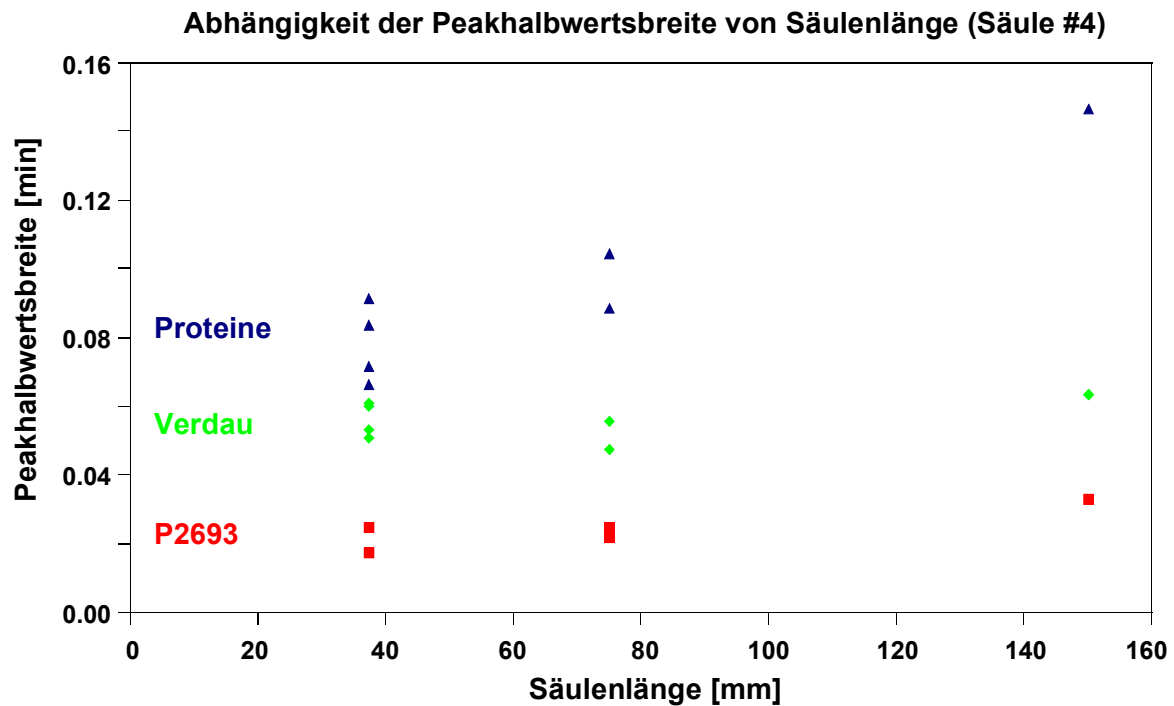
Anhand der experimentellen Daten wurden für Vasopressin für die 150 mm Trennsäule Peakhalbwertsbreiten zwischen 0.027-0.03 min bestimmt, während für die 75 mm Monolithen Peakhalbwertsbreiten zwischen 0.02-0.025 ermittelt wurden. Wie bereits bei Bradikinin beobachtet, unterscheiden sich auch hier die Werte für die Peakhalbwertsbreiten von Säule 75-1 ( $w_{h \text{ mittel}} = 0.02 \text{ min}$ ) und Säule 75-2 ( $w_{h \text{ mittel}} = 0.025 \text{ min}$ ) um ca. 25% (Bradikinin ca. 29%). Ein vergleichbares Verhalten kann auch für die beiden 37.5 mm Säulen beobachtet werden. Man beobachtete einen Unterschied in den Peakhalbwertsbreiten von ca. 22% für Bradikinin und 23 % für Vasopressin zwischen Säule 37.5-1b und 37.5-2b beobachtet. Somit kann für die Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm eine Verringerung der Peakhalbwertsbreite von Faktor 1.26 berechnet werden. Dies entspricht einer Abweichung vom erwarteten Wert (1.41) von ca. 10%. Während somit für das Verhältnis zwischen 150 mm- und 75 mm-Säulen eine akzeptable Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment gefunden wurde, weicht diese signifikant vom erwarteten Verhalten ab, wenn man die Säulenlänge erneut um Faktor 2 (75-37.5 mm) reduziert. Auch für die beiden 37.5 mm Monolithen wurden große Unterschiede zwischen den Peakhalbwertsbreiten festgestellt. Während für Säule 37.5-1b Werte

zwischen 0.027-0.03 min bestimmt wurden, ergeben sich für Säule 37.5-2b lediglich Werte zwischen 0.02-0.021 min (Abweichung ca. 25%). Vergleicht man die Peakhalbwertsbreiten der 37.5 mm Säulen mit denen der 75 mm bzw. 150 mm Säulen, so erhält man für die kürzesten Säulen vergleichbare Werte für die Peakhalbwertsbreiten. Im Gegensatz zum Bradikinin führt somit die Reduzierung der Säulenlänge für das Vasopressin nicht zu einer Verringerung der Peakhalbwertsbreiten, was im Widerspruch zur aufgestellten Theorie steht. Dieses Verhalten der 37.5 mm Säulen kann auch nicht mit einer deutlich verminderten Trennleistung erklärt werden, da für Bradikinin eine gute Übereinstimmung mit den theoretischen Vorhersagen erhalten wurde. Auch der Versuch, dieses Verhalten über die unterschiedlichen Größen der Moleküle zu erklären, scheitert, da zwar Bradikinin mit einer molaren Masse von 572.66 Da nur etwa halb so schwer ist wie Vasopressin ( $M=1004.23$  Da) und somit das schlechtere Ergebnis über die Größe der Moleküle erklärt werden könnte, jedoch zeigt Oxytocin, das mit 1007.19 Da eine vergleichbare Masse wie Vasopressin hat, eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment. Ein vergleichbares Verhalten wurde auch für die anderen im Standard enthaltenen Peptide gefunden.

Insgesamt konnte kein einheitlicher Trend für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreiten von den Säulenlängen für die Peptide des P2693 Peptid-Standards festgestellt werden, da die einzelnen Peptide ein stark unterschiedliches Verhalten zeigten. Daher wurde aus den Peakhalbwertsbreiten aller Peptide jeweils der Mittelwert gebildet und gegen die entsprechende Säulenlänge aufgetragen. Diese Ergebnisse sind in **Abbildung 2.12** für Säule #4 und in **Abbildung 2.55** (Anhang) für Säule #3 dargestellt.

Wie bereits in **Abbildung 2.10** und **Abbildung 2.11** gezeigt, kann auch hier eine relativ starke Streuung der Peakhalbwertsbreiten für die beiden 37.5 mm Monolithen festgestellt werden (0.025 min 37.5-1b und 0.017 min für 37.5-2b). Für die Peptide des Standards wurde eine mittlere Peakhalbwertsbreite aller Peptide von 0.033 min auf dem 150 mm Monolithen bestimmt. Reduziert man die Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm, so verringern sich die mittleren Peakhalbwertsbreiten der Peptide auf 0.023 min, was einem Faktor von ca. 1.43 entspricht. Dies entspricht einer sehr guten Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment (Abweichung ca. 0.7%).

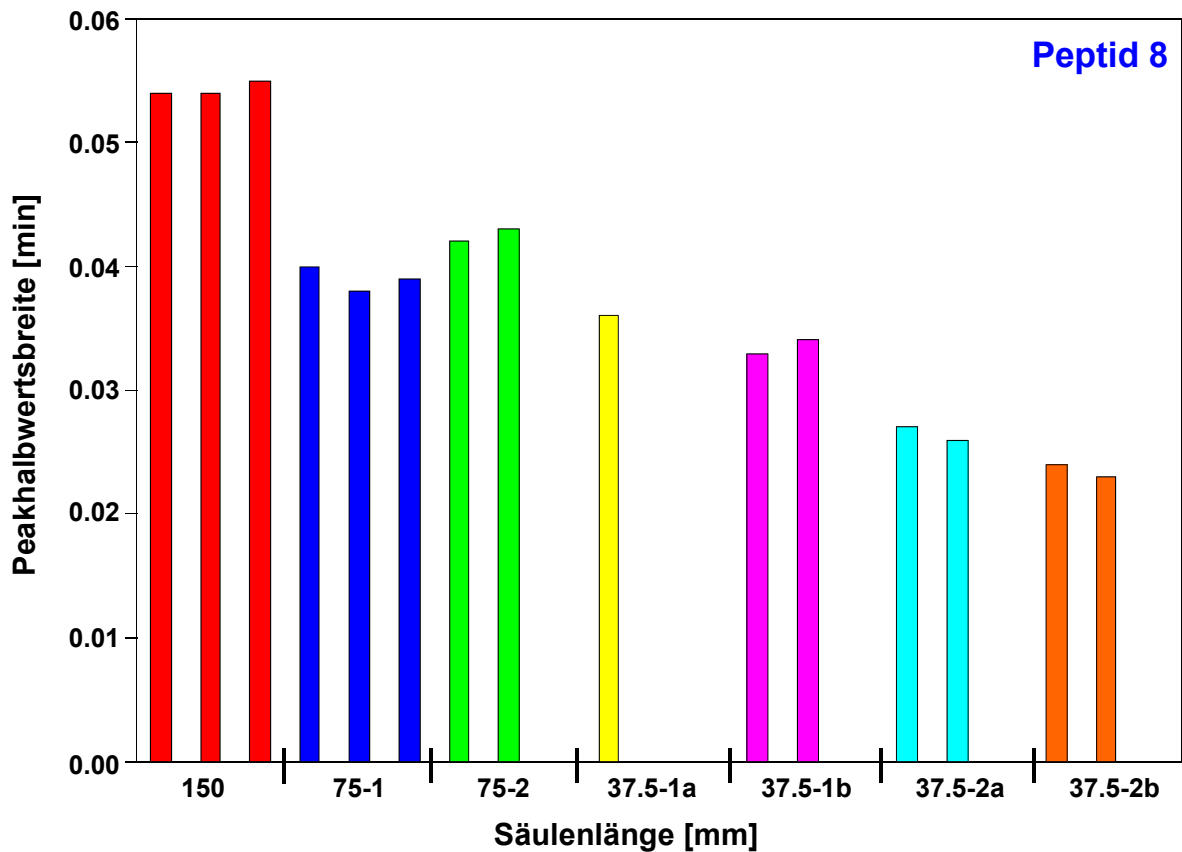
Somit bestätigen auch diese Werte den Trend, der bereits anhand der Einzelbetrachtungen des Bradikinin und des Vasopressin ergeben hatte.



**Abbildung 2.12.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für verschiedene Analyten (Säule 22-03-2005#4). Für jede Säulenlänge wurde der Mittelwert aus allen Peakhalbwertsbreiten ermittelt und gegen die Säulenlänge aufgetragen.

Im Gegensatz zur guten Übereinstimmung bei der Halbierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm, führt eine weitere Halbierung der Säulenlänge auf 37.5 mm zu einer schlechten Übereinstimmung mit den erwarteten Werten. Während sich für die 75 mm Säulen eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.023 min ergibt, konnte für die beiden 37.5 mm Säulen eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.021 min ermittelt werden. Somit führt die Halbierung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm zu keiner Veränderung der mittleren Peakhalbwertsbreiten, was in einem deutlichen Widerspruch zur Theorie steht.

Ein vergleichbares Verhalten kann auch für die mittleren Peakhalbwertsbreiten der Peptide des Cytochrom C Verdau beobachtet werden. Exemplarisch für die 17 untersuchten Peptide des Verdau ist in **Abbildung 2.13** das Verhalten für Peptid 8 dargestellt.



**Abbildung 2.13.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für ein Peptid des Cytochrom C Verdaus (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

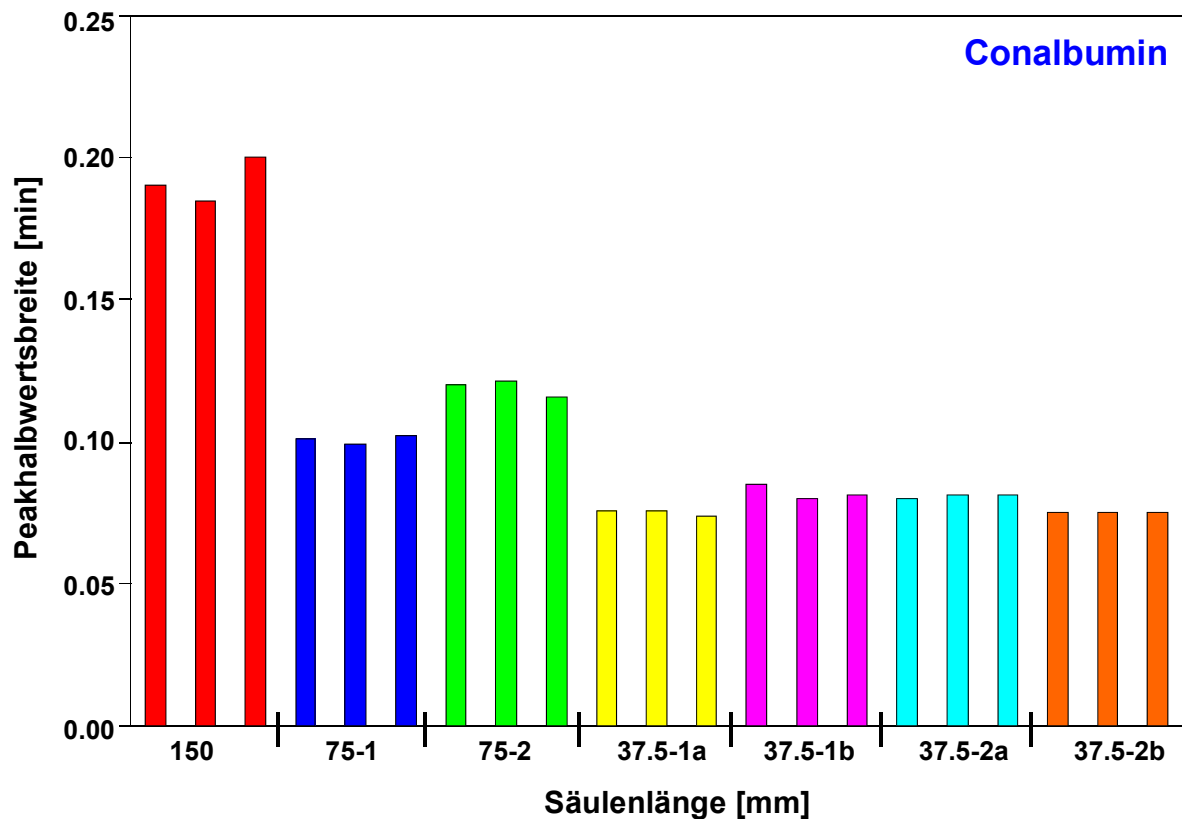
Während für Peptid 8 auf dem 150 mm Monolithen eine Peakhalbwertsbreite von 0.056 min bestimmt wurde, reduzierte sich diese bei der Halbierung der Säulenlänge auf 75 mm, auf 0.043 min (0.04-0.045 für Säule 75-1 und 75-2). Dies entspricht einer Reduzierung um Faktor 1.3 (8% Abweichung von Theorie). Damit wurde auch für Peptid 8 eine gute Übereinstimmung mit den erwarteten Werten von 1.41 erhalten. Im Gegensatz zu den beiden 75 mm Säulen ist die Streuung der Peakhalbwertsbreiten bei den vier 37.5 mm Säulen deutlich größer (0.024-0.038 min). Bildet man jedoch trotz dieser großen Streuung den Mittelwert über die jeweiligen Peakhalbwertsbreiten und vergleicht diesen mit den Werten für die 75 mm Monolithen ( $w_{h \text{ mittel}} = 0.031 \text{ min}$ ), so erhält man eine Reduzierung der Peakhalbwertsbreiten um den Faktor 1.38 bei der Halbierung der Säulenlänge von 75 auf 37.5 mm und erhält somit eine sehr gute Übereinstimmung mit den erwarteten Werten (2% Abweichung). Vergleicht man dagegen die Ergebnisse für Peptid 8 mit



den Mittelwerten aller Peptide (**Abbildung 2.12**), so erhält man keinen einheitlichen Trend für das Verhalten der Peakhalbwertsbreiten von der Säulenlänge mehr. Während man für die 150 mm Säule eine mittlere Peakhalbwertsbreite aller Peaks von 0.063 min bestimmen kann, sinkt dieser Wert bei Halbierung der Säulenlänge auf 0.052 min (Werte für Säule 75-1 und 75-2 zwischen 0.048 min und 0.055 min) ab. Dies entspricht einer Abweichung zwischen Theorie und Experiment von ca. 15% (Vergleich Peptid 8 nur 8%). Halbiert man die Säulenlänge weiter auf 37.5 mm, so werden mit 0.056 min (0.051-0.061 min für 37.5-1a-37.5-2b) vergleichbare Peakhalbwertsbreiten wie für die 75 mm Säulen erhalten. Damit wird auch für die Peptide des Verdaus kein einheitlicher Trend für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge erhalten. Während für die längeren Säulen (75 mm und 150 mm) noch eine akzeptable Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erhalten wurde, kann für die kürzeren Säulen keine eindeutige Aussage gemacht werden. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse der kleineren Peptide mit denen der deutlich größeren Proteine, so sieht man für die größeren Proteine eine deutlich bessere Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentellen Abhängigkeiten. Da die Ergebnisse aus Kapitel 2.4.3-1 bereits gezeigt hatten, dass die Trennleistung der Säulen signifikant mit der Säulenlänge abnimmt, scheint es so zu sein, dass schlechtere Säulen sich stärker auf die Trennung kleinerer Moleküle (Peptide) auswirken, während dies für größere Moleküle (Proteine) weniger ins Gewicht fällt. Die Ergebnisse für die Proteine sind im Teil b dieses Kapitels aufgeführt.

### b) Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreite von Proteinen

Wie bereits für die Peptide des Standards und des Verdaus wurde auch für alle Proteine der Protein-Mischung kein einheitlicher Trend für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge festgestellt. Wie für die Peptide gibt es auch für die Proteine Analyten, die gut (Conalbumin - **Abbildung 2.14**) oder schlecht (Cytochrom C - **Abbildung 2.15**) mit der postulierten Theorie übereinstimmen. Im Gegensatz zu den Peptiden ergibt sich jedoch für die Mittelwerte aller Proteine auf kürzeren Säulen eine bessere Übereinstimmung mit den theoretischen Erwartungen (vgl. **Abbildung 2.12**).

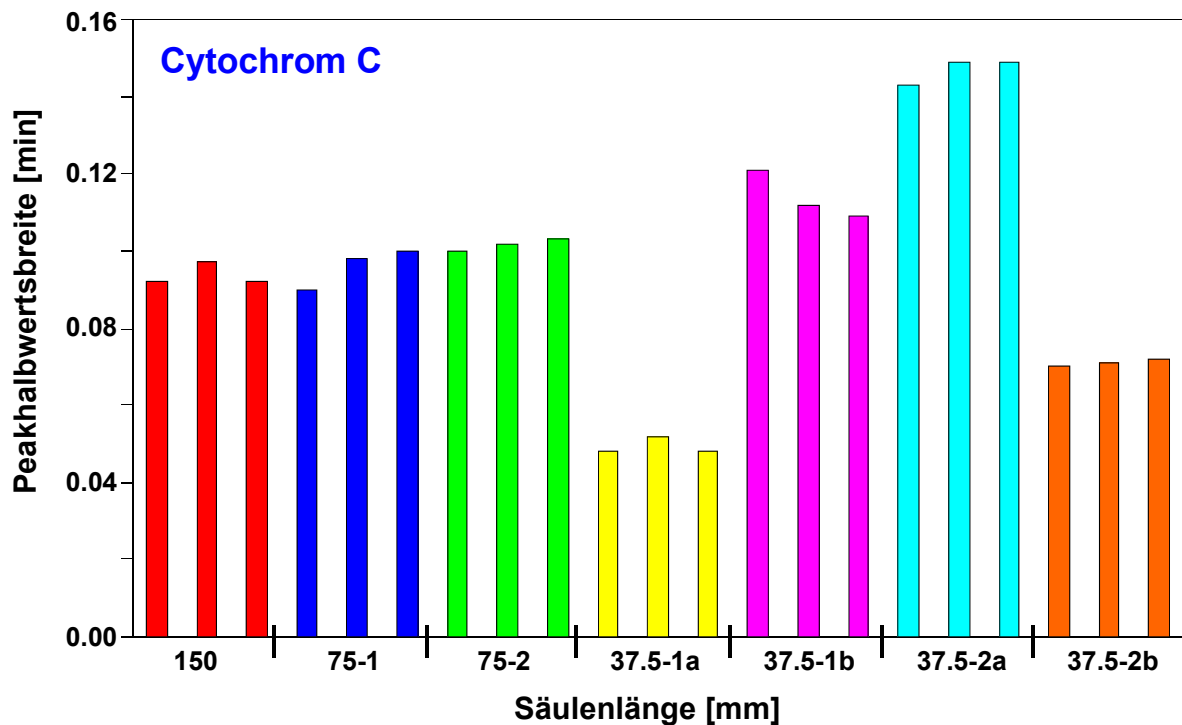


**Abbildung 2.14.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für das Protein Conalbumin der Protein-Mischung (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Für das Protein Conalbumin ( $M=77.000$  Da) ergibt sich bei einer Säulenlänge von 150 mm eine Peakhalbwertsbreite von 0.191 min. Für die beiden 75 mm Monolithen wurde eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.110 min (0.099-0.121 min) bestimmt, was einer Reduzierung der Peakhalbwertsbreite um einen Faktor von 1.74 entspricht. Zwar ist die Abweichung mit 22 Prozent für dieses Protein sehr hoch, jedoch stimmten, im Gegensatz zu den Peptiden, die Werte für die 37.5 mm Säulen besser mit den erwarteten Werten überein. Neben der deutlich geringeren Streuung der Messwerte für die einzelnen Säulen, wurde für die 37.5 mm Monolithen eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.08 min für Conalbumin bestimmt. Somit reduzieren sich die Peakhalbwertsbreiten bei der Verkürzung von 75 auf 37.5 mm um einen Faktor von 1.38%, was einem Fehler zwischen Theorie und Experiment von ca. 3% entspricht.

Vergleicht man diese sehr gute Übereinstimmung des Proteins Conalbumin jedoch mit den Ergebnissen für das Protein Cytochrom C ( $M=12327$  Da), so sieht man, dass

für Cytochrom C erheblich schlechtere Werte erhalten wurden. So wurden für das deutlich kleinere Protein annähernd die gleichen Peakhalbwertsbreiten auf den 150 mm und den beiden 75 mm Säulen erhalten. Im Gegensatz dazu wurden für die 37.5 mm Säulen, deren Werte für die einzelnen Säulen eine extrem starke Streuung zeigten (0.05-0.15 min), vergleichbar hohe Werte für die Peakhalbwertsbreiten erhalten.



**Abbildung 2.15.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für das Protein Cytochrom C der Protein-Mischung (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Betrachtet man jedoch die Mittelwerte der Peakhalbwertsbreiten aller Proteine, so erhält man im Gegensatz zu den Peptiden sehr gute Übereinstimmungen zwischen theoretischen und experimentellen Werten. Während für die Proteine auf der 150 mm Säule eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.147 min bestimmt wurde, reduziert sich dieser Wert auf 0.096 min bei der Halbierung der Säulenlänge auf 75 mm (Werte für 75-1 und 75-2 zwischen 0.088 min und 0.104 min). Somit konnte für diese Reduzierung ein Faktor von 1.52 bestimmt werden, was einer Abweichung vom erwarteten Wert von 7.5% entspricht. Während auf den kürzeren Monolithen für die Peptide sehr schlechte Übereinstimmungen zwischen theoretischen und

experimentellen Werten erhalten wurden, konnte bei Halbierung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm für die Proteine ein Faktor von 1.23 ( $\equiv$  Abweichung von 13%) bestimmt werden ( $w_{h\text{ mittel}}$  für 37.5 mm Säulen von 0.079 min).

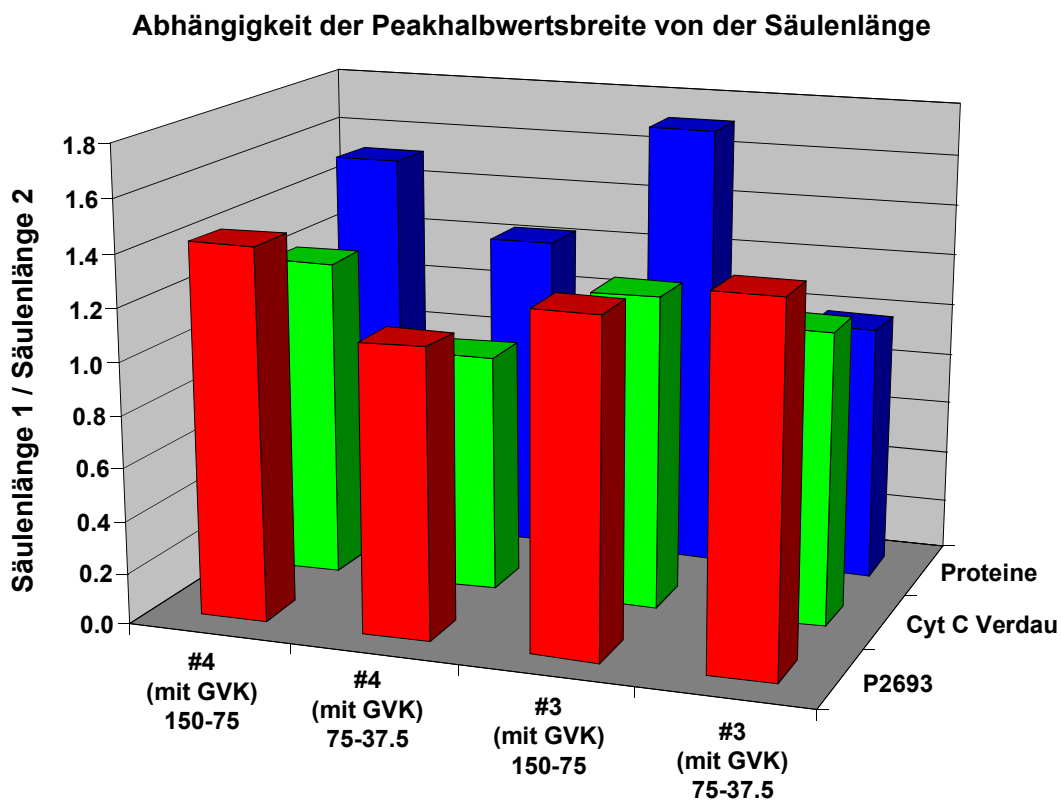
Ein Gesamtüberblick über die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreiten von der Säulenlänge L ist in **Tabelle 2.4** gegeben. Für die Berechnung der prozentualen Abweichung der experimentellen Werte von den theoretisch erwarteten Werten wurde für die Halbierung der Säulenlängen von 150 mm auf 75 mm und von 75 mm auf 37.5 mm ein ideales Verhältnis von  $\sqrt{2}$  (1.4142) angenommen. Neben den Werten für Säule #4 wurden in **Tabelle 2.4** auch die Werte für Säule #3 berücksichtigt. Zusätzlich zu den tabellarischen Werten wurden in **Abbildung 2.16** die Werte für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge auch noch einmal grafisch für die einzelnen Analyten (P2693, Cytochrom C Verdau, Proteine) dargestellt.

**Tabelle 2.4.** Überblick über die berechneten Verhältnisse bei Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm und 75 mm und 37.5 mm. Für die Berechnung der prozentualen Abweichungen wurde ein ideales Verhältnis von  $\sqrt{2}$  (Halbierung Säulenlänge) angenommen.

Abhängigkeit $w_h$ von Säulenlänge L						
Säule	Verhältnis $w_h$ von Säule 1/ Säule 2			Abweichung Theorie / Experiment [%]		
	P2693	Proteine	Verdau	P2693	Proteine	Verdau
<b>22-03-2005 # 4</b>						
150 / 75mittel	1.4	1.5	1.2	0.7	7.5	13.1
75mittel / 37.5mittel	1.1	1.2	0.9	21.9	12.9	35.3
<b>22-03-2005 # 3</b>						
150 / 75mittel	1.3	1.7	1.2	9.7	21.1	15.1
75mittel / 37.5mittel	1.4	1.0	1.1	1.7	30.5	20.7

Wie aus **Tabelle 2.4** und **Abbildung 2.16** ersichtlich, konnte auch für Säule #3 kein einheitlicher Trend für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge erhalten werden. Wie bereits für Säule #4 ergibt sich auch für Säule #3 die beste Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment für die Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm. Hier bildet lediglich die Protein-Mischung mit einer Abweichung von ca. 21% eine Ausnahme und steht damit im Widerspruch zu den für Säule #4 erhaltenen Ergebnissen. Mit einer Abweichung von 9.7% wurde

die beste Übereinstimmung für die Peptide des Standards erhalten, gefolgt von den Peptiden des Verdaus mit einer Abweichung von 15%. Weitgehend bestätigt wurde auch der bereits mit Säule #4 erhaltene Trend, dass sich die schlechtesten Übereinstimmungen für die Reduzierung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm ergaben.



**Abbildung 2.16.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von Säulenlänge (Tabelle 2.4).

Eine Ausnahme bilden hier nur die Peptide des P2693 Standards, die mit einer Abweichung von 1.7% sehr gut mit den erwarteten Werten übereinstimmen.

Insgesamt kann für die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreiten von der Säulenlänge festgehalten werden, dass für die längeren Säulen (150 und 75 mm) eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment besteht. Dies gilt sowohl für die kleineren Peptide als auch für die größeren Proteine. Im Gegensatz dazu wurde jedoch für die kürzeren 37.5 mm Monolithen nur für die Proteine (Säule #4) bzw. die Peptide des Standards (Säule #3) eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen theoretischen und experimentellen Werten gefunden. Dies kann vielleicht mit der deutlich verminderten Trennleistung der kürzeren Monolithen erklärt werden.

### 3. Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazität

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazität bestimmt. Wie bereits erläutert, berechnet sich die Peakkapazität nach folgender Gleichung, in die die Gradientdauer  $t_g$  und die Peakbasisbreite  $w_b$  eingehen:

$$P_K = 1 + \frac{t_{\text{Gradientdauer}}}{w_{4\sigma}}$$

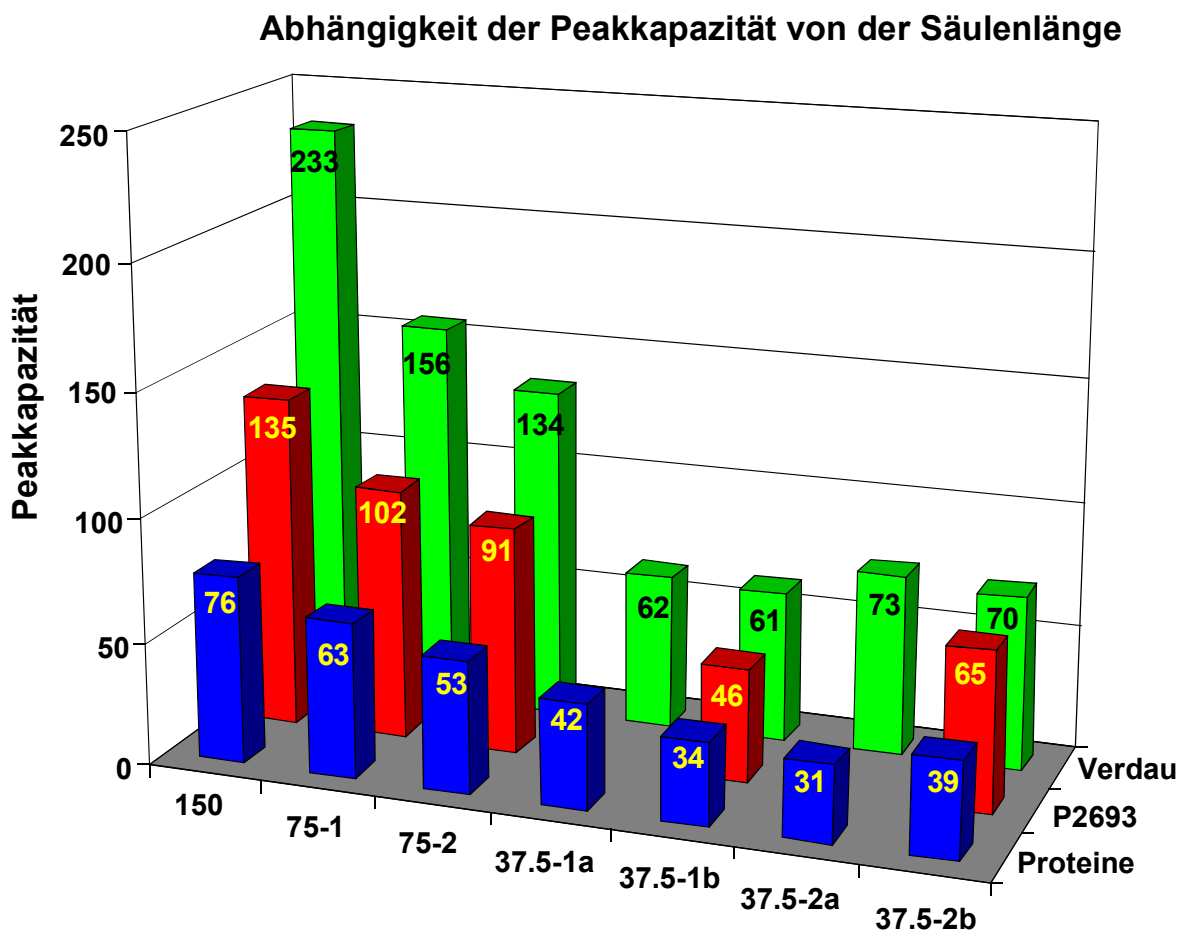
**Gleichung 2.24.** Gleichung zur Berechnung der Peakkapazität  $P_K$  aus der Gradientdauer  $t_g$  und der Peakbasisbreite  $w_b$  ( $4\sigma$ ).

Daraus ergibt sich, dass eine Steigerung von  $P_K$  durch Erhöhung der Gradientdauer oder Senkung der Peakbasisbreite erreicht werden kann. Da eine Erhöhung der Gradientdauer unweigerlich zu einem Anstieg der Peakbasisbreite führt, kann eine Verbesserung der Peakkapazität nur dann erreicht werden, wenn die dazugehörigen Peakbasisbreiten nicht proportional zur Gradientdauer ansteigen. Würde eine Verdopplung der Gradientdauer auch zu einer Verdopplung der Peakbasisbreiten der Analyten führen, so könnte durch eine Steigerung von  $t_g$  keine Verbesserung erreicht werden, da der Vorteil durch die längeren Gradienten wieder durch die höheren Peakbreiten aufgehoben werden würde. Die Verbesserung der Peakkapazität durch Erhöhung der Gradientdauer wird im späteren Teil dieser Arbeit näher behandelt und untersucht.

Ein weiterer Weg zur Steigerung der Peakkapazitäten ist die Verwendung längerer Trennsäulen. Auch dabei ist, wie bereits bei der Erhöhung der Gradientdauer, wichtig, dass die Erhöhung der Säulenlänge nicht mit einem proportionalen Anstieg der dazugehörigen Peakbasisbreiten verbunden ist. Wie jedoch die Ergebnisse in Kapitel 2.4.3-2 gezeigt haben, steigen die Peakbasisbreiten nicht proportional zur Säulenlänge an. Eine Erhöhung der Säulenlänge um einen Faktor  $m$  führt lediglich zu einem Anstieg in den Peakbreiten um einen Faktor  $\sqrt{m}$ . Somit kann z.B. durch eine Verdopplung der Säulenlänge ( $m=2$ ) theoretisch eine Verbesserung der Peakkapazitäten um 30% erreicht werden.

Der Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazitäten wird in diesem Kapitel anhand eines Peptid-Standards (P2693), einer Protein-Mischung und eines Cytochrom C Verdaus untersucht.

Ein Überblick über die gemäß **Gleichung 2.24** berechneten Peakkapazitäten ist in **Tabelle 2.3** für den Cytochrom C Verdaus, in **Tabelle 2.17** (Anhang) für den Peptid-Standard und in **Tabelle 2.18** (Anhang) für die Protein-Mischung gegeben. Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Peakkapazitäten von der Säulenlänge für Säule 22-03-2005 #4 in **Abbildung 2.17** grafisch zusammengefasst.



**Abbildung 2.17.** Ergebnisse für den Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazitäten für verschiedene Analyten unter Verwendung eines 150 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen und des Gradient-Volumen-Konzeptes (22-03-2005#4).

Wie aus **Abbildung 2.17** ersichtlich, wurden für alle untersuchten Analyten die höchsten Peakkapazitäten mit den längsten Trennsäulen (150 mm) erhalten. Weiterhin konnte anhand der erhaltenen Ergebnisse festgestellt werden, dass,

unabhängig von den verwendeten Analyten, eine Reduzierung der Säulenlänge zu einer signifikanten Abnahme der Peakkapazitäten führt. **Abbildung 2.17** zeigt weiterhin, dass die höchsten Peakkapazitäten für den Cytochrom C Verdau (233) erreicht wurden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass zur Trennung des komplexen Verdaus, im Vergleich zur Trennung des Peptid-Standards, ein deutlich flacherer Gradient (0-80% ACN / 25 min) verwendet wurde (P2693: 0-50.4% ACN in 7.5 min). Da sich also die Gradientdauer für die Trennung des Verdaus, im Vergleich zum Peptid-Standard, um einen Faktor 3.3 erhöht, jedoch gleichzeitig die Peakbasisbreiten des Verdaus (Verdau:  $w_{b \text{ mittel}} = 0.108 \text{ min}$ ) nur um einen Faktor 1.9 ansteigen (Peptid-Standards:  $w_{b \text{ mittel}} = 0.056 \text{ min}$ ), errechnet sich somit für den Verdau im Vergleich zum Peptid-Standard eine deutlich höhere Peakkapazität. Die niedrigsten Werte für  $P_K$  werden für die Proteine erhalten, da diese, im Vergleich zu den kleineren Peptiden, deutlich höhere Peakbasisbreiten aufweisen. Somit errechnen sich für den Peptid-Standard Peakkapazitäten, die um ca. 42% niedriger sind als die des Cytochrom C Verdaus (Faktor 1.7). Vergleicht man die Werte der Protein-Mischung mit denen des Verdaus, so werden um 68% niedrigere Peakkapazitäten erhalten.

Untersucht man den Einfluss der Säulenlänge auf die jeweiligen Peakkapazitäten, so sieht man, dass eine Halbierung der Säulenlänge (150 mm auf 75 mm) zu einer signifikanten Verringerung der Peakkapazitäten führt. Während auf dem 150 mm Monolithen für den Verdau noch Peakkapazitäten von 233 erhalten wurden, sinkt dieser Wert für die 75 mm Säule auf 145 ab (Berechnung der Peakkapazitäten für 75 mm Säulen aus Werten für Säule 75-1 und 75-2-Mittelwert). Dies entspricht einer Abnahme von  $P_K$  um 38% oder einem Faktor von 1.6. Auch für die Peptide des Standards reduzieren sich die Peakkapazitäten von 135 auf 97 (Mittelwert), was einer Abnahme um 29% entspricht (Faktor 1.4). Im Vergleich dazu sinken die Peakkapazitäten der Proteine um 24% (Faktor 1.3) von 76 auf 58. Damit ergibt sich für alle Analyten ein vergleichbarer Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazitäten, da eine Reduzierung der Säulenlänge um Faktor 2 zu einem Absinken der Peakkapazitäten um Faktor 1.4 führt.



Verringert man die Säulenlänge weiter von 75 mm auf 37.5 mm, so sinken die Peakkapazitäten für den Verdau von 145 auf 67 (Faktor 2.2), für die Peptide des Standards von 97 auf 56 (Faktor 1.7) und für die Proteine von 58 auf 37 (Faktor 1.6). Mit Ausnahme der zu hohen Abnahme für die Peptide des Verdau werden auch hier vergleichbare Werte für alle Analyten erhalten. Im Vergleich zur Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm ist die Abweichung vom theoretischen Verhalten für die Reduzierung auf 37.5 mm jedoch mit ca. 30% (Mittelwert der Faktoren für alle Analyten) deutlich höher als dies für die längeren Säulen der Fall war. Diese schlechtere Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment wurde jedoch auch bereits für den Einfluss der Säulenlänge auf die Peakbasisbreiten/Peakhalbwertsbreiten beobachtet. Weiterhin konnte für alle Analyten beobachtet werden, dass relativ vergleichbare Werte für die Peakkapazitäten auf den verschiedenen Säulen gleicher Länge erhalten wurden. So wurden z.B. für die vier 37.5 mm Säulen Werte für  $P_K$  (Verdau) mit 62 für Säule 37.5-1a, 61 für 37.5-1b, 73 für 37.5-2a und 70 für Säule 37.5-2b erhalten.

Auch für Säule #3 (22-03-2005) wurden ähnliche Tendenzen für die Abhängigkeit der Peakkapazitäten von den Säulenlängen festgestellt. Auch bei dieser Säule wurden die höchsten Peakkapazitäten für den Verdau erhalten. Reduziert man die Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm, so sinken die Peakkapazitäten für den Verdau von 208 auf 126 (Faktor 1.7), für die Peptide des Standards von 118 auf 77 (Faktor 1.5) und für die Proteine von 61 auf 53 (Faktor 1.2) ab. Somit führt eine Reduzierung der Säulenlänge um Faktor 2 zu einem Absinken der Peakkapazitäten um Faktor 1.5 (Mittelwert), was einer sehr guten Abweichung vom erwarteten Wert (1.4142) von ca. 4% entspricht. Vergleichbare Werte werden auch für die Halbierung der Säulenlänge von 75 auf 37.5 mm erhalten (Verdau: 126-72, Faktor 1.8; P2693: 77-54, Faktor 1.4; Proteine: 53-26, Faktor 2.0). Somit ergibt sich hier eine Abnahme um Faktor 1.7 (Mittelwert), was einer Abweichung zwischen Theorie und Experiment von ca. 23% entspricht.

Ein Überblick über die jeweiligen Faktoren ist für beide Säulen in nachfolgender **Tabelle 2.5** gegeben.

**Tabelle 2.5.** Überblick über die berechneten Verhältnisse bei Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm und 75 mm und 37.5 mm. Für die Berechnung der prozentualen Abweichungen wurde ein ideales Verhältnis von  $\sqrt{2}$  (Halbierung Säulenlänge) angenommen (mit GVK).

<b>Abhängigkeit <math>P_K</math> von Säulenlänge L</b>						
Säule	Verhältnis $P_K$ von Säule 1 / Säule 2			Abweichung Theorie / Experiment [%]		
	P2693	Proteine	Verdau	P2693	Proteine	Verdau
<b>22-03-2005 # 4</b>						
150 / 75mittel	1.4	1.3	1.6	1.3	7.8	14.1
75mittel / 37.5mittel	1.8	1.6	2.2	23.4	12.5	53.4
<b>22-03-2005 # 3</b>						
150 / 75mittel	1.6	1.3	1.7	9.4	17.7	17.1
75mittel / 37.5mittel	1.4	2.0	1.8	1.1	39.7	24.1

Insgesamt kann aus den erhaltenen Ergebnissen geschlossen werden, dass durch Erhöhung der Säulenlänge eine signifikante Steigerung der Peakkapazitäten erreicht werden kann. Da für die Lösung komplexer Trennprobleme hohe Peakkapazitäten entscheidend sind, kann durch den Einsatz längerer Trennsäulen eine erhebliche Verbesserung der Trenneffizienz erwartet werden. Weiterhin haben die Ergebnisse dieses Kapitels gezeigt, dass durch die Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes ein problemloser Transfer einer bestehenden und optimierten Trennung von Säulenlänge A auf Säulenlänge B möglich war. Um den Einfluss des GVK näher bestimmen zu können, wurden alle Messungen mit Berücksichtigung des GVK auch ohne Anwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sind im folgenden Kapitel zusammengefasst.

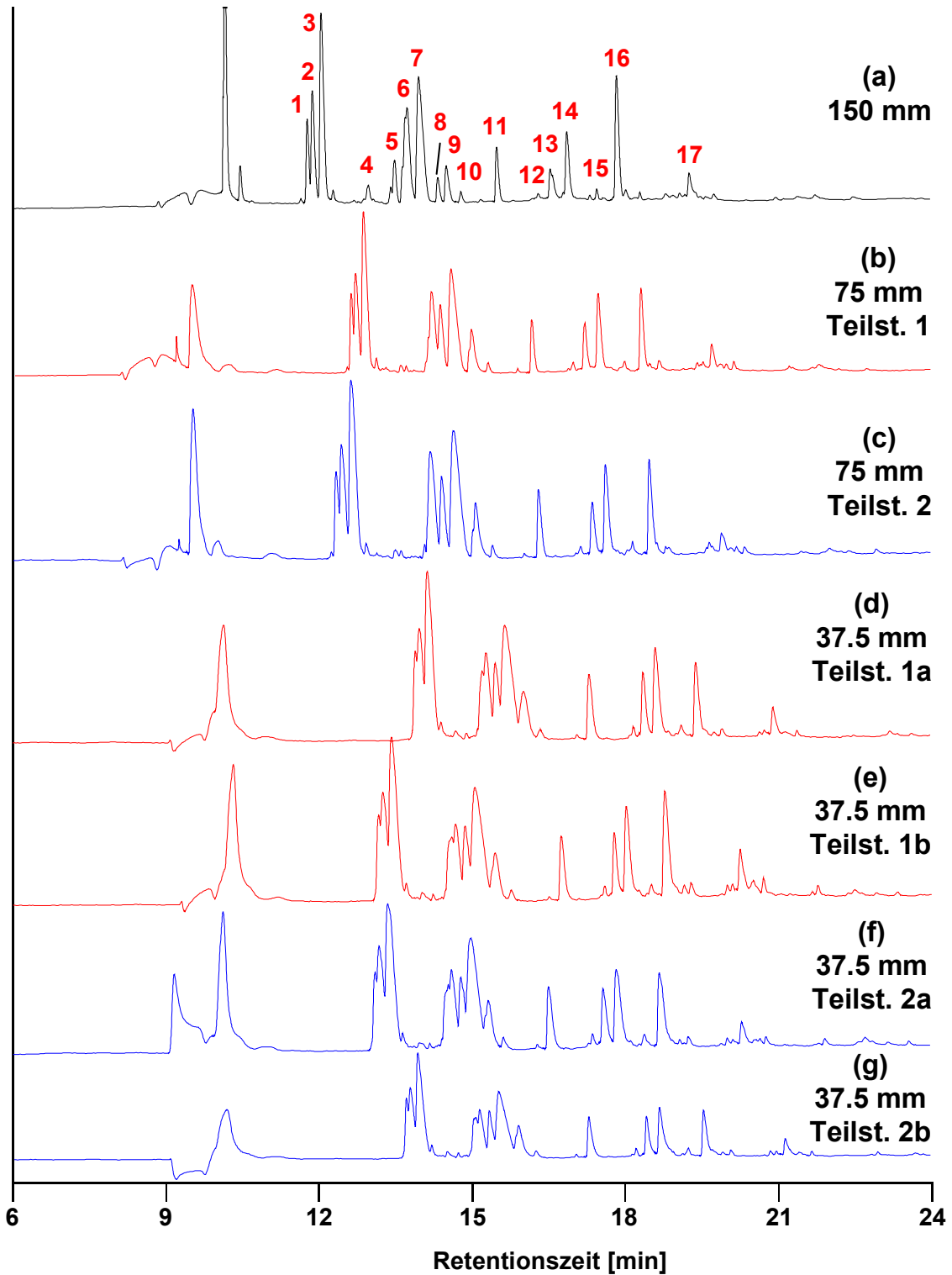
#### **2.4.4. Einfluss der Säulenlänge auf die chromatographischen Parameter ohne Gradient-Volumen-Konzeptes**

Wie bereits in Kapitel 2.4.3, wird auch in diesem der Einfluss der Säulenlänge L auf die chromatographischen Parameter der Auflösung, relativen Retentionszeit, Peakbasisbreite/Peakhalbwertsbreite und Peakkapazität untersucht. Im Gegensatz zur Studie in 2.4.3, die unter Berücksichtigung des Gradient-Volumen-Konzeptes durchgeführt wurde, wurde in diese Studie auf die Anpassung des Gradienten auf die

Säulenlänge via GVK verzichtet, d.h. unabhängig von der Säulenlänge wurde jeweils der gleiche Gradient verwendet. Dadurch sollte untersucht werden, ob man bei gleicher Analysendauer mit gleicher Säulenlänge höhere Peakkapazitäten erreichen kann. Für alle untersuchten Säulenlängen (150 mm, 75 mm und 37.5 mm) wurde der analytenspezifische Gradient für die 150 mm Säule verwendet (vgl. **Tabelle 2.2**). Wie bereits für die Untersuchungen mit GVK, wurden auch hier jeweils zwei verschiedene 150 mm Monolithen (22-03-2005 #3 und #4) und ihre jeweiligen kürzeren Teilstücke für die Studie verwendet. Auch alle weiteren experimentellen Parameter (Fluss, Temperatur, Injektion in den Gradienten) wurden für diese Messreihe konstant gehalten.

### 1. Einfluss der Säulenlänge auf die relative Retentionszeit und die Auflösung

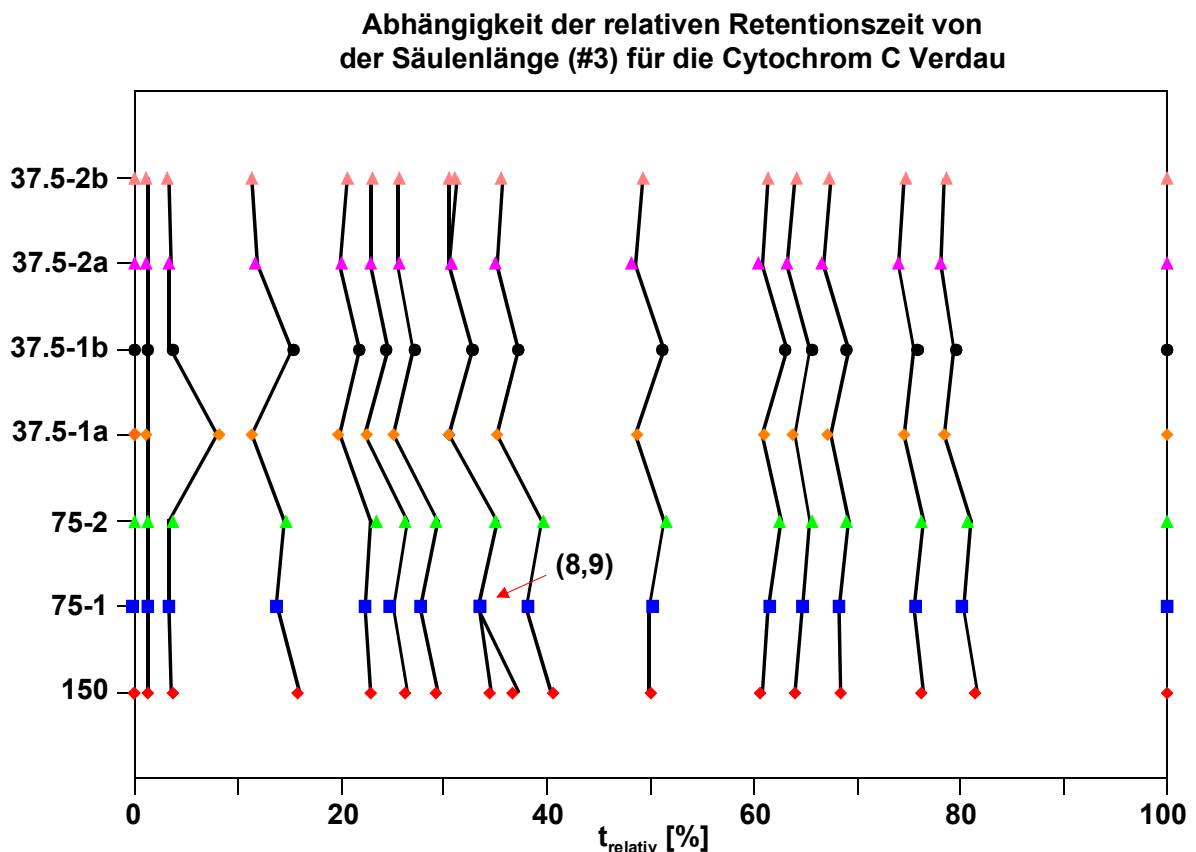
Analog zu Studie in Kapitel 2.4.3, wurde auch hier der Einfluss der Säulenlänge auf die relative Retentionszeit und die Auflösung anhand verschiedener Analyten (P2693 Peptid-Standards, Protein-Mischung und Cytochrom C Verdau) untersucht. In **Abbildung 2.18** ist die Trennung eines Cytochrom C Verdaus mittels verschiedener Säulenlängen ohne GVK abgebildet (analog Kapitel 2.4.3 auch hier Säule 22-03-2005 #3). Die Trennungen des Peptid-Standards und der Protein-Mischung sind im Anhang dieses Kapitels aufgeführt (P2693: **Abbildung 2.50**, Protein-Mischung: **Abbildung 2.51** – Säule 22-03-2005 #3).



**Abbildung 2.18.** Trennung eines Cytochrom C Verdau auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005#3) ohne Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes.

Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: 0-80% ACN in 25 min; Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 55°C; 214 nm; Probe: 81 ng Cytochrom C.

Wie bereits im ersten Teil dieser Studie wurden auch hier zur besseren Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge auf die Trenneffizienz der Säule die relativen Retentionszeiten für die jeweiligen Analyten ermittelt. **Abbildung 2.19** zeigt die relativen Retentionszeiten, die für die Peptide des Cytochrom C Verdau auf verschiedenen Säulenlängen bestimmt wurden.



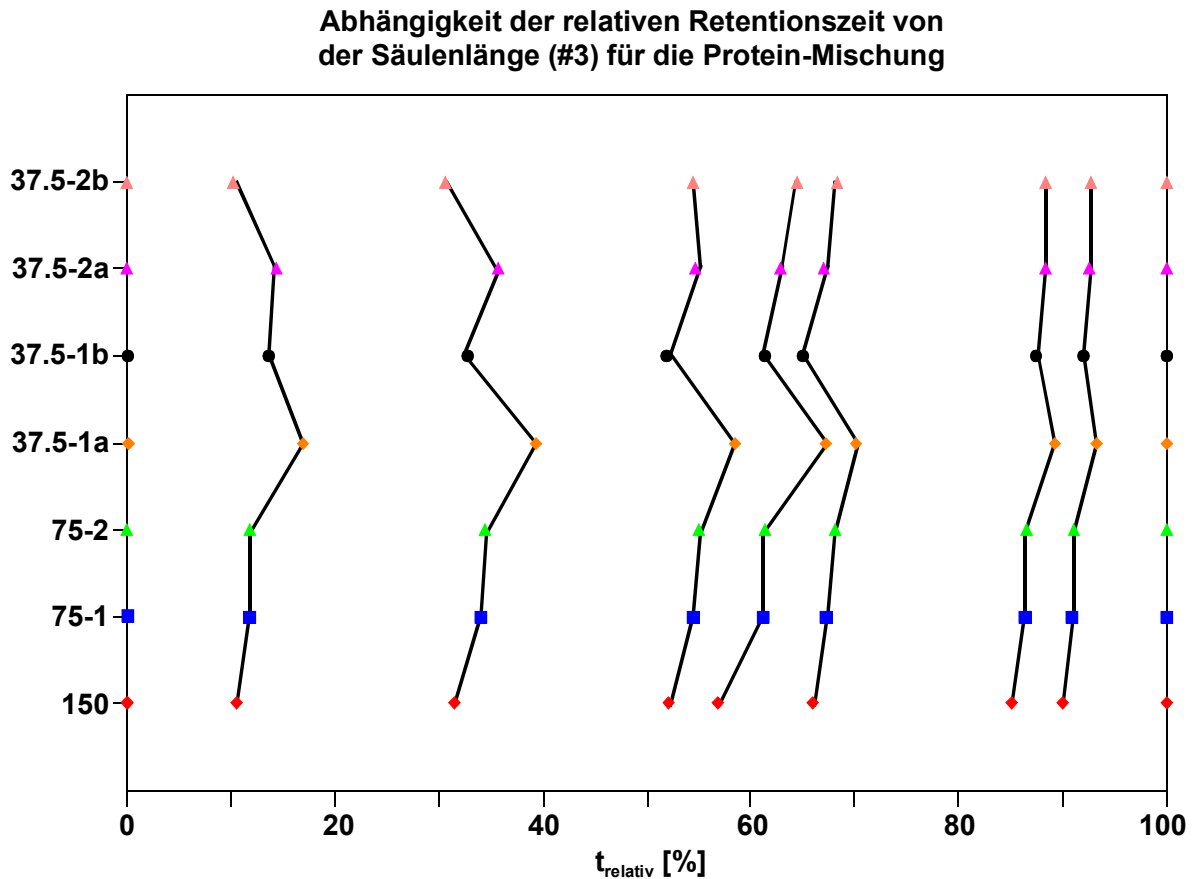
**Abbildung 2.19.** Normalisierte Retentionszeiten für die Trennung eines Cytochrom C Verdau auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005 #3) ohne Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes.

Wie aus **Abbildung 2.18** und **Abbildung 2.19** ersichtlich, konnte auf allen getesteten Säulenlänge der komplexe Verdau sehr gut getrennt werden. Für alle untersuchten Säulen wurden für die jeweiligen Peptide, mit Ausnahme der Peptide 1 und 2 auf Säule 37.5-1a, nur sehr kleine Verschiebungen in den relativen Retentionszeiten bestimmt (vgl. **Abbildung 2.19**). Die besten Resultate für die Trennung des Verdau wurde auf der längsten Säule erhalten (**Abbildung 2.18** (a)). Mit dem 150 mm Monolithen konnten nahezu alle im Verdau enthaltenen Peptide basisliniengetrennt chromatographiert werden. Lediglich für Peptid 1 und 2 konnte keine vollständige

Grundlinientrennung erhalten werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der beiden 75 mm Teilstücke (**Abbildung 2.18** (b), (c)), so sieht man, dass auch diese um 50% verkürzten Trennsäulen über eine sehr hohe Trenneffizienz verfügen. So wurde für die Auflösung der Peptide 1 und 2 eine leichte und für die Peptide 8 und 9 eine signifikante Verschlechterung (Koelution) in der Auflösung auf den kürzeren Säulen festgestellt. Im Gegensatz zum 150 mm Monolithen konnten die Peptide 8 und 9 auf den 75 mm Säulen nicht voneinander getrennt werden. Somit kam es zur Koelution dieser beiden Analyten. Diese Koelution wird auch anhand der relativen Retentionszeiten (**Abbildung 2.19**) ersichtlich. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus Kapitel 2.4.3, so sieht man, dass mit Anwendung des GVK die Koelution dieser beiden Peptide auf den 75 mm Säulen vermieden werden konnte. Somit stellt die Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes für die längeren Säulen (75 mm) einen leichten Vorteil dar. Diese Koelution der Peptide 8 und 9 konnte auch auf den vier kürzeren 37.5 mm Säulen (**Abbildung 2.18** (d) – (g)) nicht aufgehoben werden. Zusätzlich zur Koelution dieser beiden Analyten wurde auch die Auflösung der Peptide 1 und 2, im Vergleich zu den längeren Trennsäulen (150 mm und 75 mm), signifikant schlechter. Vergleicht man die Ergebnisse für diese Peptide jedoch mit denen aus Kapitel 2.4.3, so sieht man, dass hier der Verzicht auf das GVK zu geringfügig besseren Trennergebnissen geführt hat. Im Gegensatz zur Trennung mit GVK kommt es hier noch nicht zu einer vollständigen Koelution dieser beiden Analyten. Für die 37.5 mm Monolithen scheint es also so zu sein, dass hier der Vorteil des flacheren Gradienten (Gradientsteigung von 3.2% ACN/min ohne GVK, 12.8% ACN/min mit GVK) gegenüber der Anpassung des Peakvolumens auf die Säulenlänge (mit GVK) positiv dominiert. Dieser geringfügige Vorteil an Auflösung, der sich auch nur bei den relativ früh eluierenden Peaks zeigt, ist jedoch mit einer deutlichen Erhöhung der Analysenzeit verbunden. Während mit Anwendung des GVKs der Verdau auf den 37.5 mm Monolithen in ca. 13 min chromatographiert werden kann, erhöht sich ohne GVK diese Analysenzeit auf ca. 20 min, was einer Erhöhung von ca. 50% entspricht.

Wie bereits mit GVK festgestellt, zeigt sich auch in dieser Studie der Trend, dass eine Erhöhung der Säulenlänge zu einer signifikanten Verbesserung der Trenneffizienz der Säule führt. Dies konnte auch durch die Ergebnisse für den Peptid-Standard und die Protein-Mischung bestätigt werden.

In **Abbildung 2.20** sind die Auswertungen der relativen Retentionszeiten für die Trennung der Protein-Mischung dargestellt. Das dazugehörige Chromatogramm ist in **Abbildung 2.51** im Anhang dieses Kapitels abgebildet.



**Abbildung 2.20.** Normalisierte Retentionszeiten für die Trennung einer Protein-Mischung auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005 #3) ohne Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes.

Wie aus den Chromatogrammen bzw. aus **Abbildung 2.20** ersichtlich, konnten die Proteine der 9er Protein-Mischung auf allen getesteten Säulenlängen getrennt werden. Es kommt auf keiner der untersuchten Säulen zu einer Koelution einzelner Proteine. Damit sind die Ergebnisse ohne GVK mit denen mit GVK vergleichbar, da es auch dort zu keiner Koelution zwischen einzelnen Analyten gekommen war. Weiterhin ist aus **Abbildung 2.20** ersichtlich, dass es mit Ausnahme von Säule 37.5-1a (Proteine 2-6) zu keiner merklichen Verschiebung der relativen Retentionszeiten auf den verschiedenen Säulenlängen gekommen ist. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit GVK wurde ohne GVK eine etwas verminderte Verschiebung der

relativen Retentionszeiten beobachtet. Dies kann vor allem an den beiden 75 mm Säulen für die Proteine 4, 5 und 6 und auf der 37.5-1a Säule für die Proteine 7 und 8 beobachtet werden. Da sich die Retentionszeiten der einzelnen Proteine im Vergleich zu denen der Peptide jedoch so stark unterscheiden, führt dieser „Drift“ in den relativen Retentionszeiten nicht zu einer Koelution einzelner Analyten. Wie bereits beim Verdau beobachtet, führt auch für die Proteine der Verzicht der Anpassung der Gradientdauer auf die Säulenlänge zu einem massiven Anstieg in der Analysenzeit. Während mit GVK die Protein-Mischung auf den 37.5 mm Monolithen in ca. 16 min getrennt werden konnte, benötigt man ohne GVK ca. 25 min für die gleiche Trennung. Dies entspricht einem Anstieg in der Analysenzeit von ca. 9 min (56%). Da sowohl mit als auch ohne Gradient-Volumen-Konzept vergleichbare Ergebnisse in Auflösung und Trenneffizienz erhalten wurden, sollte für die Trennung der Proteine das GVK angewandt werden, da dies mit einer erheblichen Verkürzung der Analysenzeit verbunden ist.

Vergleicht man die Ergebnisse mit und ohne Anwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes in Bezug auf die chromatographischen Parameter Bodenzahl und Auflösung, so konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden festgestellt werden. Abgesehen von kleineren Unterschieden wurden sowohl mit als auch ohne GVK auf allen Säulenlängen vergleichbare Resultate erhalten. Lediglich für den komplexen Cytochrom C Verdau führte der Verzicht auf das GVK auf sehr kurzen Säulen (37.5 mm) zu einer leichten Verbesserung der Auflösung von früh eluierenden Peaks. Der größte Vorteil der Methode mit Gradient-Volumen-Konzept liegt allerdings in der erheblichen Verkürzung der Analysenzeit. So konnten mit dieser Methode bei gleichzeitiger weitgehender Beibehaltung der Trenneffizienz die Analysenzeiten um ca. 50% reduziert werden. Da dieser Gewinn an Zeit vor allem für Analysenlabore mit einem Hochdurchsatz an Proben sehr wichtig ist, sollte vor jeder Analyse stets geprüft werden, ob auch mit verkürzten Analysenzeiten (mit GVK) das gewünschte Trennergebnis erhalten werden kann. Sollte dies der Fall sein, so empfiehlt sich für diese Anwendungsgebiete die Anwendung des GVK zu Optimierung der Analysebedingungen.



## 2. Einfluss der Säulenlänge auf die Peakbasisbreite/Peakhalbwertsbreite

### a) Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreite der Peptide des P2693 Standards und des Cytochrom C Verdaus

Wie bereits mit Gradient-Volumen-Konzept, wurde auch ohne dieses der Einfluss der Säulenlänge  $L$  auf die Peakbasisbreite/Peakhalbwertsbreite untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Kapitel 2.4.3, wo eine Verkürzung der Säule um den Faktor  $m$  zu einer Reduzierung der Peakbreiten um Faktor  $\sqrt{m}$  geführt hatte, wird für die Studie ohne GVK ein umgekehrtes Verhalten erwartet. Verkürzt man eine Säule um den Faktor  $m$ , so führt dies zu einer deutlichen Reduzierung der Bodenzahl  $N$ , was sich wiederum signifikant auf die Trennleistung einer Säule auswirkt. Dieser Verminderung der Trenneffizienz versucht nun das GVK dadurch auszugleichen, dass es die Peakvolumina der eluierenden Analyten durch Herabsetzung der Gradientdauer konstant hält. Dadurch kann der Verlust an Bodenzahl weitgehend ausgeglichen werden. Gemäß den theoretischen Betrachtungen von L.R: Snyder [44] gilt folgende Beziehung für die Abhängigkeit der Peakbreite von der Bodenzahl:

$$w = \frac{4}{\sqrt{N}} \cdot t_0 \cdot (1 + k)$$

**Gleichung 2.25.** Zusammenhang zwischen Peakbasisbreite  $w$ , Bodenzahl  $N$  und Retentionsfaktor  $k$  für die Elution eines Analyten im isokratischen und Gradientmodus.

Reduziert man die Länge der Trennsäule um einen Faktor  $m$ , so hat dies eine Reduzierung der Bodenzahl  $N$  zur Folge. Wie aus **Gleichung 2.25** ersichtlich, besteht zwischen Peakbasisbreite  $w$  und Bodenzahl  $N$  ein umgekehrt proportionales Verhältnis ( $w=1/\sqrt{N}$ ), was dazu führt, dass die Peakbasisbreite ansteigt, wenn die Bodenzahl verringert wird. Gleichzeitig besteht zwischen der Peakbasisbreite  $w$  und dem Retentionsfaktor  $k$  ein direkt proportionales Verhältnis ( $w=\text{Konst} \cdot k$ ), was bedeutet, dass sich die Peakbasisbreite/Peakhalbwertsbreite verringert, wenn sich der Retentionsfaktor reduziert. Somit hat man zwei entgegengesetzte Faktoren, die

das Verhalten der Peakbreiten beeinflussen. Da sich jedoch die Reduzierung der Bodenzahl stärker auf die Peakbreiten auswirken sollte, wurde in diesem Teil der Studie ohne die Anwendung des GVK eine Erhöhung der Peakbasisbreiten/Peakhalbwertsbreiten bei Verkürzung der Säulenlängen erwartet. Weiterhin sollte in dieser Studie untersucht werden, ob auch ohne GVK ein direkter Zusammenhang ( $\sqrt{m}$ ) zwischen der Reduzierung der Säulenlänge um einen Faktor  $m$  und der Peakbreite besteht.

Exemplarisch für die erhaltenen Ergebnisse werden die Resultate für das Leucin Enkephalin (**Abbildung 2.21**) und das Oxytocin (**Abbildung 2.22**) (P2693 Peptid-Standard) sowie für das Peptid 3 (**Abbildung 2.24**) (Cytochrom C Verdau) vorgestellt. Die erhaltenen Ergebnisse für Säule #3 und Säule #4 sind in **Tabelle 2.6** für den Peptid-Standard tabellarisch zusammengestellt.

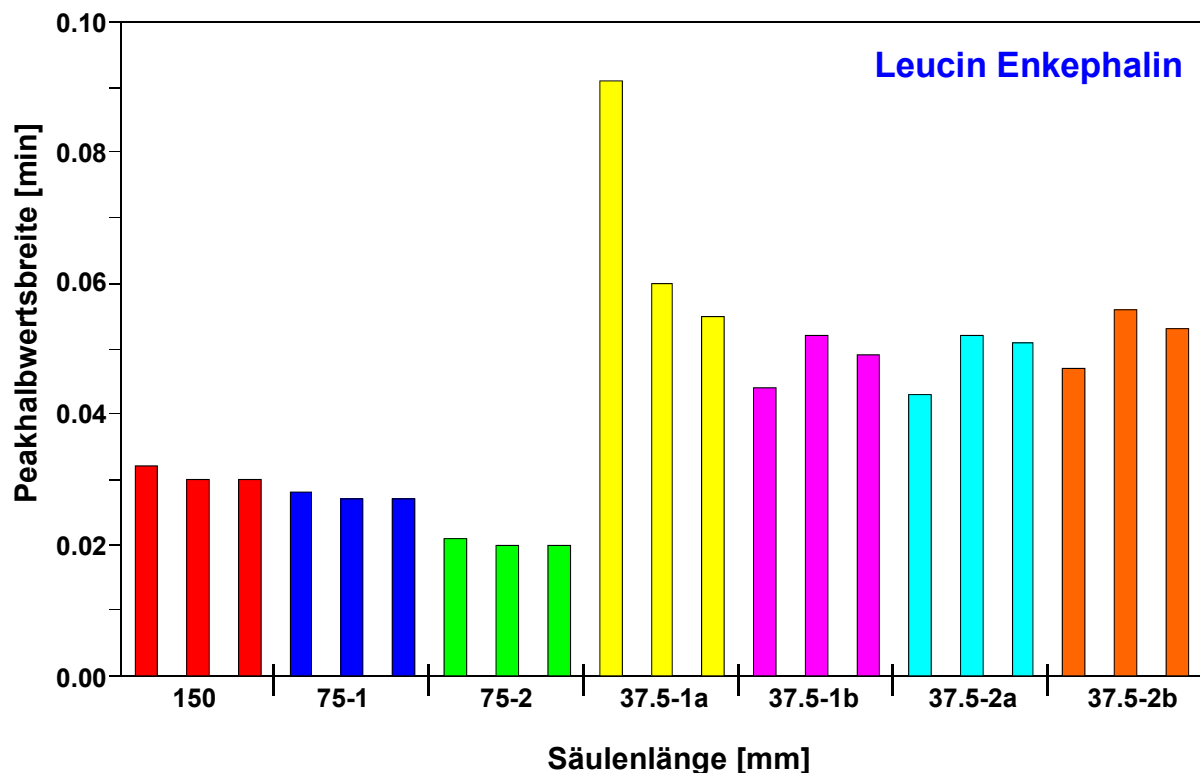
**Tabelle 2.6.** Tabellarische Zusammenstellung der bestimmten mittleren Peakbasisbreiten sowie der berechneten Peakkapazitäten für die beiden 150 mm Monolithen (22-03-2005 #3 und #4) sowie deren kürzere Teilstücke.

<b>P2693 Peptid-Standard</b>				
<b>Säule</b>	<b>Säulenlänge [mm]</b>	<b>w<sub>h</sub> mittel [min]</b>	<b>w<sub>b</sub> mittel [min]</b>	<b>P<sub>mittel</sub></b>
<b>22-03-2005 # 4</b>	150	0.033	0.056	135
<b>Teilstück 1</b>	75	0.036	0.061	124
<b>Teilstück 2</b>	75	0.035	0.059	128
<b>Teilstück 1a</b>	37.5	0.078	0.132	58
<b>Teilstück 1b</b>	37.5	0.070	0.120	64
<b>Teilstück 2a</b>	37.5	0.059	0.101	76
<b>Teilstück 2b</b>	37.5	0.055	0.093	82
<b>22-03-2005 # 3</b>	150	0.038	0.064	118
<b>Teilstück 1</b>	75	0.045	0.077	99
<b>Teilstück 2</b>	75	0.054	0.093	82
<b>Teilstück 1a</b>	37.5	0.077	0.130	59
<b>Teilstück 1b</b>	37.5	0.062	0.105	72
<b>Teilstück 2a</b>	37.5	0.085	0.145	53
<b>Teilstück 2b</b>	37.5	0.051	0.087	87

Die Ergebnisse für den Verdau (**Tabelle 2.19**) und die Protein-Mischung (**Tabelle 2.20**) sind im Anhang dieses Kapitels aufgeführt.

Betrachtet man die Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreiten von der Säulenlänge, so konnte, wie bereits in der Studie mit Anwendung des GVK, auch ohne GVK kein einheitlicher Trend ( $\sqrt{L}$  Abhängigkeit der Peakbreiten von Säulenlänge) für alle Analyten festgestellt werden. Während einige Analyten sehr gut mit dem erwarteten Verhalten übereinstimmen, weichen dagegen andere sehr stark ab.

Wie aus **Abbildung 2.21** ersichtlich, konnte für das Leucin Enkephalin beobachtet werden, dass eine Verkürzung der Säulenlänge L einen signifikanten Anstieg der Peakhalbwertsbreiten bewirkt. Weiterhin zeigt diese Abbildung, dass, mit Ausnahme für die Messungen auf Säule 37.5-1a, keine größeren Streuungen der Messwerte innerhalb der drei Wiederholungsmessungen (für eine Säulenlänge) sowie zwischen den einzelnen Säulen (37.5-1a-2b) festgestellt werden konnten.



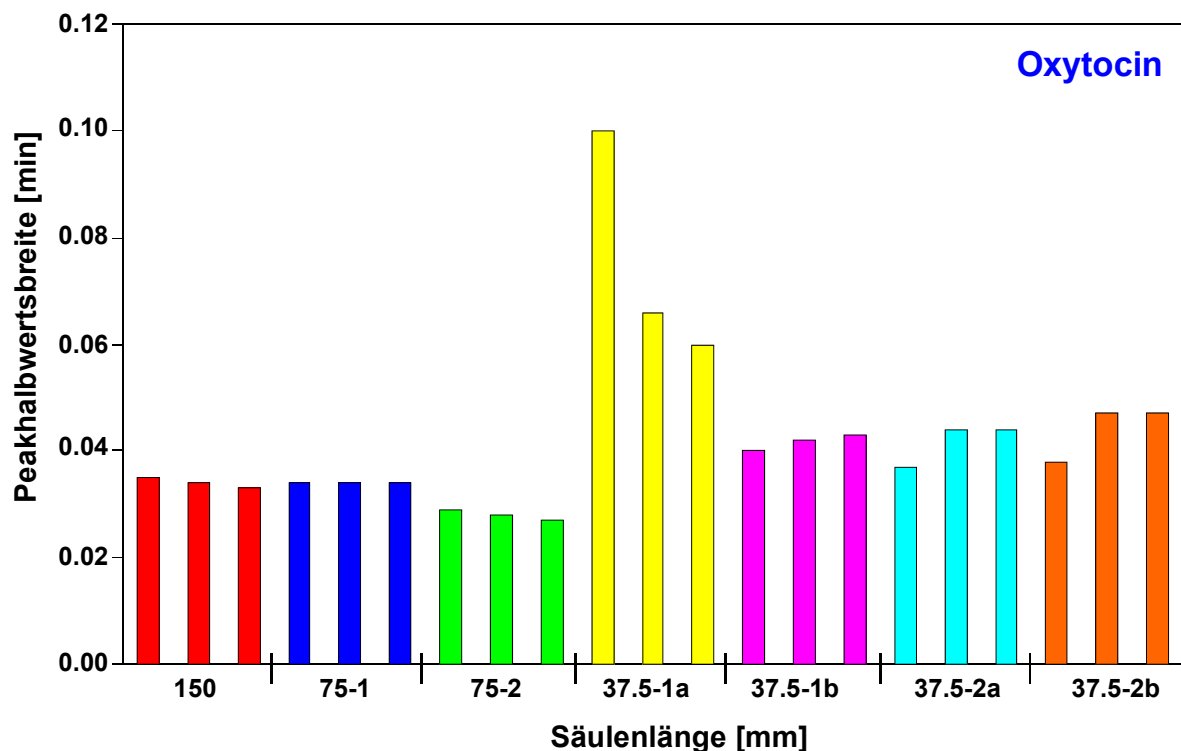
**Abbildung 2.21.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für ein Peptid des P2693 Peptid-Standards (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

So wurden für den 150 mm Monolithen Peakhalbwertsbreiten zwischen 0.030-0.032 min (Mittelwert 0.031 min), für die 75 mm Säulen (75.1 und 75.2)

Peakhalbwertsbreiten zwischen 0.020-0.028 min (0.024 min) und für die 37.5 mm Säulen Peakhalbwertsbreiten (37.5-1a – 37.5-2b) zwischen 0.044-0.06 min (0.05 min) erhalten (ohne Berücksichtigung des Messwertes 1 von Säule 37.5-1a). Das Fehlen eines einheitlichen Trends wird in **Abbildung 2.21** bereits dadurch deutlich, dass für die 150 mm und die beiden 75 mm Säulen nahezu die gleichen Peakhalbwertsbreiten erhalten wurden. Während man für die 37.5 mm Monolithen einen deutlichen Anstieg in den Peakhalbwertsbreiten bei der Reduzierung der Säulenlängen beobachten kann, führt die Verkürzung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm beim Leucin Enkephalin zu einer Abnahme der Peakhalbwertsbreiten (Faktor 1.3). Damit entspricht das Verhalten der 75 mm Säulen dem, das bereits mit Anwendung des GVKs (**Tabelle 2.4**) beobachtet wurde. Dort konnte für die Reduzierung von 150 mm auf 75 mm eine Abnahme der Peakhalbwertsbreiten um einen Faktor von 1.42 (Mittelwert für Peptide des Standards) beobachtet werden. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse für die 37.5 mm Monolithen mit denen aus Kapitel 2.4.3, so kann hier ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Während die Verkürzung der Trennsäule von 75 mm auf 37.5 mm mit GVK eine Reduzierung der Peakbreiten um Faktor 1.05 zur Folge hatte, führt die Verkürzung ohne GVK beim Leucin Enkephalin zu einem Anstieg der Peakhalbwertsbreiten um Faktor 2.2. Somit führt eine Verkürzung der Säulenlänge um Faktor 4 (150 mm – 37.5 mm) zu einer Zunahme der Peakhalbwertsbreiten um Faktor 1.7, was einer Abweichung vom erwarteten Verhalten ( $\sqrt{m}$  bei Verkürzung um Faktor  $m$ ) von ca. 15% ( $\sqrt{4} = 2$ ) entspricht. Damit stimmen die Ergebnisse für die 150 mm und die vier 37.5 mm Säulen gut mit den theoretisch erwarteten überein, während die der 75 mm Monolithen deutlich vom erwarteten Verhalten abweichen.

Auch für das zweite untersuchte Peptid des Standards (Oxytocin) konnte ein vergleichbares Verhalten beobachtet werden. So wurden, mit Ausnahme von Säule 37.5-1a, auch für dieses Peptid nur sehr geringe Schwankungen der Peakhalbwertsbreiten innerhalb der drei Wiederholungsmessungen für eine Säulenlänge festgestellt. Mit Ausnahme von Säule 37.5-1a, die leicht erhöhte Werte für die Peakhalbwertsbreiten zeigt, konnten für alle vier 37.5 mm Säulen weitgehend vergleichbare Werte für die Peakhalbwertsbreiten festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass alle Säulen auch vergleichbare Trenneffizienzen aufweisen,

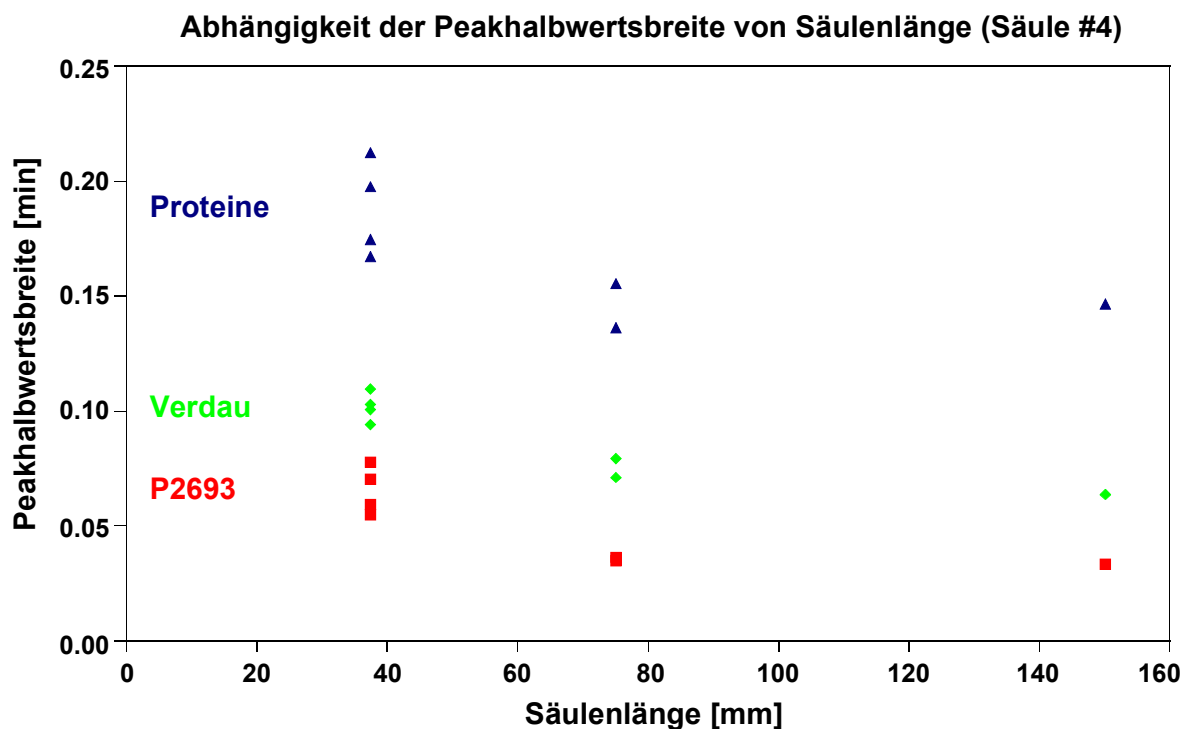
was bereits durch die Ergebnisse in Teil 1 dieses Kapitels, anhand der relativen Retentionszeiten, beobachtet werden konnte.



**Abbildung 2.22.** Abhängigkeit der Peakhalbwidths von der Säulenlänge für ein Peptid des P2693 Peptid-Standards (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

So wurden für die 150 mm Säule Peakhalbwidths zwischen 0.033-0.035 min (0.034 min) bestimmt, während für die beiden 75 mm Säulen Werte zwischen 0.027-0.034 min (0.031 min) bestimmt wurden. Für die vier 37.5 mm Säulen (ohne Messung 1 der Säule 37.5-1a) schwankten die Peakhalbwidths zwischen 0.037-0.066 min (0.052 min). Damit reduzierten sich die Peakhalbwidths bei Verkürzung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm um Faktor 1.1, was annähernd den Ergebnissen des Leucin Enkephalin (1.3) entspricht. Somit wurden für die 150 mm Säule und die beiden 75 mm Säulen vergleichbare Werte in den Peakhalbwidths erhalten. Reduziert man die Säulenlänge von 150 mm auf 37.5 mm (Faktor 4), so steigen dabei die Werte für die Peakhalbwidths von 0.034 min (150 mm) auf 0.052 min (37.5 mm) an (Faktor 1.5, Abweichung ca. 25%).

Zur Illustration des Verhaltens der Standardpeptide wurden, wie bereits in der Studie ohne GVK, auch hier die Mittelwerte über die Peakhalbwertsbreiten aller im Standard enthaltenen Peptide gebildet und zu den jeweiligen Säulenlängen in Relation gesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Abbildung 2.23** für Säule #4 und in **Abbildung 2.56** (Anhang) für Säule #3 dargestellt.



**Abbildung 2.23.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für verschiedene Analyten (Säule 22-03-2005#4). Für jede Säulenlänge wurde der Mittelwert aus allen Peakhalbwertsbreiten ermittelt und gegen die Säulenlänge aufgetragen.

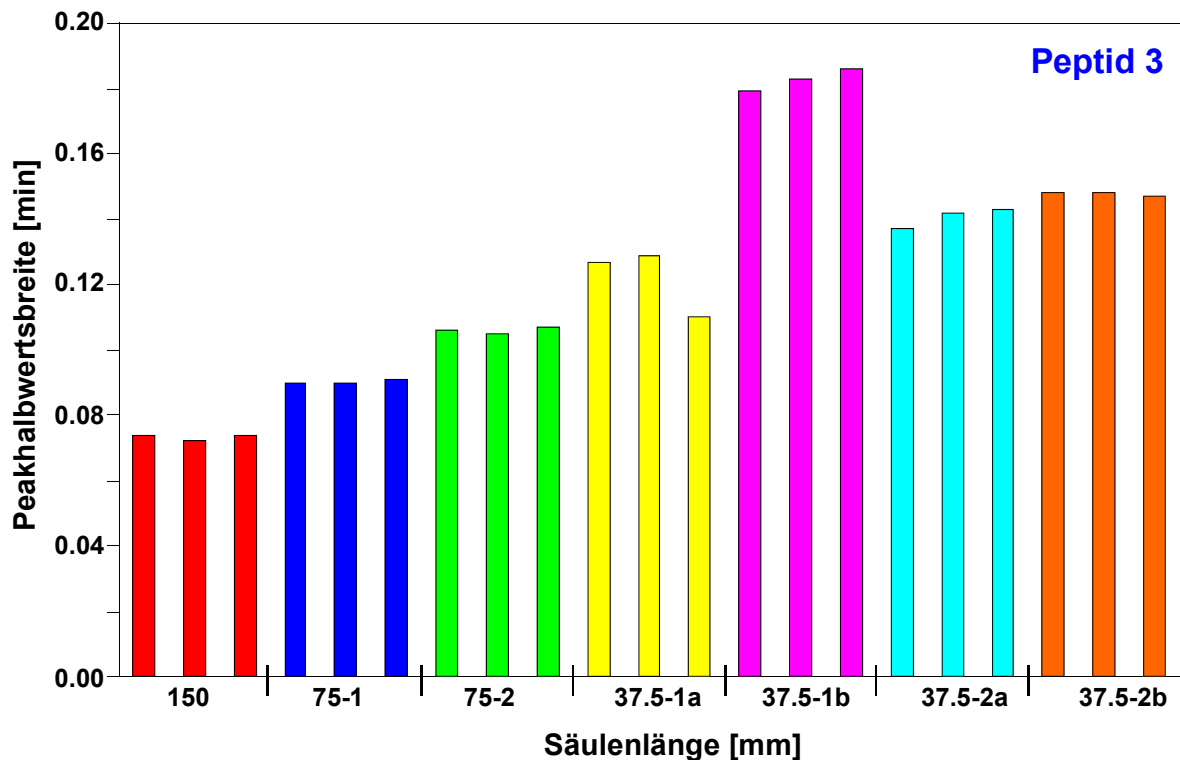
Wie bereits für die Peptide Leucin Enkephalin und Oxytocin festgestellt, bestätigt sich auch bei der Untersuchung der Mittelwerte aller Peptide der beobachtete Trend, dass die Verkürzung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm zu vergleichbaren Werten in den Peakhalbwertsbreiten führt. Während jedoch für Leucin Enkephalin und Oxytocin noch eine leichte Abnahme in den Peakhalbwertsbreiten bei der Verkürzung von 150 mm auf 75 mm (L.E. Faktor 1.3, Oxy. Faktor 1.1) beobachtet wurde, führt die Verkürzung für die Gesamtheit aller Peptide zu einem geringfügigen Anstieg (Faktor 1.1) in den Peakhalbwertsbreiten (150 mm: 0.033 min, 75 mm: 0.036). Damit konnte für die 75 mm Säulen eine deutliche Abweichung vom

erwarteten Verhalten ( $\sqrt{2} = 1.4142$ ) beobachtet werden (Abweichung ca. 22%). Im Gegensatz dazu stimmen die Werte für die zweite untersuchte Säule (22-03-2005 #3) etwas besser mit den erwarteten Werten überein. Während für den 150 mm Monolithen eine Peakhalbwertsbreite von 0.038 min bestimmt wurde, konnte für die beiden 75 mm Säulen (Mittelwert aller Peptide) eine Peakhalbwertsbreite von 0.050 min erhalten werden. Damit erhöhen sich die Peakhalbwertsbreiten bei der Verkürzung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm um Faktor 1.3, was einer Abweichung vom prognostizierten Verhalten von ca. 7% entspricht. Reduziert man die Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm, so erhöhen sich die Peakhalbwertsbreiten für Säule #4 um Faktor 1.9 (0.036 min für 75 mm, 0.067 min für 37.5 mm) und um Faktor 1.4 für Säule #3 (0.050 min für 75 mm, 0.069 min für 37.5 mm). Somit wurde für Säule #4 eine schlechte Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erhalten (Abweichung ca. 34%), während für Säule #3 eine hervorragende Übereinstimmung (Abweichung ca. 1.1%) erhalten wurde.

Vergleicht man die Übereinstimmungen zwischen Theorie und Experiment ohne Anwendung des GVK mit denen mit Anwendung des GVK, so sieht man, dass vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden. Während es bei der Verkürzung von 75 mm auf 37.5 mm bei Säule #4 mit GVK zu einer Abweichung von ca. 21% gekommen ist, stimmten die Ergebnisse für Säule #3 (Abweichung ca. 1.7%) sehr gut mit den erwarteten Ergebnissen überein.

Neben den Peptiden des Verdau wurden auch die Peptide des Cytochrom C Verdau in dieser Studie untersucht. Exemplarisch für die 17 im Verdau enthaltenen Peptide werden hier die Ergebnisse des Peptid 3 vorgestellt. Diese sind in **Abbildung 2.24** dargestellt.

Auch für die Peptide des Verdau zeigen sich nur sehr geringe Schwankungen in den Peakhalbwertsbreiten für die einzelnen Wiederholungsmessungen einer Säulenlänge. Mit Ausnahme der leicht erhöhten Werte für Säule 37.5-1b zeigen sowohl die vier 37.5 mm Säulen als auch die beiden 75 mm Säulen vergleichbare Werte für die Peakhalbwertsbreiten, was auf vergleichbare Trenneffizienzen schließen lässt.



**Abbildung 2.24.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für ein Peptid des Cytochrom C Verdau (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

So konnten für den 150 mm Monolithen Peakhalbwertsbreiten von 0.075 min, für die beiden 75 mm Säulen Werte zwischen 0.09-0.11 min (0.10 min) und für die vier 37.5 mm Säulen Werte zwischen 0.11-0.19 min (0.15 min) bestimmt werden. Reduziert man die Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm, so steigen die Peakhalbwertsbreiten um Faktor 1.3 an. Damit stimmt dieses Verhalten sehr gut (Abweichung ca. 6%) mit dem erwarteten Verhalten (1.4142) überein. Damit ergibt sich im Vergleich zu den Peptiden des Peptid-Standards eine deutlich bessere Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment. Verkürzt man die Säulenlänge weiter von 75 mm auf 37.5 mm, so steigen die entsprechenden Peakhalbwertsbreiten von 0.10 min auf 0.15 min an, was einem Anstieg um Faktor 1.5 entspricht. Somit wurde auch hier eine sehr gute Übereinstimmung (Abweichung ca. 6%) mit den erwarteten Werten erhalten. Untersucht man dagegen die Mittelwerte der Peakhalbwertsbreiten aller im Verdau enthaltenen Peptide, so erhält man für den 150 mm Monolithen (Säule #4) eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.063 min, für die beiden 75 mm Säulen eine Peakhalbwertsbreite von 0.075 min und für die vier 37.5 mm Säulen eine mittlere



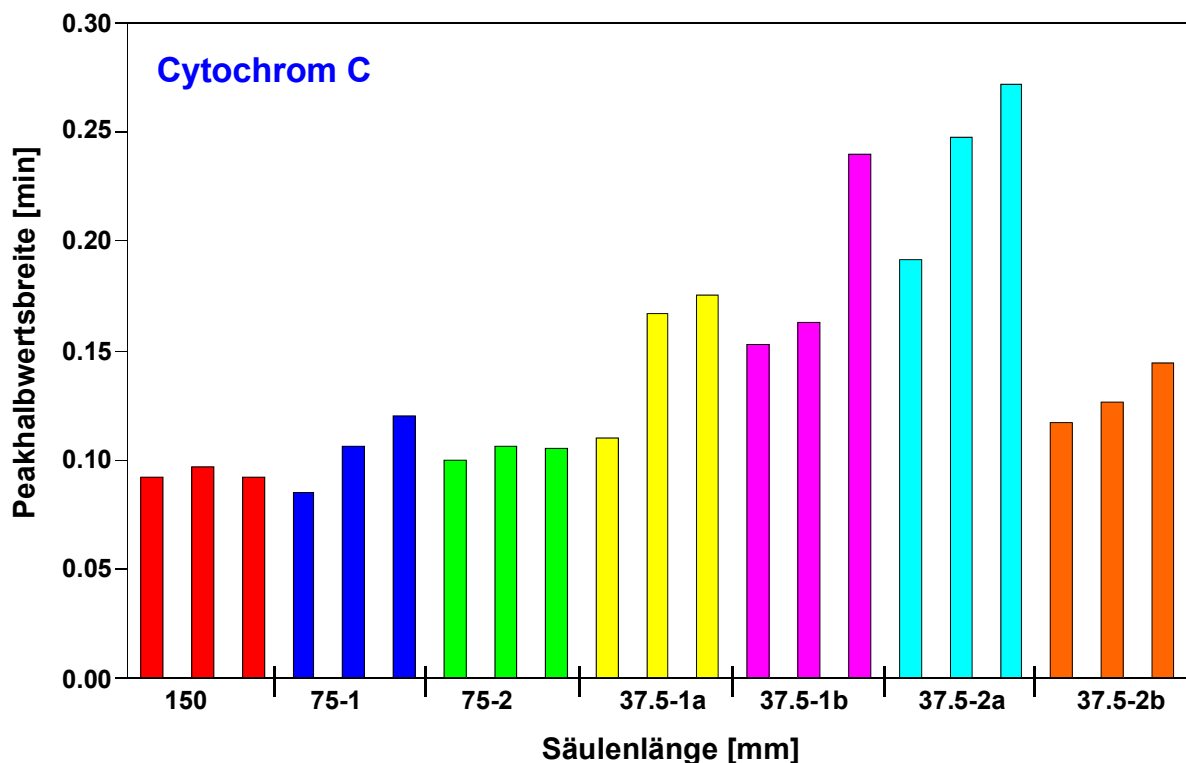
Peakhalbwertsbreite von 0.102 min. Die entspricht einer Steigerung der Peakhalbwertsbreiten um einen Faktor von 1.2 für die Reduzierung von 150 mm auf 75 mm und einem Faktor von 1.4 für die Reduzierung von 75 mm auf 37.5 mm. Damit wurde, wie bereits für die Peptide des Standards, für die 75 mm eine schlechtere Übereinstimmung (Abweichung ca. 15%) zwischen Theorie und Experiment erhalten als dies für die 37.5 mm Säulen der Fall war (Abweichung ca. 4%). Vergleicht man die Ergebnisse für Säule #4 mit denen von Säule #3, so kann man für Säule #3 relativ vergleichbare Werte für die Peakhalbwertsbreiten bestimmen. Während für den 150 mm Monolithen Peakhalbwertsbreiten von 0.071 min bestimmt wurden, erhöhen sich diese bei den 75 mm auf 0.087 min und bei den 37.5 mm Monolithen auf 0.096 min. Somit ergibt sich für die Reduzierung von 150 mm auf 75 mm eine Steigerung um Faktor 1.2 (Abweichung 15%) und für die Reduzierung von 75 mm auf 37.5 mm ein Faktor von 1.1 (Abweichung 22%). Im Gegensatz zu den Peptiden des Standards wurde für die Peptide des Verdaus für die längeren Säulen (75 mm) eine bessere Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erhalten.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen mit Gradient-Volumen-Konzept (**Tabelle 2.4**), so kann, mit Ausnahme der sehr guten Ergebnisse für die Reduzierung von 75 mm auf 37.5 mm bei Säule #4, ein weitgehend vergleichbares Verhalten festgestellt werden. Während die Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm ohne GVK zu einer Abweichung von 15% für Säule #4 und Säule #3 führt, wurde mit GVK eine Abweichung von 13% für Säule #4 und 15% für Säule 3 ermittelt. Auch für die Reduzierung von 75 mm auf 37.5 mm wurden für beide Methoden (Ausnahme Säule #4) vergleichbare Ergebnisse, mit einer Abweichung von 4% für Säule #4 und 22% für Säule #3 ohne GVK und 35% für Säule #4 und 21% für Säule #3 mit GVK beobachtet.

### b) Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreiten von Proteinen

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreiten der Proteine untersucht. Exemplarisch werden hier die Resultate für die Proteine Cytochrom C (**Abbildung 2.25**) und Conalbumin (**Abbildung 2.26**) näher erläutert.

Wie aus **Abbildung 2.25** ersichtlich, liegt für das Protein Cytochrom C eine stärkere Schwankung in den Peakhalbwertsbreiten für die 37.5 mm Monolithen vor, als dies für die Peptide der Fall war. Diese größeren Schwankungen der Werte konnten auch innerhalb der Wiederholungsmessungen beobachtet werden. Da dieses Verhalten jedoch nur für das Cytochrom C beobachtet wurde (vgl. Conalbumin **Abbildung 2.26**), brauchte es für die weiteren Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt zu werden.

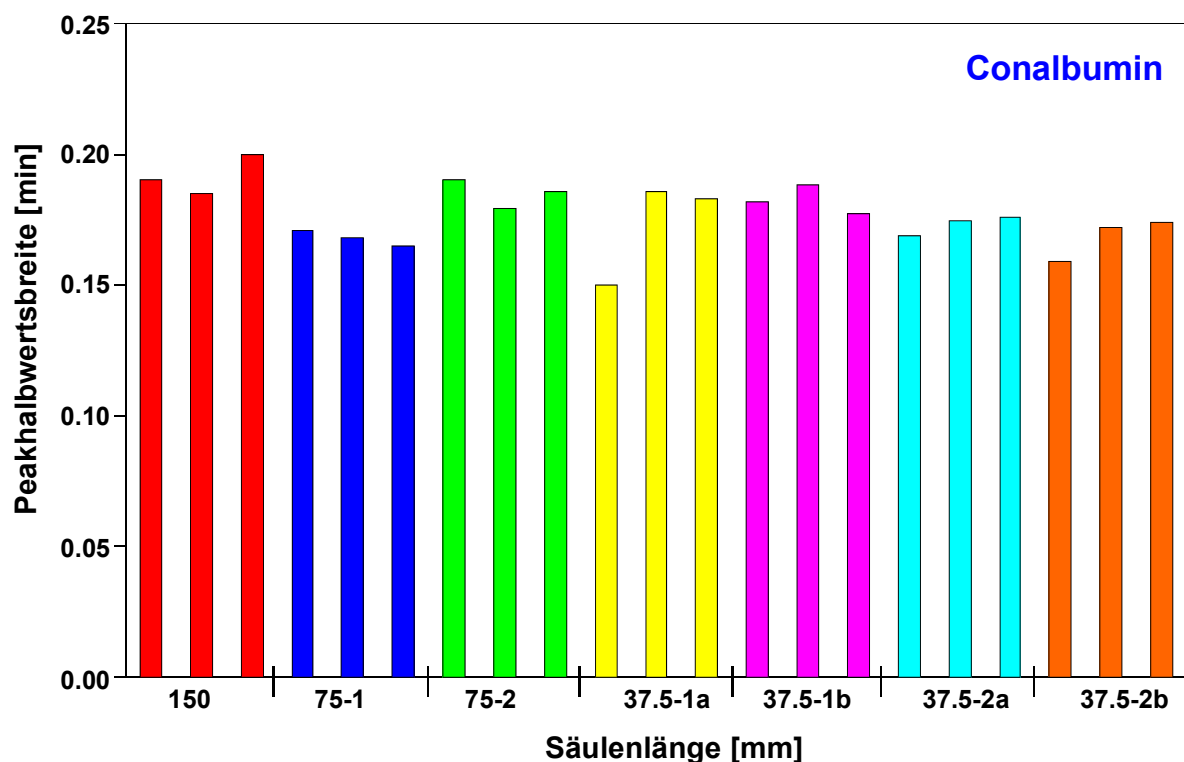


**Abbildung 2.25.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für das Protein Cytochrom C der Protein-Mischung (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Für die 150 mm Trennsäule wurden für Cytochrom C Peakhalbwertsbreiten von 0.097 min ermittelt, während für die kürzeren 75 mm Säulen Werte zwischen 0.092-0.120 min (0.106 min) und für die 37.5 mm Säulen Werte zwischen 0.112-0.271 min (0.191 min) erhalten wurden. Dies bedeutet, dass bei der Halbierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm die Peakhalbwertsbreiten um Faktor 1.1 ansteigen, wohingegen eine Halbierung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm einen Anstieg um den Faktor 1.8 bewirkt. Dies entspricht einer Abweichung vom erwarteten Wert

von ca. 22% für die Halbierung auf 75 mm und von ca. 27% für die Halbierung von 75 mm auf 37.5 mm.

Vergleicht man den Einfluss der Säulenlänge auf die Peakhalbwertsbreite von Cytochrom C mit dem von Conalbumin (**Abbildung 2.26**), so kann hierbei ein signifikanter Unterschied im Verhalten der beiden Proteine festgestellt werden. Während für Cytochrom C die Verkürzung der Säulenlänge zu einem Anstieg der Peakhalbwertsbreiten führte, konnten für Conalbumin nahezu für alle Säulenlängen vergleichbare Werte für die Peakhalbwertsbreiten ermittelt werden.



**Abbildung 2.26.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für das Protein Conalbumin der Protein-Mischung (Säule: 22-03-2005 #4). Für jede Säulenlänge wurden 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Im Gegensatz zum Cytochrom C kann hier kein einheitlicher Trend beobachtet werden. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse für Cytochrom C und Conalbumin wurde auch für die Proteine der Mittelwert der Peakhalbwertsbreiten für alle Proteine gebildet und mit den Säulenlängen korreliert (vgl. **Abbildung 2.23** bzw. **Tabelle 2.20** im Anhang).

Unter Berücksichtigung der Mittelwerte aller Proteine ergibt sich für den 150 mm Monolithen (Säule #4) eine Peakhalbwertsbreite von 0.147 min, für die beiden 75 mm Monolithen (Mittelwert) ein Wert von 0.146 min und für die 37.5 mm Säulen ein Wert von 0.190 min. Somit wurden für die 150 mm und die beiden 75 mm Säulen vergleichbare Werte für die Peakhalbwertsbreiten erhalten, während die Reduzierung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm zu einem Anstieg der Peakhalbwertsbreiten um einen Faktor 1.3 führt. Damit wurde für die Halbierung auf 75 mm eine sehr schlechte Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erhalten, während die Abweichung für die Reduzierung von 75 mm auf 37.5 mm mit ca. 8% im guten Bereich liegt. Im Gegensatz zu Säule #4 führt die Halbierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 bei Säule #3 zu einem Absinken der Peakhalbwertsbreiten von 0.182 min (150 mm) auf 0.175 min (75 mm) (Faktor 1.04). Im Vergleich dazu führt eine weitere Verkürzung der Säulenlänge auf 37.5 mm zu einem signifikanten Anstieg der Peakhalbwertsbreiten von 0.175 min (75 mm) auf 0.197 min (37.5 mm). Dies entspricht einem Faktor von 1.1 und damit einer Abweichung zum erwarteten Verhalten von ca. 22%.

Vergleicht man die Ergebnisse ohne Anwendung des GVK mit denen mit Anwendung des GVK (**Tabelle 2.4**), so kann für das Verhalten von Säule #4 bei der Reduzierung von 150 mm auf 75 mm eine signifikante Abweichung beobachtet werden. Während die Ergebnisse mit GVK mit einer Abweichung von ca. 7% sehr gut mit dem erwarteten Verhalten übereinstimmen, ist die Abweichung ohne GVK mit 30% sehr hoch. Im Gegensatz dazu wurden für die Reduzierung von 75 mm auf 37.5 mm für beide Methoden mit ca. 13% mit GVK und ca. 8% ohne GVK vergleichbare Ergebnisse erhalten. Für Säule #3 wurden mit einer Abweichung von 32% ohne GVK und 21% mit GVK für die Halbierung von 150 mm auf 75 mm sowie mit 22% ohne GVK und 30% mit GVK für die Reduzierung von 75 mm auf 37.5 mm für beide Methoden vergleichbare Ergebnisse erhalten.

Somit kann auch für die Proteine ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen Säulenlänge und Peakhalbwertsbreite ermittelt werden, jedoch führt mit GVK eine Verkürzung der Säule zu einer Reduzierung der Peakhalbwertsbreiten bzw. Peakbasisbreiten, während ohne GVK eine vergleichbare Zunahme der Peakhalbwertsbreiten beobachtet werden kann. Trotz der Zunahme der Peakhalbwertsbreiten können jedoch auch ohne GVK hohe Peakkapazitäten

generiert werden, da die Zunahme in den Peakbreiten durch die gleichzeitige Zunahme der Gradientdauer kompensiert wird. Die Ergebnisse des Einflusses der Säulenlänge auf die Peakkapazitäten werden im nächsten Kapitel dieser Arbeit näher untersucht.

In **Tabelle 2.7** ist ein Überblick über die ermittelten Peakhalbwertsbreiten (aus den Mittelwerten) und die dazugehörigen Abweichungen vom erwarteten Verhalten für die einzelnen Analyten zusammengestellt. Im Gegensatz zu den Werten aus **Tabelle 2.4** (Verkürzung von L resultierte in Reduzierung von  $w$ ), führt hier die Verkürzung der Säule um L jedoch zu einem Anstieg der Peakbreiten um die entsprechenden tabellierten Faktoren. Damit konnte ohne Anwendung des GVK ein umgekehrt proportionales Verhältnis ( $1/\sqrt{m}$ ) zwischen Peakhalbwertsbreiten bzw. Peakbasisbreiten und der Säulenlänge ermittelt werden.

**Tabelle 2.7.** Überblick über die berechneten Verhältnisse bei Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm und 75 mm und 37.5 mm. Für die Berechnung der prozentualen Abweichungen wurde ein ideales Verhältnis von  $\sqrt{2}$  (Halbierung Säulenlänge) angenommen.

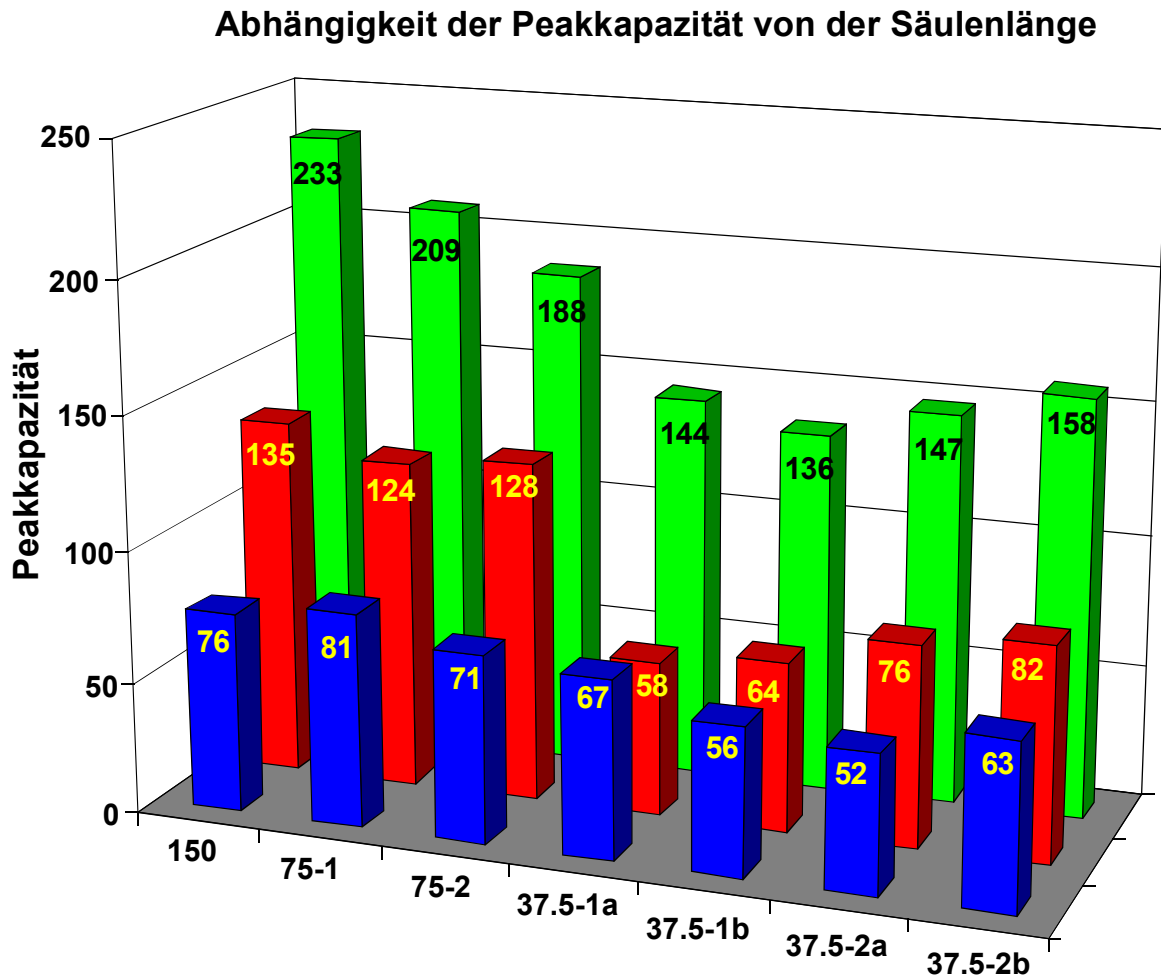
<b>Abhängigkeit <math>w_h</math> von Säulenlänge L</b>						
Säule	Verhältnis $w_h$ von Säule 1 / Säule 2			Abweichung Theorie / Experiment [%]		
	P2693	Proteine	Verdau	P2693	Proteine	Verdau
<b>22-03-2005 # 4</b>						
75 <sub>mittel</sub> / 150 #4	1.1	1.0	1.2	24.3	29.7	16.4
37.5 <sub>mittel</sub> /75 <sub>mittel</sub> #4	1.9	1.3	1.4	31.1	8.8	4.0
<b>22-03-2005 # 3</b>						
75 <sub>mittel</sub> / 150 #3	1.3	1.0	1.2	6.4	31.9	13.8
37.5 <sub>mittel</sub> /75 <sub>mittel</sub> #3	1.4	1.1	1.2	2.3	20.1	14.7

### 3. Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazität

In diesem Teil der Studie wurde der Einfluss der Säulenlänge L auf die Peakkapazität untersucht. Analog zu den Untersuchungen mit Anwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes wurden auch hier zwei monolithische Trennsäulen und ihre kürzeren Teilstücke mittels eines P2693 Peptid-Standards, einer Protein-

Mischung und eines Cytochrom C Verdau untersucht. Die Peakkapazitäten wurden gemäß **Gleichung 2.24** berechnet.

Ein Überblick über die für Säule 22-03-2004 #4 berechneten Peakkapazitäten ist in **Abbildung 2.27** sowie tabellarisch in **Tabelle 2.6** für den Peptid-Standard, in **Tabelle 2.19** für den Cytochrom C Verdau und in **Tabelle 2.20** für die Protein-Mischung gegeben.



**Abbildung 2.27.** Ergebnisse für den Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazitäten für verschiedene Analyten unter Verwendung eines 150 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen und ohne das Gradient-Volumen-Konzept (22-03-2005#4) (erste Reihe: Proteine, zweite Reihe: Peptide des Standards, dritte Reihe: Peptide des Verdau).

Wie aus **Abbildung 2.27** ersichtlich, wurden die höchsten Peakkapazitäten, mit Peakkapazitäten von 233 für den Verdau, 135 für den Peptid-Standard und 76 für die

Protein-Mischung, auf den 150 mm Trennsäulen (Ausnahme Proteine) erhalten. Reduziert man die Säulenlänge, so führt dies zu einer signifikanten Abnahme der Peakkapazitäten. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits in Kapitel 2.4.4-1 (Einfluss der Säulenlänge auf  $t_{rel}$ ) und 2.4.4-2 erhaltenen Ergebnisse, dass eine Erhöhung der Säulenlänge zu einer deutlichen Verbesserung der Trennleistung der Säule führt. Wie bereits in Kapitel 2.4.3-3 erläutert, können die Unterschiede in den Peakkapazitäten zwischen den einzelnen Analyten (Verdau, P2693 Standard und Proteine) einerseits durch die deutlich unterschiedlichen Gradientenzeiten und andererseits, besonders für die Proteine, durch die großen Unterschiede in den Peakbreiten erklärt werden. Während die Peptide des Verdau und des Peptid-Standards um Faktor 2 in ihren Peakbasisbreiten/Peakhalbwertsbreiten differieren, unterscheiden sich gleichzeitig ihre Gradienten um Faktor 3.3, was dazu führt, dass signifikant höhere Werte für  $P_K$  für die Peptide des Verdau erhalten werden (ca. 43% höhere Peakkapazitäten für den Verdau). Dem entgegen haben die Proteine, mit einer durchschnittlichen Peakbasisbreite von 0.147 min auf dem 150 mm Monolithen, eine um Faktor 2.3 für den Verdau ( $w_h = 0.063$  min) und um Faktor 4.5 für die Peptide des Standards ( $w_h = 0.033$  min) höhere Peakhalbwertsbreite.

Weiterhin ist aus **Abbildung 2.27** ersichtlich, dass Säulen gleicher Länge auch vergleichbare Werte in den Peakkapazitäten haben. So unterscheiden sich die Peakkapazitäten der beiden 75 mm Säulen für den Verdau um ca. 10% (75-1: 209, 75-2: 188), für die Peptide des Standards um ca. 3% (75-1: 124, 75-2: 128) und für die Proteine um ca. 12% (75-1: 81, 75-2: 71). Ein vergleichbares Verhalten wurde mit Ausnahme für die Peptide des Standards, die mit ca. 30% den größten Unterschied zwischen den einzelnen Säulen (37.5-1a: 58, 37.5-2b: 82) aufweisen, auch für die 37.5 mm Monolithen beobachtet. So unterscheiden sich die Peakkapazitäten der einzelnen Säulen (Unterschiede zwischen Säule mit höchster und niedrigster Peakkapazität als Maßstab) für den Verdau um 14% (37.5-1b: 136, 37.5-2b: 158), während für die Proteine ein maximaler Unterschied von 23% (37.5-1a: 67, 37.5-2a: 52) bestimmt wurde. Dies lässt darauf schließen, dass alle Trennsäulen über eine vergleichbare Trenneffizienz verfügen, was wiederum ein Indiz für die Homogenität während des Polymerisationsprozesses ist.

Wie bereits dargestellt führt, mit Ausnahme der Protein-Mischung auf den 75 mm Säulen, eine Reduzierung der Säulenlänge zu einer Abnahme in den

Peakkapazitäten, wobei sich dieser Effekt besonders stark bei der Verkürzung der Säulenlänge von 75 mm auf 37.5 mm zeigt. So wurde für die Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm für den Verdau eine Abnahme der Peakkapazitäten um Faktor 1.2 (150 mm: 233, 75 mm (Mittelwert): 199) und für die Peptide des Standards eine Abnahme um Faktor 1.1 (150 mm: 135, 75 mm: 126) beobachtet. Lediglich für die Protein-Mischung wurden für die 75 mm leicht erhöhte Peakkapazitäten (150 mm: 76, 75 mm: 79) bestimmt. Wesentlich deutlicher ist die Abnahme der Peakkapazitäten, wenn man die Werte für die Säulenverkürzung von 75 mm auf 37.5 mm miteinander vergleicht. Während auf den 75 mm Säulen für den Verdau Peakkapazitäten von 199 bestimmt wurden, reduzieren sich diese für die kürzeren 37.5 mm Säulen auf 146 (Faktor 1.4). Ein vergleichbares Verhalten wurde für die Proteine mit einer Reduzierung um Faktor 1.3 (75 mm: 79, 37.5 mm: 60) und für die Peptide des Standards mit einer Abnahme um Faktor 1.8 (75 mm: 126, 37.5 mm: 70) erhalten. Vergleicht man diese Werte für Säule #4 mit denen aus Kapitel 2.4.3 (mit GVK-**Tabelle 2.5**), so wurden dort vergleichbare Ergebnisse erhalten. Ein Überblick über die erhaltenen Ergebnisse ist in folgender Tabelle gegeben.

**Tabelle 2.8.** Überblick über die berechneten Verhältnisse bei Reduzierung der Säulenlänge von 150 mm auf 75 mm und 75 mm und 37.5 mm. Für die Berechnung der prozentualen Abweichungen wurde ein ideales Verhältnis von  $\sqrt{2}$  (Halbierung Säulenlänge) angenommen (ohne GVK).

<b>Abhängigkeit <math>P_K</math> von Säulenlänge L</b>						
Säule	Verhältnis $P_K$ von Säule 1 / Säule 2			Abweichung Theorie / Experiment [%]		
	P2693	Proteine	Verdau	P2693	Proteine	Verdau
<b>22-03-2005 # 4</b>						
150 / 75mittel	1.1	1.0	1.2	24.5	30.0	16.7
75mittel / 37.5mittel	1.8	1.3	1.4	27.3	10.0	4.3
<b>22-03-2005 # 3</b>						
150 / 75mittel	1.3	1.0	1.2	7.6	32.0	14.2
75mittel / 37.5mittel	1.3	1.1	1.2	5.6	21.0	15.0

Wie aus **Tabelle 2.8** ersichtlich, wurden für Säule #4 und Säule #3 vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Säulenlänge auf die Peakkapazitäten erhalten. Weiterhin kann durch Vergleich der Resultate mit und ohne Anwendung



des Gradient-Volumen-Konzeptes geschlossen werden, dass für beide Methoden die Peakkapazitäten durch die Säulenzängen analog beeinflusst werden. Für beide Verfahren ergeben sich die höchsten Peakkapazitäten für die längsten Trennsäulen. Daraus kann gefolgert werden, dass eine Erhöhung der Säulenzänge zu einer signifikanten Verbesserung der Trennleistung in der Gradientelution führt.

### **2.4.5. Zusammenfassung**

Im ersten Teil der Studie zur Anwendung langer PS/DVB-Monolithen sollte, neben dem Einfluss der Säulendimensionen auf die chromatographischen Parameter wie Auflösung, Trenneffizienz, Peakbreiten und Peakkapazitäten, auch der Einfluss der Anwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes auf die Trennleistung monolithischer Säulen untersucht werden. Als Analyten dienten dazu ein Peptid-Standard, eine 9er Protein-Mischung sowie ein Cytochrom C Verdau. Neben dem Einfluss der Säulendimensionen sollte im Rahmen dieser Studie auch der Herstellungsprozess für die PS/DVB-Monolithen soweit optimiert werden, dass die homogene und reproduzierbare Herstellung langer Monolithen (150-300 mm) möglich war.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich, dass, in Zusammenarbeit mit der Firma LC-Packings, der Herstellungsprozess für längere Monolithen soweit optimiert werden konnte, dass es auch bei längeren Trennsäulen nicht zum Auftreten störender Inhomogenitäten gekommen ist. Dies konnte in dieser Studie dadurch belegt werden, dass die beiden 75 mm Teilstücke bzw. die vier 37.5 mm Teilstücke, mit Ausnahme kleinerer Abweichungen, weitgehend über vergleichbare Trenneffizienzen, Auflösungen, Peakbreiten und Peakkapazitäten verfügten. Wäre es während des Syntheseprozesses zur Ausbildung von Inhomogenitäten gekommen, so hätten diese sich dadurch offenbart, dass das betreffende Teilstück eine deutlich verminderte Trennleistung aufgewiesen hätte. Da es jedoch bei keinem Teilstück der beiden untersuchten 150 mm Monolithen zu einer signifikanten Abweichung in der Säulenperformance gekommen war, kann daraus geschlossen werden, dass die Herstellung auch längerer Monolithen reproduzierbar möglich ist.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse im Rahmen dieser Studie, dass sich die Säulenzänge  $L$  in der Gradientelution signifikant auf die Leistungsfähigkeit der

Trennsäulen auswirkt. So konnte gezeigt werden, dass längere Säulen zu erheblich besseren Trenneffizienzen, einer besseren Auflösung und sehr gesteigerten Peakkapazitäten führen. Durch die Resultate dieser Arbeit konnte weiterhin die theoretische Annahme bestätigt werden, dass eine Änderung der Säulenlänge um Faktor  $m$  nicht zu einem proportionalen Anstieg der Peakbreiten und damit auch der Peakkapazitäten führt, sondern dass sich die Peakbreiten lediglich um einen Faktor  $\sqrt{m}$  ändern. Dies bedeutet, dass durch eine Erhöhung der Säulenlänge um  $m$  eine signifikante Verbesserung der Peakkapazitäten ( $P_K=1+t_g/w_b$ ) erreicht werden kann. Neben der Optimierung des Syntheseprozesses für längere Trennsäulen ist diese Abhängigkeit der Peakbreiten (und damit der Peakkapazitäten) von der Säulenlänge entscheidend, wenn durch Erhöhung der Säulenlängen eine Verbesserung der Trennleistung erreicht werden soll.

Zusätzlich wurde in diesem Teil der Arbeit der Einfluss der Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes auf die Trennleistung monolithischer Säulen untersucht.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass für beide untersuchten Methoden (mit und ohne Anwendung des GVK) ein analoger Einfluss der Säulendimensionen auf die chromatographischen Parameter erhalten wurde, da eine Erhöhung der Säulenlänge stets zu einer signifikanten Verbesserung der Peakkapazitäten führte. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Methoden konnte beim Einfluss der Säulenlänge auf die Peakbreiten festgestellt werden. Während mit GVK eine Reduzierung der Säulenlänge um Faktor  $m$  zu einer Abnahme der Peakbreiten um Faktor  $\sqrt{m}$  führt, steigen ohne Anwendung des GVK die entsprechend Peakbreiten entgegengesetzt um Faktor  $\sqrt{m}$  an. Somit konnte ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Peakbreiten und Säulenlängen festgestellt werden ( $1/\sqrt{m}$ ). Der größte Vorteil der Methode mit Gradient-Volumen-Konzept liegt allerdings in der erheblichen Verkürzung der Analysenzeit. So konnten mit dieser Methode die Analysenzeiten um ca. 50% reduziert werden. Da dieser Gewinn an Zeit vor allem für Analysenlabore mit einem Hochdurchsatz an Proben sehr wichtig ist, sollte vor jeder Analyse stets geprüft werden, ob auch mit verkürzten Analysenzeiten (mit GVK) das gewünschte Trennergebnis erhalten werden kann.

## **2.5. Anwendung langer Säulen und langer Gradientenzeiten für die Trennung komplexer Mischungen**

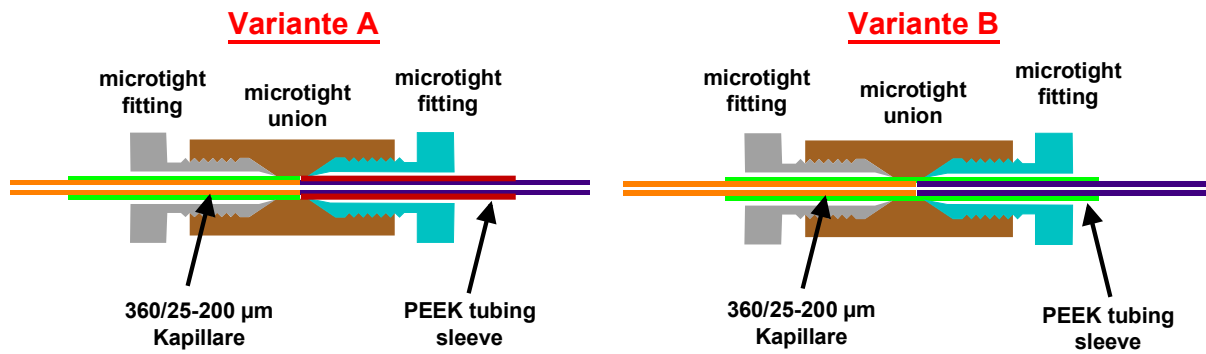
### **2.5.1. Einführung**

Aufgrund der Ergebnisse, die aus den Untersuchungen der 150 mm Monolithen und ihrer kürzeren Teilstücke erhalten wurden, sollte im Rahmen einer zweiten Studie die Anwendbarkeit langer monolithischer PS/DVB-Säulen (150-300 x 0.2 mm i.D.) für die Trennung komplexer Analyten untersucht werden. Neben dem Einfluss der Säulenlänge wurde auch der Einfluss der Gradientendauer sowie der Flussrate auf die Trennleistung (Peakkapazität) erforscht. Dazu wurden Gradienten zwischen 60 und 540 min bzw. Flussraten zwischen 1.0-2.0  $\mu\text{l}/\text{min}$  auf den verschiedenen langen Monolithen verwendet und dabei der Einfluss der Analysenzeit und des Flusses auf die chromatographisch relevanten Parameter der Peakbreiten und Peakkapazitäten untersucht. Um Trennsäulen der Längen von 150 bis 300 mm zu erhalten, wurden sowohl gekoppelte Säulen, d.h. Säulen, bei denen große Längen durch Kombination kürzerer Monolithen (z.B. 210 mm Monolithen aus 150 mm und 60 mm Teilstücken) erhalten wurden, als auch ungekoppelte Monolithen verwendet. Ein besonderes Augenmerk wurde bei den gekoppelten Säulen auf die Art der Kopplungstechnik gelegt, da auch diese einen sehr großen Einfluss auf die Trenneffizienz der Säule hat. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Techniken untersucht. Zusätzlich zur Untersuchung der chromatographischen Parameter wurden auch die Permeabilität und die Beladbarkeit langer Monolithen in dieser Studie bestimmt. Um die chromatographischen Parameter (Peakbreite, Peakkapazität) bestimmen zu können, wurden neben UV-Messungen auch massenspektrometrische Messungen vorgenommen, wobei die Anwendung des ESI-ToF-Massenspektrometers aufgrund der Komplexität der untersuchten Probe (BSA-Thyroglobulin-Verdau) notwendig war. Somit können auch Daten von koeluiierenden Peaks bestimmt werden, die mit reinen UV-Messungen nicht zugänglich wären.

## 2.5.2. Untersuchung verschiedener Säulen-Kopplungstechniken zum Erhalt langer monolithischer Trennsäulen

Wie die Ergebnisse aus Kapitel 2.4.3 und 2.4.4 sowie diverse Veröffentlichungen zu diesem Thema [41,45] gezeigt haben, kann eine signifikante Verbesserung der Trennleistung durch die Verwendung längerer Trennsäulen erreicht werden. Um die geforderten Säulenlängen zu erreichen, können zwei verschiedene Ansätze gewählt werden. Ein Weg zum Erhalt der geforderten Säulenlängen besteht darin, durch direkte Synthese die entsprechende Länge zu erhalten. Wie bereits zu Beginn des Kapitels 2 erwähnt, liegt eines der größten Probleme bei der Synthese langer Monolithen jedoch darin, die Entstehung störender Inhomogenitäten zu verhindern. Das Problem der Inhomogenitäten wird umso größer, je länger die synthetisierte Trennsäule ist. Der größte Vorteil dieses Verfahrens liegt allerdings darin, dass man die Verwendung zusätzlicher Verbindungsstellen, so genannter Unions (vgl. **Abbildung 2.28**), vermeiden kann. Je mehr Verbindungsstellen zum Erhalt einer bestimmten Säulenlänge vorhanden sind, desto größer ist auch dort die Gefahr, durch diese Verbindungsstellen zusätzliche Totvolumina zu schaffen und dadurch die Trenneffizienz der Säule signifikant zu verschlechtern.

Ein zweiter möglicher Ansatz zum Erhalt großer Säulenlängen besteht darin, diese durch Kombination kürzerer Trennsäulen zu erhalten. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass man kürzere und bereits in ihrem Syntheseweg optimierte Trennsäulen verwenden kann, ohne zusätzlichen Aufwand zur Optimierung des Herstellungsprozesses betreiben zu müssen. So ist es auf diese Weise sehr einfach möglich auch sehr lange Trennsäulen (z.B. 45 cm oder 100 cm) durch Kombination kürzerer Teilstücken zu erhalten. Das größte Problem dieser Methode besteht jedoch in der Verbindung der einzelnen Trennsäulen durch so genannte Unions. In nachfolgender **Abbildung 2.28** sind zwei mögliche Verfahren zur Verknüpfung zweier Kapillarsäulen schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.28.** Verfahren zur Verknüpfung zweier Kapillarsäulen mittels Mikroverbindungs-schrauben, Mikroverbindungs-stücken und PEEK Anschluss-hülsen.

Wie aus **Abbildung 2.28** ersichtlich, gibt es prinzipiell zwei verschiedene Methoden, um Kapillarsäulen miteinander zu verknüpfen, die sich lediglich in der Anordnung der Verbindungshülsen (PEEK tubing sleeve) unterscheiden. Um eine möglichst totvolumenfreie Verbindung zwischen den beiden Kapillaren herstellen zu können, ist es jedoch für beide Methoden sehr wichtig, dass die Schnittflächen der beiden Kapillaren möglichst plan sind. Dies kann dadurch erreicht werden, indem die Silika-Kapillaren an ihren Enden mittels eines extrem feinen und genauen Diamantschneiders zugeschnitten werden. Die Verknüpfung der beiden Kapillarenden, die zusätzlich mit einer so genannten Anschluss-hülse (sleeve) umgeben sind, erfolgt mittels eines so genannten „Mikroverbindungsstückes“ (microtight union) und zweier „Mikroschraubverbindungen“ (microtight fittings). Beim Union handelt es sich dabei um ein durchgängiges Röhrchen aus Stahl oder PEEK (inert gegen die verwendeten Laufmittel), das sich zur Mitte hin verengt und an den Enden zwei Schraubgewinde besitzt. Dreht man nun die Kapillaren durch die Fittings in die Schraubgewinde des Unions, so kommt es durch die Verengung des Unions in der Mitte zu einem punktuellen Druckaufbau auf die Kapillarwand, was wiederum dazu führt, dass die Kapillare in der Mitte des Unions fixiert werden. Der Unterschied in den beiden Kopplungsvarianten A und B (**Abbildung 2.28**) besteht nun darin, dass für Variante A jeweils eine Anschluss-hülse pro Kapillare verwandt wurde, während bei Variante B beide Kapillaren durch eine gemeinsame, lange Anschluss-hülse miteinander verbunden wurden. Der Nachteil der Verwendung separater Anschluss-hülsen für beide Kapillaren (Variante A) besteht darin, dass es beim Verschrauben der Kapillaren dazu kommen kann, dass zwar die Enden der beiden Sleeves totvolumenfrei miteinander verbunden sind, zwischen den eigentlich

entscheidenden Kapillaren jedoch eine kleine „Lücke“ besteht, die wiederum dazu führen kann, dass die Trenneffizienz der Säule durch dieses zusätzliche Totvolumen stark beeinträchtigt wird. Um diese Probleme bei der Kopplung zu vermeiden, wurde daher zusätzlich eine Kopplungstechnik getestet, bei der beide Kapillaren von einem einzigen Sleeve umgeben sind (Variante B). Durch diese Methode sollte die Kopplung der beiden Kapillaren vereinfacht und das Auftreten störender zusätzlicher Totvolumina unterbunden werden. Die Unterschiede zwischen beiden Kopplungstechniken wurden anhand zweier gekoppelter 210 mm ( $L_1$  und  $L_2$ ) PS/DVB-Säulen untersucht. Zusätzlich zu diesen 210 mm Monolithen wurden auch gekoppelte Trennsäulen der Länge 120 mm ( $L_3$ ) und 180 mm ( $L_4$ ) untersucht. Bei der Säule  $L_3$  bzw.  $L_4$  handelt es sich um Säulen, die durch Kopplung zweier bzw. dreier 60 x 0.2 mm i.D. „Standard“ PS/DVB-Monolithen hergestellt wurden. Dadurch wurde eine Gesamtlänge von 120 mm für  $L_3$  und eine Gesamtlänge von 180 mm für  $L_4$  erreicht. Um die Länge von 210 mm zu erreichen, wurden bei Säule  $L_1$  und  $L_2$  ein 150 mm und ein 60 mm PS/DVB-Monolith (0.2 mm i.D., Standard-Mischung) miteinander verknüpft. Alle Säulen wurden zunächst mit den gleichen Analyten (P2693, 9er Protein-Mischung und Cytochrom C Verdau) getestet, die bereits zur Untersuchung der 150 mm Monolithen und der kürzeren Teilstücke verwendet wurden. Für alle untersuchten gekoppelten Säulen wurden neben den Peakbasisbreiten vor allem die Peakkapazitäten bestimmt und als Maßstab für die „Qualität“ einer Kopplungsmethode herangezogen. Ein Überblick über die erhaltenen experimentellen Ergebnisse (mit Anwendung des GVK) ist in **Tabelle 2.9** und in **Abbildung 2.29** gegeben. Die entsprechenden Ergebnisse ohne Verwendung des Gradient-Volumen-Konzeptes sind in **Tabelle 2.21** (Anhang) zusammengestellt. Alle Daten wurden mittels eines Ultimate Mikro-HPLC-System gemessen.

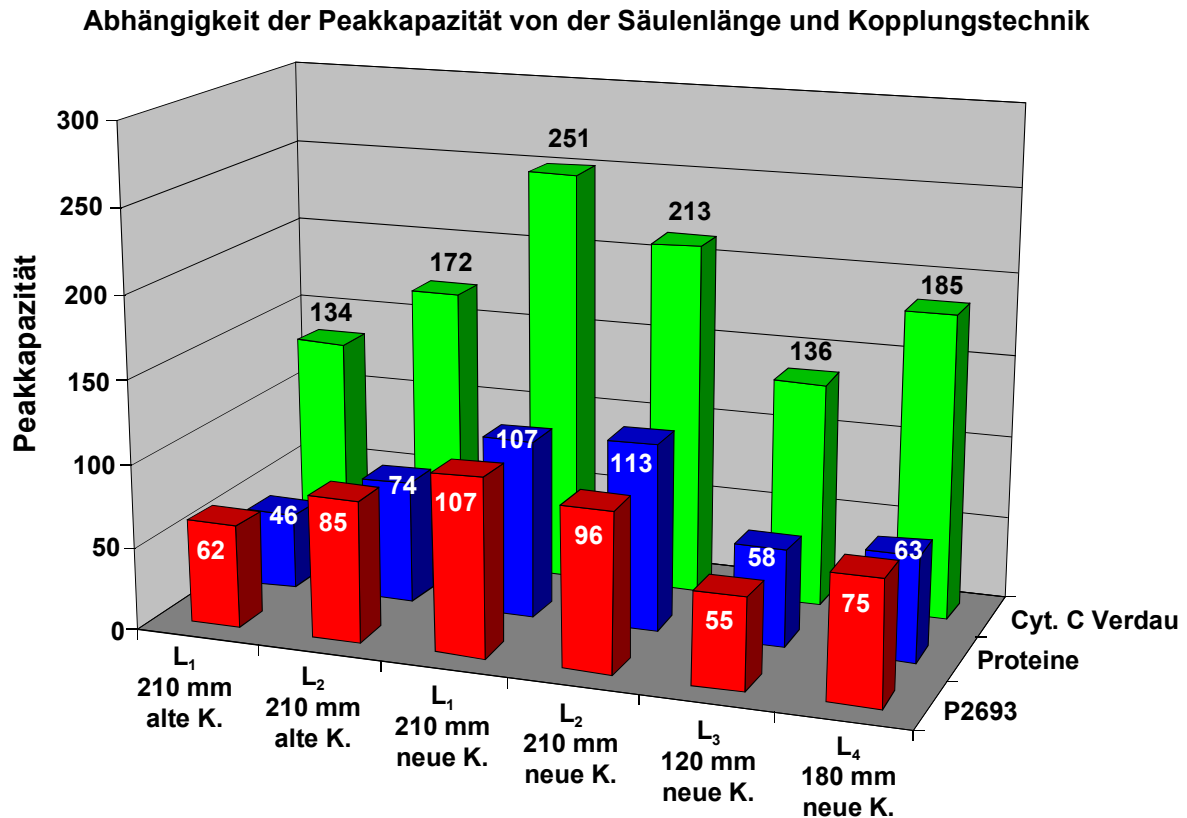
**Tabelle 2.9.** Experimentelle Ergebnisse für die Untersuchung gekoppelter PS/DVB-Monolithen (120-210 mm) mit verschiedenen Kopplungsvarianten (vgl. **Abbildung 2.28**) unter Verwendung eines Ultimate Micro-HPLC-Systems.

<b>Anwendung gekoppelter PS/DVB-Monolithen - mit GVK</b>							
Säule	Länge [mm]	P2693		Proteine		Cyt. C Verdau	
		w <sub>b</sub> mittel [min]	P <sub>mittel</sub>	w <sub>b</sub> mittel [min]	P <sub>mittel</sub>	w <sub>b</sub> mittel [min]	P <sub>mittel</sub>
L <sub>1</sub> , 210 mm - alt	210	0.178	62	0.574	46	0.263	134
L <sub>2</sub> , 210 mm - alt	210	0.125	85	0.353	74	0.205	172
L <sub>1</sub> , 210 mm - neu	210	0.099	107	0.255	107	0.140	251
L <sub>2</sub> , 210 mm - neu	210	0.110	96	0.233	113	0.165	213
L <sub>3</sub> , 120 mm - neu	120	0.112	55	0.260	58	0.148	136
L <sub>4</sub> , 180 mm - neu	180	0.121	75	0.361	63	0.163	185

Wie aus **Tabelle 2.9** und **Abbildung 2.29** ersichtlich, wurden die höchsten Werte für die Peakkapazitäten für den Cytochrom C Verdau erhalten. Weiterhin zeigt diese Abbildung deutlich, dass die Art der Säulenkopplung einen erheblichen Einfluss auf die Trenneffizienz der jeweiligen Säulen hat. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Peakkapazitäten der beiden 210 mm Säulen, die nach Variante B („neue K.“) gekoppelt wurden, mit den Ergebnissen der beiden 210 mm Säulen vergleicht, die nach Variante A („alte K.“) gekoppelt wurden. Während man nach Kopplung B für den Verdau Peakkapazitäten von 251 für Säule L<sub>1</sub> und 213 für Säule L<sub>2</sub> erhält, konnten für Kopplung A lediglich Peakkapazitäten von 134 für L<sub>1</sub> und 172 für L<sub>2</sub> bestimmt werden.

Dies entspricht einer Verbesserung der Peakkapazitäten um 87% für Säule L<sub>1</sub> und 24% für Säule L<sub>2</sub>. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die Proteine mit einer Steigerung von 132% für L<sub>1</sub> (Kopplung A: 46, Kopplung B: 107) und 52% für L<sub>2</sub> (Kopplung A: 74, Kopplung B: 113) sowie für die Peptide des Standards mit einer Steigerung von 73% für L<sub>1</sub> (A: 62, B: 107) und 13% für L<sub>2</sub> (A:85, B:96) erhalten. Besonders deutlich wird der Einfluss der Kopplungstechnik auf die Trenneffizienz der Säule auch, wenn man die Ergebnisse der 210 mm Säulen mit denen der deutlich kürzeren 120 mm bzw. 180 mm Säulen (beide Säulen nach Kopplungsvariante B verbunden) vergleicht. Obwohl die 120 mm Säule um 43 % kürzer ist als die 210 mm Säule (Kopplung A), wurden trotzdem relativ vergleichbare Werte für die Peakkapazitäten erhalten. So konnten für den Verdau auf der 120 mm Säule

Peakkapazitäten von 136 bestimmt werden, während auf den längeren 210 mm Säulen lediglich Werte zwischen 134 für L<sub>1</sub> und 172 für L<sub>2</sub> (Steigerung um ca. 20%) erhalten wurden.



**Abbildung 2.29.** Experimentelle Ergebnisse für die Peakkapazitäten unterschiedlicher Analyten in Abhängigkeit von der Säulenlänge L sowie der verwendeten Kopplungstechnik (Kopplungsvariante A entspricht „alte K.“, Kopplungsvariante B entspricht „neue K.“).

Vergleicht man diese Werte mit denen der Kopplungsvariante B, so konnten dort bei gleicher Länge (210 mm) Peakkapazitäten von 251 für L<sub>1</sub> (Steigerung um 84%) und 213 für L<sub>2</sub> (Steigerung um 57%) erhalten werden. Ähnliche Tendenzen wurden auch für die Proteine und die Peptide des Standards sowie für die Trennungen ohne Anwendung des GVK (Anhang) festgestellt. Aufgrund dieser signifikanten Verbesserung der Ergebnisse durch Kopplungsvariante B wurde diese für alle weiteren Säulenkopplungen verwendet.

Untersucht man den Einfluss der Säulenlänge auf die Peakkapazität (für gekoppelte Säulen nach Variante B) so konnte man auch für die gekoppelten Säulen eine gute



Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie (Zunahme der Peakkapazität um  $\sqrt{m}$  bei Steigerung der Säulenlänge um Faktor  $m$  – vgl. Kapitel 2.4.3 und 2.4.4) festgestellt werden. So führt eine Erhöhung der Säulenlänge von 120 mm auf 180 mm (Faktor 1.5) beim Verdau zu einer Verbesserung der Peakkapazitäten um Faktor 1.36, was einer Abweichung vom theoretischen Werte ( $\sqrt{1.5} = 1.22$ ) von ca. 11% entspricht. Auch für das Verhältnis der 180 mm zur 210 mm Säule (Faktor 1.12) wurde mit einer Steigerung der Peakkapazitäten um Faktor 1.25 (für 210 mm Säulen Mittelwerte gebildet) (theoretisch 1.08) lediglich eine Abweichung von 16% vom theoretischen Erwartungswert erhalten. Ähnlich gute Übereinstimmungen wurden auch für die Proteine (120–180 mm: Abweichung 11%) und die Peptide des Standards (120-180 mm: Abweichung 11%, 180-210 mm: Abweichung 26%) erhalten. Lediglich für die Proteine wurde bei der Steigerung der Säulenlänge von 180 auf 210 mm mit 60% eine sehr hohe Abweichung vom theoretischen Verhalten festgestellt.

### **2.5.3. Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer gekoppelter Säulen auf die Peakbreite und Peakkapazität**

Nach der Bestimmung der idealen Kopplungstechnik für lange PS/DVB-Monolithen wurden nun einige dieser Monolithen (150-210 mm) zur Trennung komplexer Analyten (BSA-Thyroglobulin-Verdau) verwendet. Im ersten Teil dieser Studie wurden zunächst lange Trennsäulen mit Gradientzeiten zwischen 1-3h verwendet. Dadurch sollte neben dem Einfluss der Säulenlänge auf die chromatographischen Parameter auch der Einfluss der Gradientzeit untersucht werden. Da die Peakkapazität ( $P_K$ ) als Quotient aus Gradientdauer ( $t_g$ ) und Peakbasisbreite ( $w_b$ ) definiert ist, sollte eine Erhöhung von  $t_g$  ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf  $P_K$  haben.

Aufgrund der Komplexität der verwendeten Probe und der daraus resultierenden Koelution vieler Analyten wurde in dieser Studie ein Ultimate 3000 Micro-HPLC-System mit Autosampler und UV-Detektor an ein hochauflösendes Micro-Tof-Massenspektrometer der Firma Bruker gekoppelt. Ein Beispiel für die Koelution von vier verschiedenen Analyten des Verdau ist in **Abbildung 2.52** (Anhang) für die

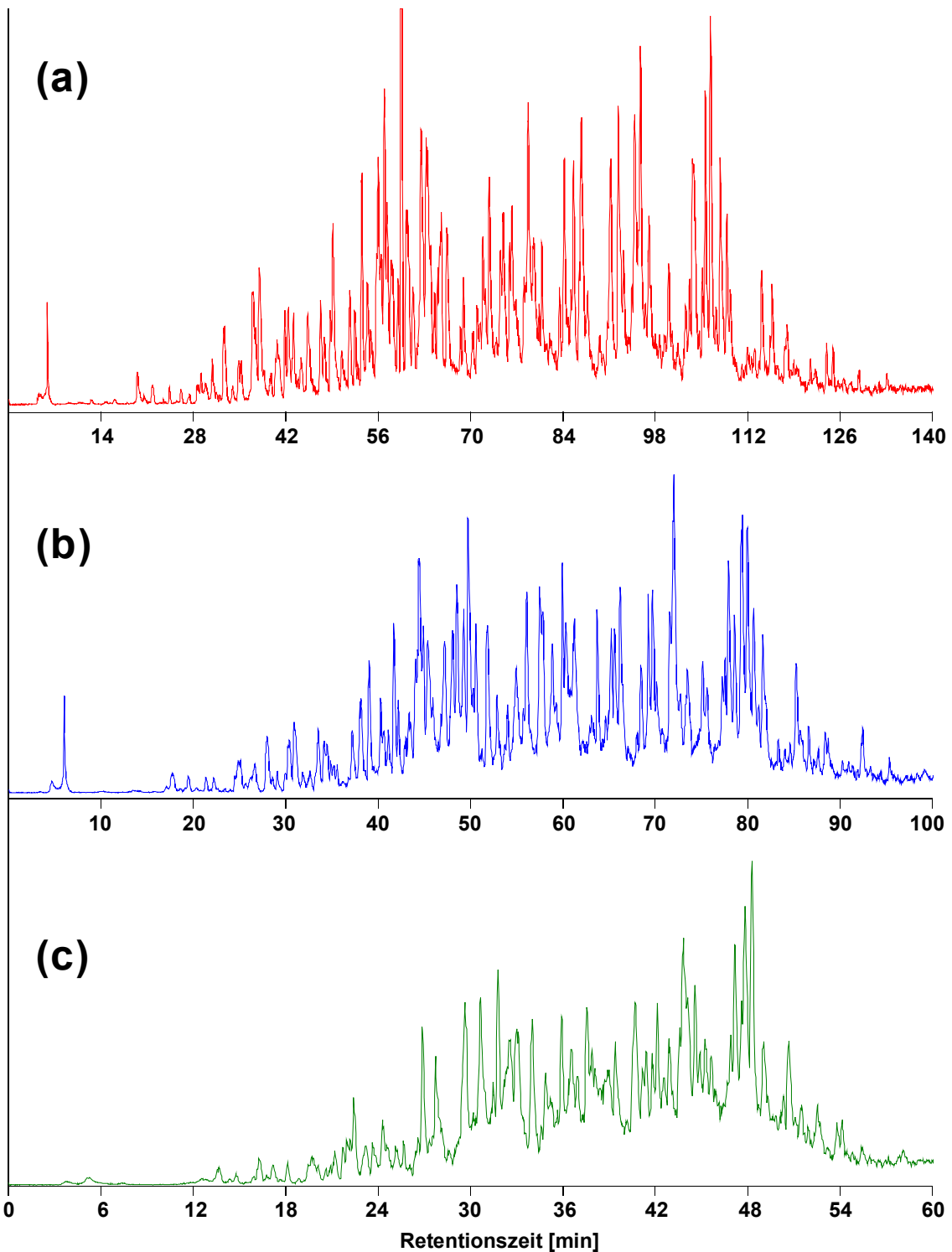
Trennung auf einem gekoppelten 210 mm Monolithen dargestellt. Die für die Berechnung der Peakkapazitäten notwendigen Peakbreiten wurden dabei aus den Daten von 35 Analyten mit einem m/z Verhältnis zwischen 513 und 1142 Da ermittelt. Eine Liste der untersuchten Analyten ist in **Tabelle 2.10** gegeben.

**Tabelle 2.10.** Liste der untersuchten Peptide, mit ihren jeweiligen m/z-Verhältnissen, die für die Ermittlung der Peakbreiten und zur Berechnung der Peakkapazitäten verwendet wurden. Die Daten wurden mittels eines ESI-ToF Massenspektrometers der Firma Bruker gemessen.

m/z Verhältnisse der mittels ESI-ToF untersuchten Peptide					
Nr.	m/z	Nr.	m/z	Nr.	m/z
1	513.69940	13	622.41403	25	886.47614
2	515.70264	14	739.91368	26	916.09329
3	797.04380	15	1004.19975	27	879.46212
4	654.03083	16	831.17763	28	787.02971
5	730.24273	17	962.79478	29	1086.20126
6	873.68672	18	713.96432	30	746.63993
7	643.02517	19	727.43305	31	1031.21693
8	634.00783	20	828.15510	32	831.54790
9	583.28679	21	752.42130	33	813.61738
10	617.64753	22	1004.16761	34	870.72047
11	748.98469	23	726.29068	35	864.35236
12	821.20804	24	1142.34269		

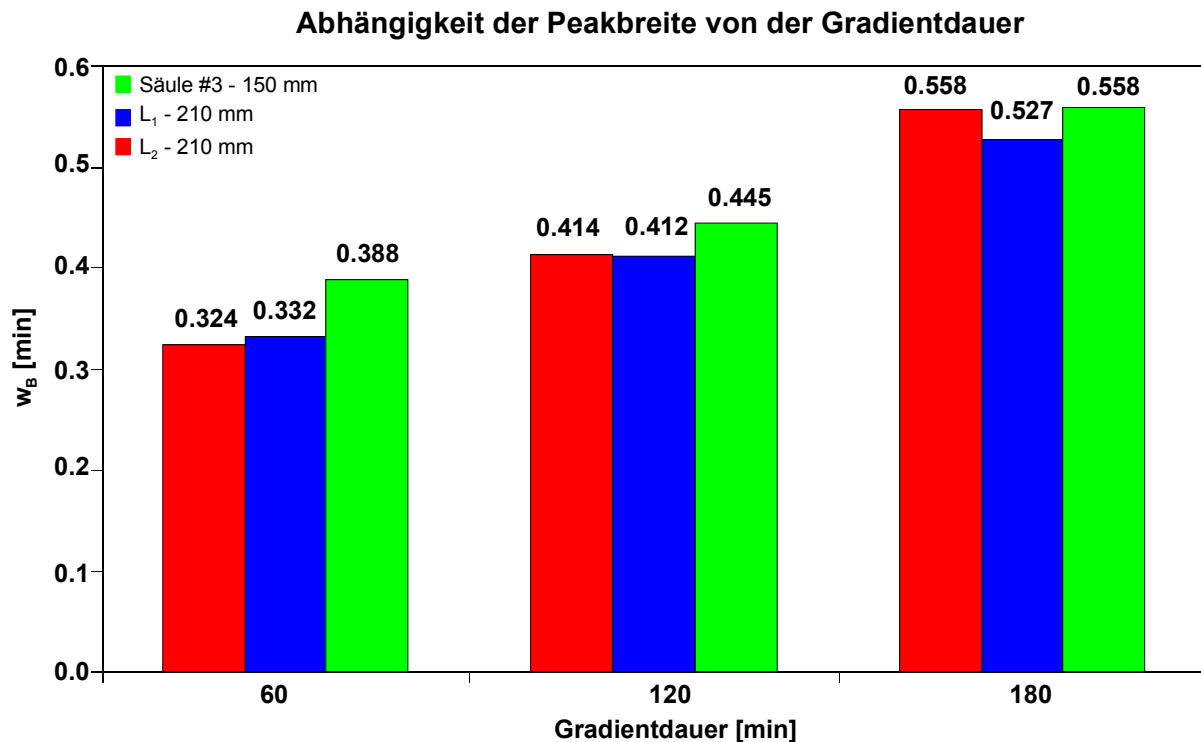
Zur Trennung des komplexen BSA-Thyroglobulin-Verdau wurden im Rahmen dieser Studie zwei gekoppelte 210 mm Monolithen (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>) und ein ungekoppelter 150 mm Monolith verwendet. Für die 210 mm Monolithen wurde dazu ein 150 x 0.2 mm i.D. Monolith mittels Kopplungstechnik B (vgl. Kapitel 2.5.2) mit einem 60 x 0.2 mm i.D. Monolithen kombiniert. Auf allen drei Säulen wurde der Verdau jeweils mit einem linearen Gradienten von 0-60% Acetonitril in 60 min, 120 min und 180 min getrennt, wobei auf jeder Säule drei Wiederholungsmessungen durchgeführt wurden.

Das rekonstruierte Totalionenstromchromatogramm (RTICC) für die Trennung des BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einem 210 mm Monolithen (L<sub>2</sub>) ist in **Abbildung 2.30** dargestellt. Das dazugehörige UV-Chromatogramm ist in **Abbildung 2.53** im Anhang dieses Kapitels abgebildet.



**Abbildung 2.30.** Rekonstruiertes Totalionenstromchromatogramm (RTICC) für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf einer 210 mm Säule (Säule L<sub>2</sub>).

Säule: PS/DVB-Monolith, 210 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% TFA in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: 0-60% ACN in 180 min (a), 120 min (b), 60 min (c); Fluss: 1.5 µl/min; 55°C; Scan: 100-3000 m/z; Trockengas: 4 l/min; Probe: BSA 1.02 pmol/µl, Thyroglobulin: 0.71 pmol/µl; Injektionsvolumen: 1.0 µl.



**Abbildung 2.31.** Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer auf die Peakbreite von 35 ausgewählten Peptiden.

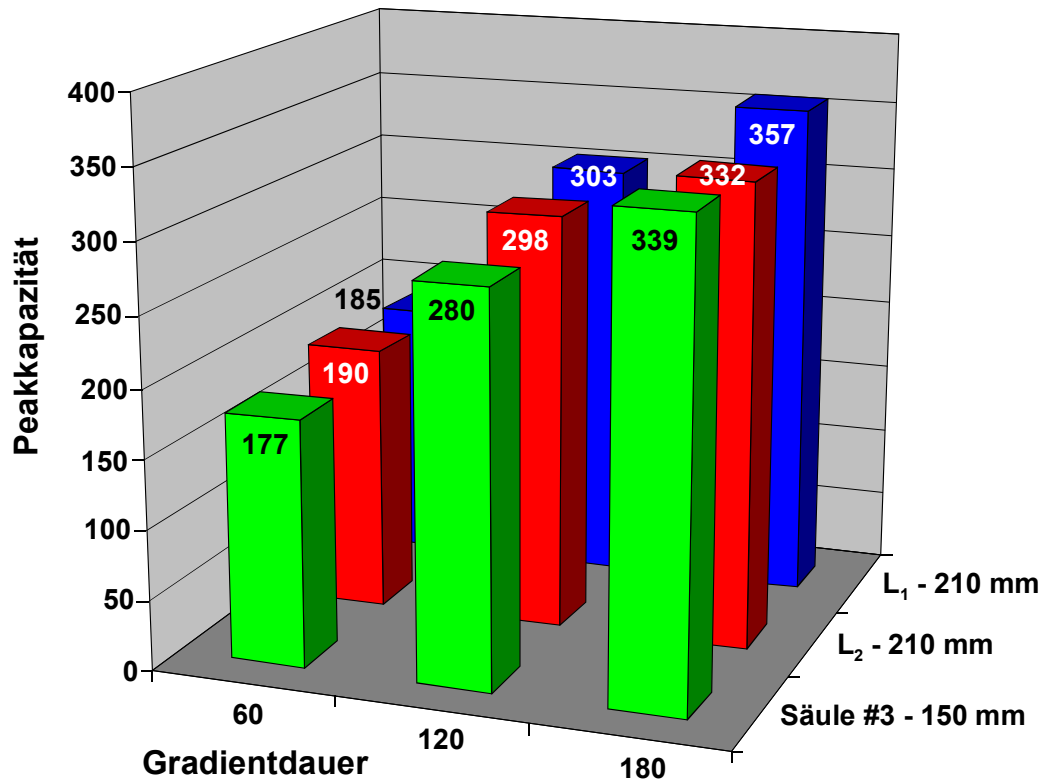
Wie aus **Abbildung 2.30** ersichtlich, konnte die komplexe Probe auf dem 210 mm Monolithen mit einer sehr hohen Auflösung getrennt werden, wobei sich die Auflösung durch die Erhöhung der Gradientdauer von 1h (c) auf 3h (a) noch erheblich verbesserte. Weiterhin ist aus RTICC und dem UV-Chromatogramm ersichtlich, dass die 210 mm Säule in der Lage ist, sehr schmale und scharfe Peaks zu generieren, was auf eine hohe Trennleistung schließen lässt. Um den Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer auf die Peakbasisbreite beurteilen zu können, wurden 35 Peptide untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse für die drei Säulen und drei Gradientenzeiten sind in **Abbildung 2.31** dargestellt.

Wie aus **Abbildung 2.31** ersichtlich, wurde für eine Gradientdauer von 60 min für die 150 mm Säule eine mittlere Peakbasisbreite (Mittelwert der Peakbreiten aller 35 Peptide) von 0.388 min erhalten, während die längeren 210 mm Monolithen bei 60 min nur eine Peakbreite von 0.332 min für L<sub>1</sub> und 0.324 min für L<sub>2</sub> generierten.

Damit unterscheiden sich die Peakbreiten für die beiden langen Säulen um lediglich 2%. Daher wurde für die weiteren Betrachtungen der Mittelwert aus beiden Säulen verwendet (Mittelwert L<sub>1</sub> und L<sub>2</sub>: 0.328 min). Erhöht man die Gradientdauer von 60

min auf 120 min, so führt diese zu einer Erhöhung der Peakbreiten von 0.388 min (60 min) auf 0.445 min (120 min) für den 150 mm Monolithen und von 0.328 min (60 min) auf 0.413 min (120 min) für die beiden 210 mm Säulen. Somit resultiert eine Steigerung der Trennzeit um Faktor 2 in einer Zunahme der Peakbreiten um Faktor 1.15 für die 150 mm Säule und Faktor 1.26 für die 210 mm Säulen. Legt man auch für den Einfluss der Gradientdauer auf die Peakbreiten eine  $\sqrt{m}$  Abhängigkeit ( $m$  = Faktor der Gradientserhöhung) zu Grunde, so ergibt sich für die 150 mm Säule eine Abweichung von ca. 19% (erwartet  $\sqrt{2}$ ) vom erwarteten Wert und für die beiden 210 mm Säulen eine Abweichung von ca. 11%. Steigert man die Gradientdauer von 60 min auf 180 min (Faktor 3), so führt dies zu einer Erhöhung der Peakbreite von 0.328 min auf 0.558 min für den 150 mm Monolithen und von 0.328 min auf 0.543 min für die 210 mm Säulen. Dies entspricht einer Zunahme um Faktor 1.44 für die 150 mm und um Faktor 1.66 für die beiden 210 mm Säulen. Somit ergibt sich für die Verdreifachung der Gradientenzeit (Faktor  $\sqrt{3} = 1.73$ ) eine Abweichung von ca. 17% für den 150 mm Monolithen und ca. 4.5% für die beiden 210 mm Säulen. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann somit ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen Gradientdauer und Peakbreite festgestellt werden, wie dies auch bereits für den Zusammenhang zwischen Säulenlänge und Peakbreite beobachtet wurde.

Die Ergebnisse für die aus den Peakbasisbreiten berechneten Peakkapazitäten sind in **Abbildung 2.32** dargestellt.



**Abbildung 2.32.** Berechnete Peakbreiten für eine 150 mm und zwei 210 mm Säulen sowie Gradientenzeiten von 60 min, 120 min und 180 min.

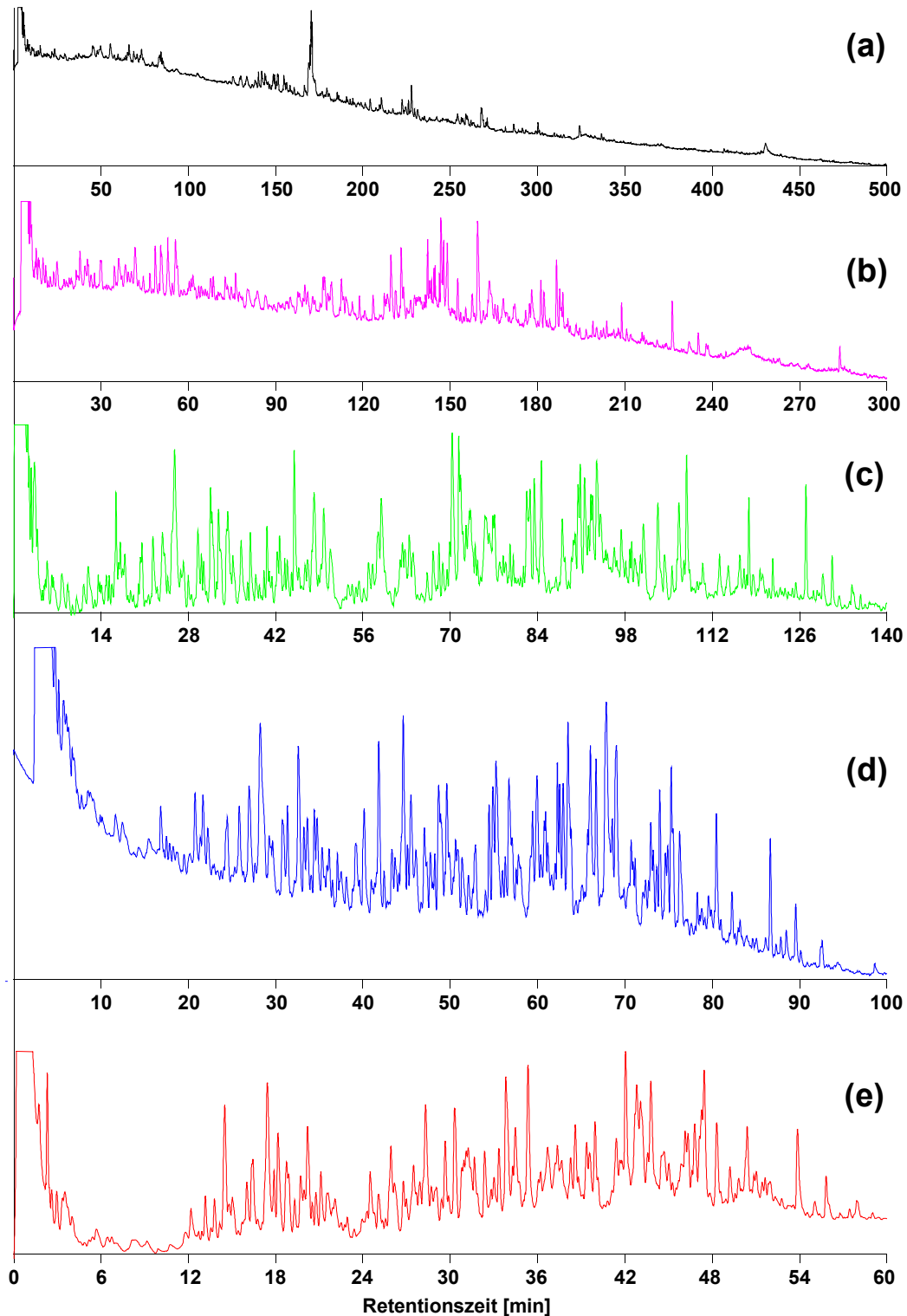
**Abbildung 2.32** zeigt, dass die höchsten Peakkapazitäten (Mittelwert aus  $L_1$  und  $L_2 = 345$ ) mit den längsten Säulen und den längsten Trennzeiten erhalten wurden. Weiterhin geht jedoch aus dieser Abbildung deutlich hervor, dass sich die Peakkapazitäten der gekoppelten 210 mm Säulen nur geringfügig von denen des ungekoppelten 150 mm Monolithen unterscheiden. Trotz einer Längendifferenz von 40% konnten auf den 210 mm Säulen lediglich Peakkapazitäten erhalten werden, die um ca. 2% über denen des 150 mm Monolithen lagen. Ein vergleichbarer Trend wurde auch für den 60 min und den 120 min Gradienten beobachtet (Steigerung um 6.2% für 60 min und 7.5% für 120 min). Dieses Ergebnis kann so gedeutet werden, dass die Kopplung, trotz ihrer Verbesserung, zu einer signifikanten Verschlechterung der Trenneffizienz der Säule führt. Daher wurden für die weiteren Studien ausschließlich ungekoppelte lange Trennsäulen (150-300 mm) verwendet. Die Ergebnisse dieser Studien werden im folgenden Kapitel näher behandelt.

Wie aus **Abbildung 2.32** ersichtlich, wurde für den 60 min Gradienten auf der 150 mm Säule eine Peakkapazität von 177 und für die beiden 210 mm Säulen eine Peakkapazität von 188 (Mittelwert) berechnet. Erhöht man die Analysenzeit von 60

min auf 120 min so werden für den 150 mm Monolithen Peakkapazitäten von 280 und für die 210 mm Säulen Werte von 301 erhalten. Die Verdopplung der Trennzeit führt also in einer Erhöhung der Kapazitäten für den 150 mm Monolithen um Faktor 1.58 und für die 210 mm Monolithen um Faktor 1.6. Dies entspricht einer Abweichung von 12% für die kurze und von 13% für die langen Trennsäulen ( $\sqrt{m}$  Beziehung). Noch bessere Übereinstimmungen zwischen Theorie und Experiment werden für die Verdreifachung der Gradientdauer erhalten. Diese führt zu einer Erhöhung der Peakkapazitäten von 177 auf 339 für den 150 mm Monolithen und von 188 auf 345 für die beiden 210 mm Säulen. Somit resultiert aus einer Erhöhung der Trennzeit um Faktor 3 eine Verbesserung der Peakkapazitäten um Faktor 1.9 (Abweichung 9.7%) für den 150 mm Monolithen und Faktor 1.84 (Abweichung 6.2%) für die 210 mm Säulen.

Wie aus den Ergebnissen dieser Untersuchung ersichtlich, besteht kein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Gradientdauer und den Peakbreiten. Vielmehr konnte auch für den Zusammenhang zwischen  $t_g$  und  $w_b$  eine „ $\sqrt{m}$ -Beziehung“ hergeleitet werden. Dies bedeutet, dass eine Erhöhung der Gradientdauer um Faktor  $m$  zu einem Anstieg der Peakbasisbreite um Faktor  $\sqrt{m}$  führt. Daraus kann geschlossen werden, dass durch Erhöhung der Trennzeit eine erhebliche Verbesserung der Peakkapazitäten erreicht werden kann.

Um die Richtigkeit dieser Theorie auch für sehr lange Gradienten (bis 9h) zu überprüfen, wurde zunächst der komplexe BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einem gekoppelten 210 mm Monolithen mittels UV-Detektion untersucht.



**Abbildung 2.33.** UV-Chromatogramm für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einer 210 mm Säule (Säule L<sub>2</sub>).

Säule: PS/DVB-Monolith, 210 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% TFA in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: 0-60% ACN in 540 min (a), 360 min (b), 180 min (c), 120 min (d), 60 min (e); Fluss: 1.5 µl/min; 55°C; Probe: BSA 1.02 pmol/µl, Thyroglobulin: 0.71 pmol/µl; Injektionsvolumen: 1.0 µl.



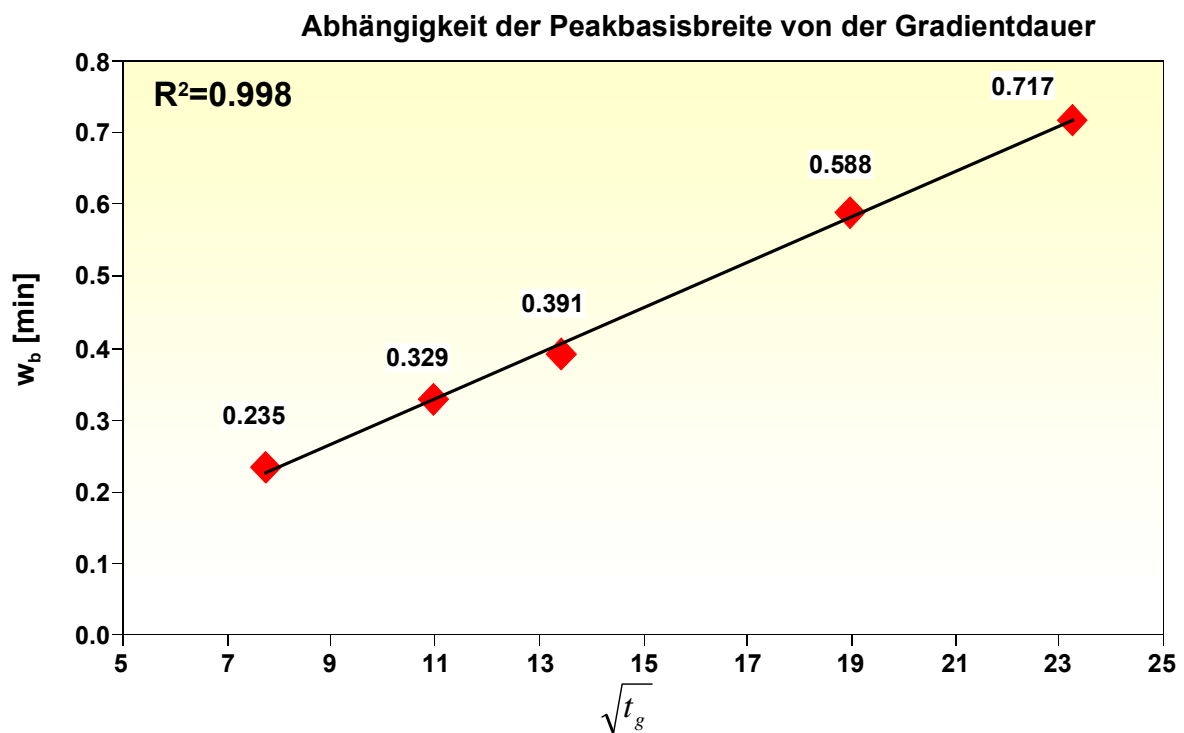
In **Abbildung 2.33** ist das UV-Chromatogramm der Trennung des Verdaus bei unterschiedlichen Gradientenzeiten (1h, 2h, 3h, 6h und 9h) dargestellt. Für jede Gradientendauer wurden jeweils 2 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse für die jeweiligen Messungen sowie die daraus berechneten Peakkapazitäten sind in **Tabelle 2.11** sowie **Abbildung 2.34** und **Abbildung 2.35** dargestellt. Durch Verbesserung des experimentellen Setups des Ultimate 3000 Systems (kürzere Kapillare mit kleineren Innendurchmessern vom Kalibrator zum Injektor und vom Injektor zur Säule) könnten die experimentellen Ergebnisse im Vergleich zu früheren Messungen (1-3h Gradienten) nochmals signifikant verbessert werden.

**Tabelle 2.11.** Experimentelle Ergebnisse der Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus (2 Wiederholungsmessungen, 90-190 Peptide) auf einem gekoppelten 210 mm Monolithen mit Gradientenzeiten zwischen 1-9h. Daten wurden aus UV-Messungen bestimmt.

$t_g$ [min]	$w_{b, \text{Mess. 1+2}}$ [min]	$P_K$	$w_{b, \text{mittel}}$ [min]	$P_{K, \text{mittel}}$
60	0.226	266	<b>0.235</b>	<b>257</b>
	0.243	248		
120	0.338	356	<b>0.329</b>	<b>366</b>
	0.319	377		
180	0.398	453	<b>0.391</b>	<b>462</b>
	0.383	471		
360	0.590	611	<b>0.588</b>	<b>613</b>
	0.586	616		
540	0.674	803	<b>0.717</b>	<b>756</b>
	0.761	710		

Wie aus **Tabelle 2.11** und **Abbildung 2.34** ersichtlich, wurde für die verschiedenen Trennungen eine hervorragende Übereinstimmung zwischen experimentellen und erwarteten Werten erhalten ( $R^2=0.998$ ). Verdoppelt man die Gradientzeit von 60 min auf 120 min, so ergibt dies eine Steigerung der Peakbasisbreite von 0.235 min (Mittelwert aus 2 Messungen) auf 0.329 min. Dies entspricht einer Erhöhung um Faktor 1.4 und somit eine Abweichung vom erwarteten Wert (1.4142) von ca. 1%. Ähnlich hervorragende Übereinstimmungen konnten auch für die restlichen Messwerte erhalten werden. So führt die Verdreifachung der Analysenzeit von 60 min auf 180 min zu einer Erhöhung der Peakbreiten von 0.235 min auf 0.391 min,

was einem Faktor von 1.66 (erwartet 1.732, Abweichung ca. 4.3%) entspricht. Für die Anhebung der Gradientzeit um Faktor 6 (360 min Gradient) wurde eine Erhöhung von  $w_b$  um Faktor 2.45 (erwartet 2.5, Abweichung ca. 2%) und für die Erhöhung der Analysenzeit um Faktor 9 (540 min) eine Erhöhung um Faktor 3.05 (erwartet 3.0, Abweichung ca. 1.7%) erhalten.

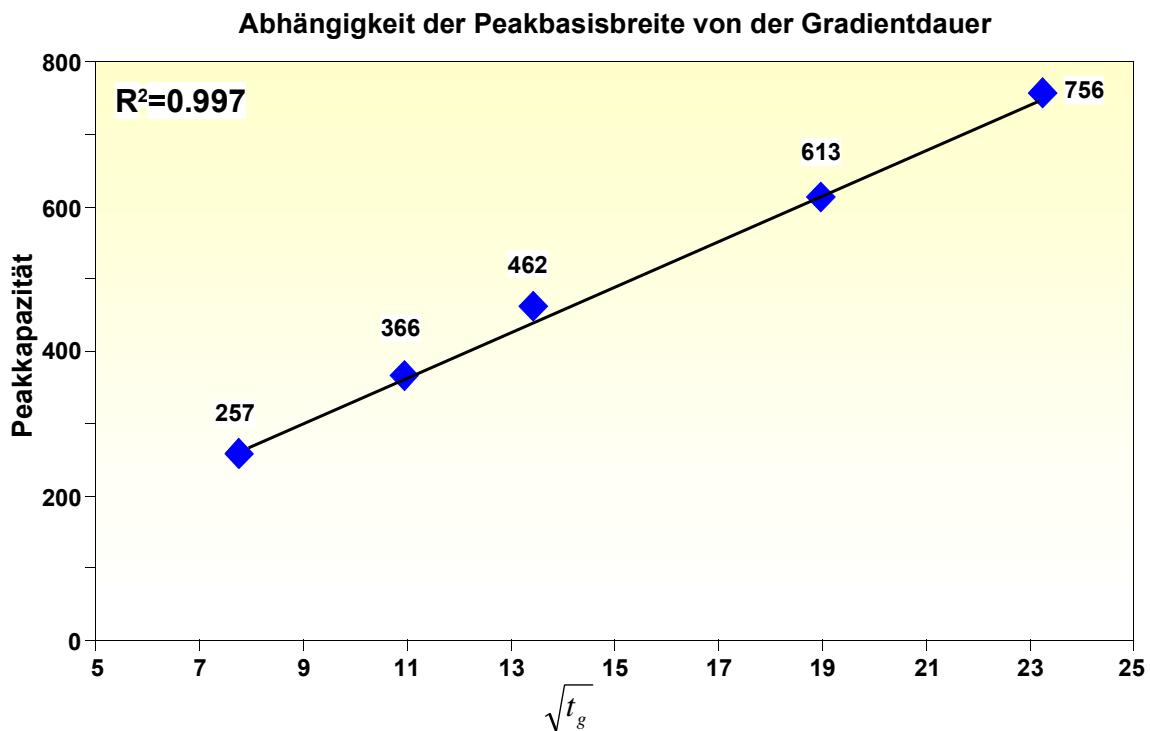


**Abbildung 2.34.** Abhängigkeit der Peakbasisbreite von der Gradientdauer. Peakbreiten wurden aus den UV-Messungen (2 Wiederholungsmessungen) auf einem gekoppelten 210 mm Monolithen bestimmt.

Eine ähnlich gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment wurde auch für die Peakkapazitäten erhalten. Die grafische Darstellung der Abhängigkeit der Peakkapazität von der Gradientdauer ist in **Abbildung 2.35** gegeben ( $R^2$ ).

Die höchsten Peakkapazitäten wurden mit 756 für den gekoppelten 210 mm Monolithen mit einer Analysenzeit von 9h erhalten, während mit einer Gradientzeit von 60 min lediglich eine Peakkapazität von 257 erhalten wurde. Verdoppelt man die Trennzeit von 60 min auf 120 min, so führt dies zu einem Anstieg der Peakkapazität um Faktor 1.42, was fast exakt dem erwarteten Wert entspricht. Verdreifacht man die Zeit auf 180 min, so erhöht sich die Peakkapazität von 257 auf 366, was einer Erhöhung um Faktor 1.8 (erwartet 1.732, Abweichung 3.8%) entspricht. Auch für die

Erhöhung der Gradientzeit um Faktor 6 wurde mit einer Erhöhung von 257 auf 613 eine sehr gute Übereinstimmung zwischen erwartetem und berechnetem Wert erhalten (Abweichung 2.6%). Auch für den 9h Gradienten (Erhöhung um Faktor 9) wurde mit einer Abweichung von ca. 2% eine sehr gute Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert erhalten.



**Abbildung 2.35.** Aus UV-Daten berechnete Peakkapazitäten für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf einem gekoppelten 210 mm Monolithen mit Analysenzeiten zwischen 1h und 9h.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann gefolgert werden, dass eine Erhöhung der Gradientzeit um Faktor  $m$  nicht zu einem proportionalen Anstieg der Peakbreiten führt, sondern sich diese Erhöhung lediglich um Faktor  $\sqrt{m}$  auswirkt. Der gleiche Zusammenhang wurde auch zwischen Gradientdauer und Peakkapazitäten erhalten. Somit kann gefolgert werden, dass durch eine Erhöhung der Analysenzeit ( $t_g$ ) eine signifikante Verbesserung der Peakkapazitäten erreicht werden kann.

Aufgrund dieser Abhängigkeit von  $P_K$  von  $t_g$  kann also durch Erhöhung der Gradientzeit um Faktor  $m$  eine Verbesserung von  $P_K$  um  $\sqrt{m}$  erhalten werden, jedoch ist auch der Verbesserung der Peakkapazitäten durch eine Erhöhung der Gradientzeiten eine bestimmte Grenze gesetzt. Erhöht man z.B. die Analysendauer

um Faktor 20, so kann dadurch lediglich eine Steigerung der Peakkapazitäten um  $\sqrt{20}$  (4.47) erzielt werden. Somit ist auch für die Verbesserung der Peakkapazitäten durch Erhöhung der Gradientdauer eine experimentelle Grenze gesetzt. Um eine weitere Verbesserung der Trenneffizienzen (Peakkapazitäten) der Säulen zu erreichen, wurden für die nachfolgenden Studien noch längere und ungekoppelte Säulen (250-300 mm) verwendet. Dadurch sollte versucht werden, eine Peakkapazität von 1000 zu erreichen.

### **2.5.4. Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer ungekoppelter Säulen auf die chromatographischen Parameter $P_K$ und $w_b$**

Aufbauend auf den Ergebnissen aus Kapitel 2.5.2 und 2.5.3 wurde im Rahmen dieser Studie der Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer auf die chromatographischen Parameter der Peakbreite und Peakkapazitäten untersucht. Im Gegensatz zu den früheren Studien wurden in dieser Arbeit lange, ungekoppelte PS/DVB-Monolithen verwendet. Dadurch sollte versucht werden, die Trenneffizienz der Säulen nochmals signifikant zu steigern, um dadurch Peakkapazitäten von ca. 1000 zu erreichen. Dazu wurde ein Ultimate 3000 Mikro-HPLC-System mit UV-Detektor sowie ein Bruker MicroToF-Massenspektrometer verwendet. Es wurden insgesamt 6 verschiedene Säulen mit Längen zwischen 150-250 x 0.2 mm i.D. untersucht, wobei sowohl UV- als auch MS-Daten gemessen wurden. Die nachfolgende **Tabelle 2.12** gibt einen Überblick über die untersuchten Säulen sowie die dazu verwendeten Detektionsmethoden.

Um den Einfluss der Gradientdauer untersuchen zu können, wurde, wie bereits in Kapitel 2.5.3 für gekoppelte Säulen, auch in dieser Studie ein komplexer BSA-Thyroglobulin-Verdau mit verschiedenen Gradienten (1h-9h) chromatographiert. Anhand der UV- und MS-Daten wurden anschließend die relevanten Parameter (Peakbasisbreite) bestimmt und die Peakkapazitäten berechnet. Zusätzlich zur Untersuchung der Peakbreiten und Peakkapazitäten wurde für eine 150 mm und

eine 250 mm Säule die Beladbarkeit anhand des BSA-Thyroglobulin-Verdaus sowie des P2693 Peptid-Standards bestimmt.

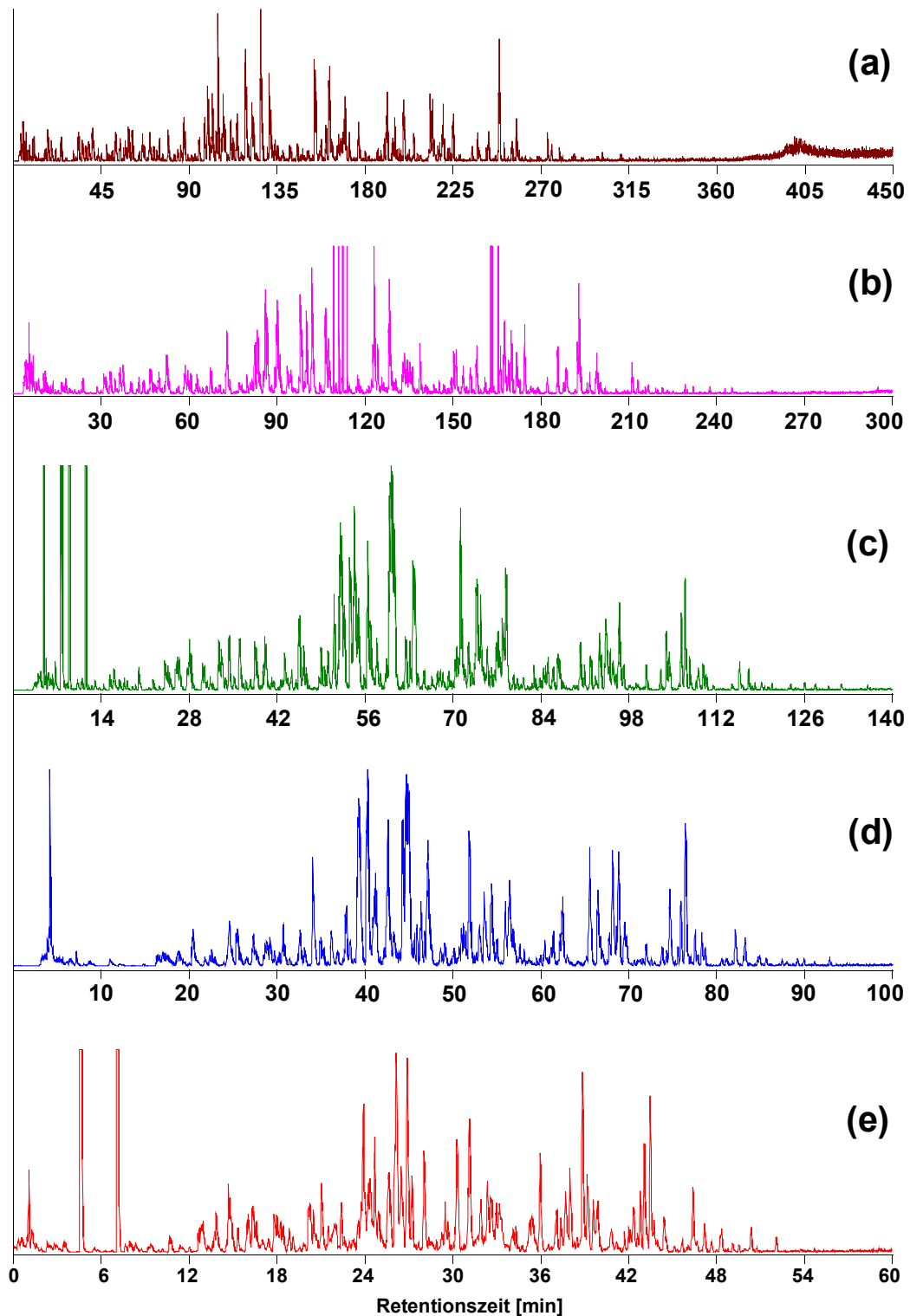
**Tabelle 2.12.** Untersuchte Säulenlängen sowie dazu verwendete Detektionsmethoden für die Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge und Gradientdauer auf die Peakbreiten und Peakkapazitäten.

Nr.	Säulenbezeichnung	Länge [mm]	Detektionsmethode	
			UV	MS
1	27-12-2005 # 1	150	X	X
2	27-12-2005 # 2	150	X	
3	27-12-2005 # 1	210	X	
4	27-12-2005 # 2	210	X	X
5	27-12-2005 # 1	250	X	X
6	27-12-2005 # 2	250	X	

Exemplarisch für die Ergebnisse mit verschiedenen Trennsäulen ist in **Abbildung 2.36** das Rekonstruierte Totalionenstrom-Chromatogramm (RTICC) für die Trennung des komplexen Verdaus auf einem 210 x 0.2 mm i.D. ungekoppelten PS/DVB-Monolithen, mit Gradienten zwischen 60-540 min dargestellt. Ein Überblick über alle erhaltenen Messergebnisse (Peakbreiten und daraus berechneten Peakkapazitäten) ist in **Tabelle 2.22** (Anhang) gegeben.

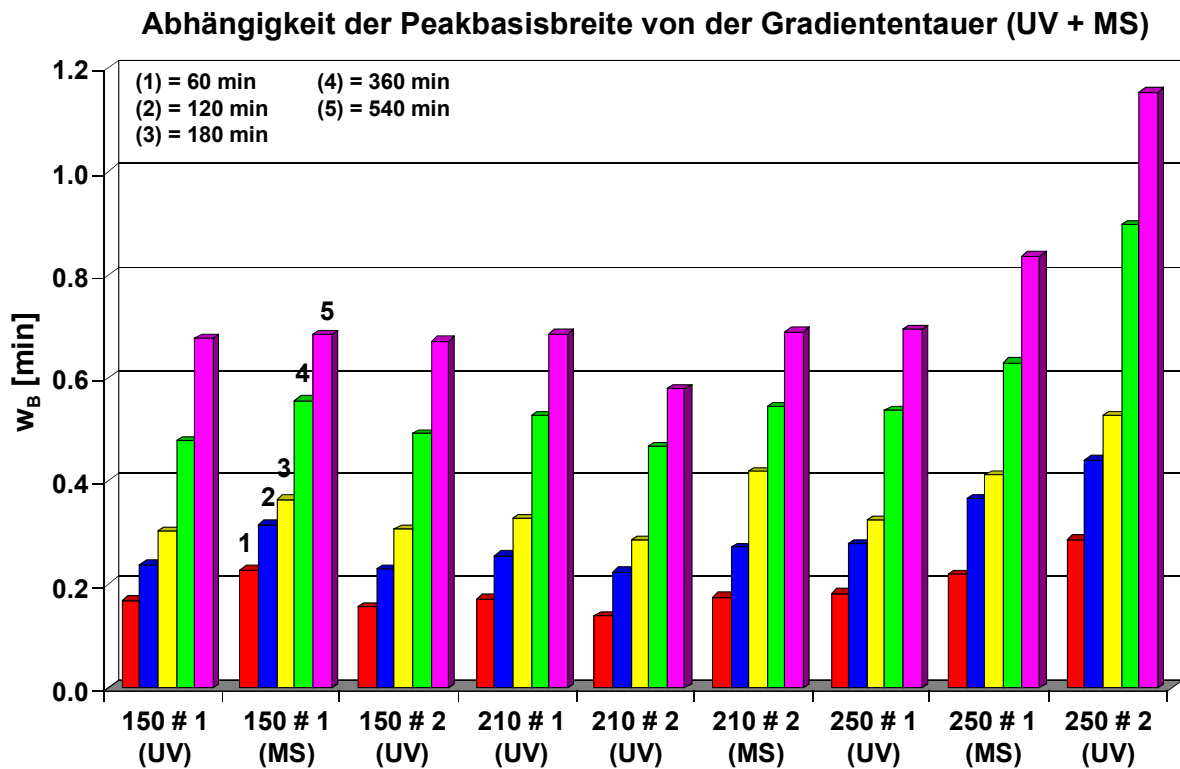
Wie aus **Abbildung 2.36** und **Tabelle 2.22** ersichtlich, konnten für die Trennung des Verdaus auf der verwendeten 210 mm Trennsäule für alle Gradientenzeiten sehr gute Trenneffizienzen erhalten werden. Für alle Trennbedingungen wurden scharfe Peaks mit kleinen Peakbreiten sowie hohen Peakkapazitäten erhalten.

Ein Überblick über die erhaltenen experimentellen Ergebnisse ist in **Abbildung 2.37** für die Abhängigkeit der Peakbasisbreiten von der Säulenlänge und Gradientdauer und in **Abbildung 2.39** für die daraus berechneten Peakkapazitäten gegeben.



**Abbildung 2.36.** Rekonstruiertes Totalionenstromchromatogramm (RTICC) für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einer 210 mm Säule.

Säule: PS/DVB-Monolith, 210 x 0.2 mm i.D.; (A) 0.05% TFA in Wasser, (B) A+80% ACN; Gradient: 0-60% ACN in 540 min (a), 360 min (b), 180 min (c), 120 min (d), 60 min (e); Fluss: 1.1  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; 55°C; Scan: 100-3000 m/z; Trockengas: 4 l/min; Probe: BSA 1.02 pmol/ $\mu\text{l}$ , Thyroglobulin: 0.71 pmol/ $\mu\text{l}$ ; Injektionsvolumen: 1.0  $\mu\text{l}$ .



**Abbildung 2.37.** Abhängigkeit der Peakbreite von der Säulenlänge und Gradientdauer für die Trennung eines komplexen BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf verschiedenen PS/DVB-Monolithen.

Wie aus **Abbildung 2.37** ersichtlich, wurden die niedrigsten Peakbasisbreiten auf der 210 mm Säule #2 und die schlechtesten Werte für die 250 mm Säule #2 erhalten. Mit Ausnahme dieser beiden Trennsäulen sowie der leicht erhöhten Werte für Säule 250#1 (MS-Daten) wurden ansonsten auf allen Trennsäulen, unabhängig von der jeweiligen Säulenlänge, vergleichbare Peakbreiten bestimmt. Wie aus dieser Darstellung ersichtlich, hat lediglich die Analysenzeit (Gradientdauer) einen signifikanten Einfluss auf die Peakverbreiterung, während die eigentliche Säulenlänge weitgehend vernachlässigt werden kann. So wurde z.B. aus den UV-Daten für die 150 mm Säule (150 #1) eine mittlere Peakbasisbreite von 0.169 min (jeweils 2 Wiederholungsmessungen pro Säule), für die 210 mm Säule (210 #1) eine Peakbasisbreite von 0.172 min und für die 250 mm Säule (250 #1) ein Wert von 0.184 min bestimmt. Somit ergeben sich für die im Vergleich zur 150 mm Säule um ca. 66% längere 250 mm Trennsäule lediglich um ca. 9% höhere Peakbreiten. Vergleicht man weiterhin die aus UV- und MS-Daten erhaltenen Werte für die

Peakbreiten, so ergeben sich auch dort weitgehend vergleichbare Ergebnisse für die Peakbreiten. So stimmten diese für die 150 mm Säule #1 sehr gut überein, während sich für die 210 mm Säule #1 sowie für die 250 mm Säule #1 leicht höhere Werte durch die MS-Auswertung erhalten wurden. Dies zeigt, dass sowohl die UV- als auch die MS-Daten für eine verlässliche Charakterisierung der Trennsäulen herangezogen werden können. Dieses Ergebnis ist sehr wichtig, da es für die Generierung der MS-Daten eines deutlich höheren experimentellen Aufwandes bedarf und weiterhin für die MS-Untersuchungen sehr große Datenmengen (ca. 40 GB für eine 540 min Trennung) anfallen.

Um den Einfluss der Gradientdauer auf die Peakbasisbreiten für ungekoppelte Trennsäulen zu untersuchen, wurde auch hier, wie bereits in früheren Untersuchungen durchgeführt, das Verhältnis der Peakbreiten für Gradientzeit A zu Gradientzeit B (z.B.  $w_b$  120 min /  $w_b$  60 min) bestimmt. In nachfolgender **Tabelle 2.13** sind die berechneten Verhältnisse für alle Säulen, Trennzeiten und Detektionsmethoden zusammengestellt.

**Tabelle 2.13.** Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge und Gradientzeit auf die Peakbasisbreite. Dazu wurde das Verhältnis zwischen den Peakbasisbreiten von Gradientdauer A zu Gradientdauer B untersucht (Erwartungswerte: 120/60 min=1.41, 180/60 min=1.72, 360/60 min=2.45 und 540/60 min=3.00).

Säule	Verhältnis Peakbasisbreiten (Grad. A / Grad. B)			
	120/60 min	180/60 min	360/60 min	540/60 min
150 #1 (UV)	1.4	1.8	2.8	4.0
150 #1 (MS)	1.4	1.68	2.4	3.0
150 #2 (UV)	1.5	2.0	3.1	4.3
210 #1 (UV)	1.5	1.9	3.1	4.0
210 #2 (UV)	1.6	2.0	3.3	4.1
210 #2 (MS)	1.5	2.4	3.1	3.9
250 #1 (UV)	1.5	1.8	2.9	3.8
250 #1 (MS)	1.7	1.9	2.9	3.8
250 #2 (UV)	1.5	1.8	3.1	4.0

Wie aus **Tabelle 2.13** ersichtlich, wurde für die Erhöhung der Gradientzeit von 60 min auf 120 min für nahezu alle Säulen und Detektionsmethoden eine gute Übereinstimmung zwischen theoretischem und experimentellem Wert erhalten. Die besten Übereinstimmungen wurden mit Abweichungen zwischen 0% für Säule 150 #1 (UV), mit 2.5% für Säule 150 #1 (MS), mit 3.9% für Säule 150 #2 (UV) und für

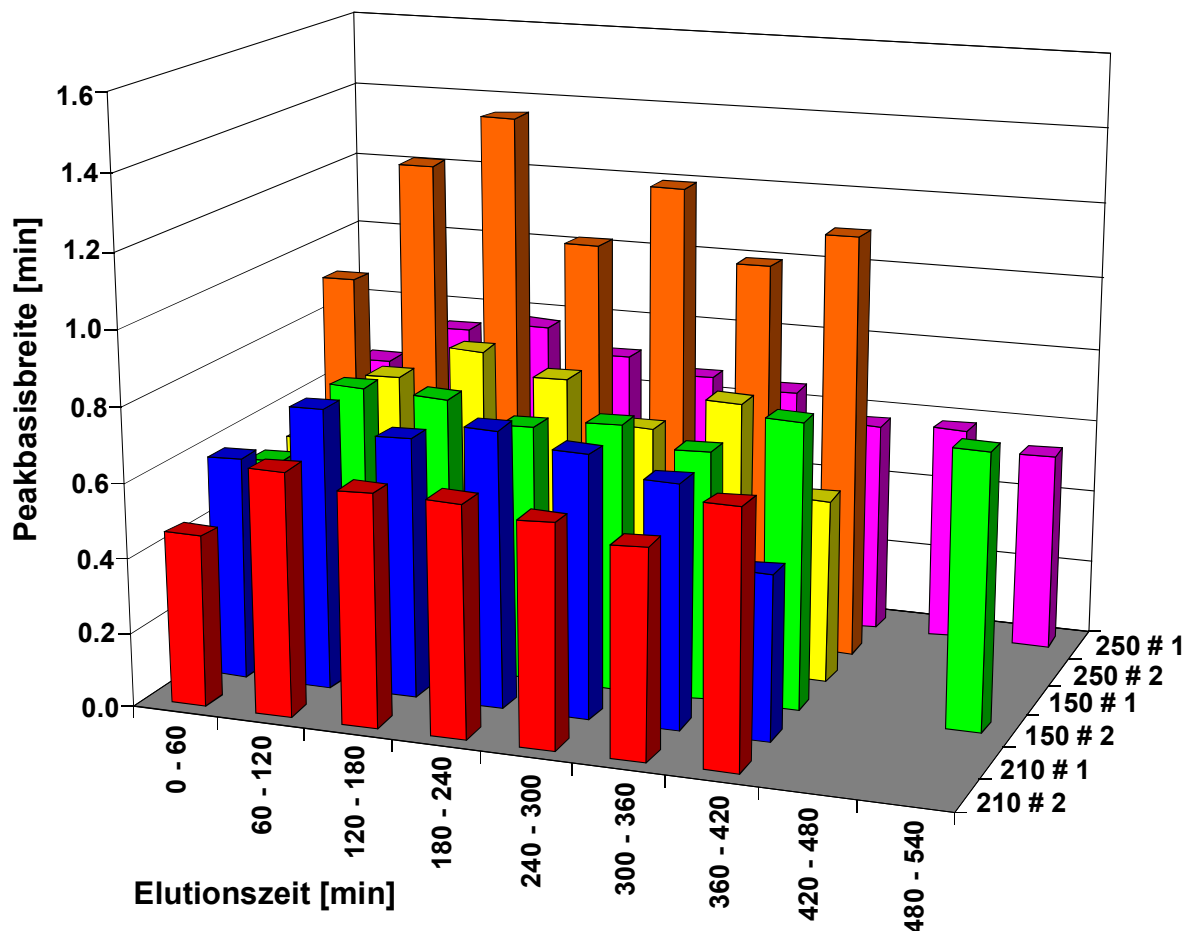


4.6% für Säule 210 #1 (UV) erhalten. Die höchsten Abweichungen ergaben sich für die 250 mm Säule #1 (MS) mit 18% und für die 210 mm Säule #2 (UV) mit 13%, wobei jedoch auch diese Abweichungen noch als gute Übereinstimmung mit den Erwartungswerten angesehen werden können. Im Vergleich dieser sehr guten Übereinstimmung zwischen experimentellen und erwarteten Werten, ergaben sich für die anderen untersuchten Trennzeiten (180 min, 360 min und 540 min) etwas schlechtere Übereinstimmungen. So ergaben sich für die Verdreifachung der Gradientzeit von 60 min auf 180 min die besten Übereinstimmungen für Säule 150 #1 (UV) und 250 #1 (UV) mit Abweichungen zwischen 3.3% und 1.6% während die schlechtesten Ergebnisse für Säule 210 #2 (UV) und 210 #2 (MS) mit Abweichungen von 17.7% und 37.4% erhalten wurden. Die schlechtesten Übereinstimmungen zwischen experimentellen und erwarteten Werten wurden bei den höchsten Analysenzeiten (540 min) erhalten. So wurde für die Erhöhung der Gradientdauer um Faktor 9 (60 auf 540 min) ein Verhältnis der Peakbasisbreiten (540 min / 60 min) von 3.00 erwartet, welches eigentlich nur für Säule 150 #1 (MS) mit einem Wert von 3.00 sehr gut erfüllt wurde. Im Vergleich dazu wurden jedoch mit Abweichungen von 26% für Säule 250 #1 (UV), mit 30% für Säule 210 #2 (MS) oder sogar mit 38% für Säule 210 #2 (UV) deutlich schlechtere Übereinstimmungen als z.B. für die Verdopplung der Gradientdauer (60 min auf 120 min) erhalten. Trotz dieser vereinzelt Abweichungen konnte jedoch auch für diese längeren und ungekoppelten Trennsäulen, genau wie bereits für die gekoppelten Trennsäulen, eine gute Übereinstimmung mit der Theorie ( $\sqrt{m}$ -Abhängigkeit der Peakbreite von Gradientdauer – vgl. vorherige Kapitel) erhalten werden.

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Studie auch die Abhängigkeit der Peakbreite von der Elutionszeit untersucht. Dazu wurde der 540 min Gradient in neun zeitgleiche „Elutionsfenster“ à 60 min aufgeteilt. Anschließend wurden die Peakbasisbreiten aller Peaks bestimmt, die in einem bestimmten Zeitfenster eluieren und mit denen eines anderen Elutionsfensters verglichen. Die Ergebnisse dieser Auswertung (ausschließlich UV-Daten) sind in nachfolgender **Abbildung 2.38** grafisch dargestellt.

Durch die Ergebnisse dieser Studie konnte die von L.R. Snyder aufgestellte These, dass die Peakbreite eines Analyten nicht von seiner Elutionszeit abhängt (vgl. Allgemeiner Teil dieser Arbeit), für Biomoleküle (Peptide) sehr gut bestätigt werden.

**Abhängigkeit der Peakbreite vom "Elutionsfenster" (9h Gradient)**

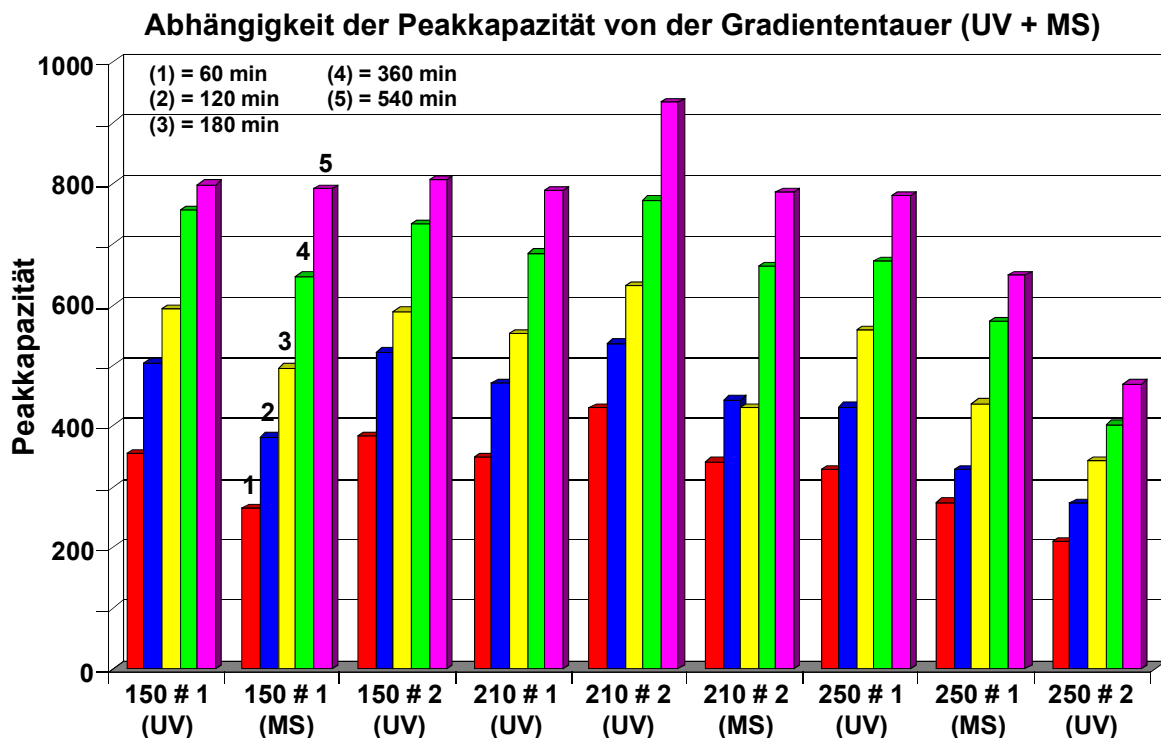


**Abbildung 2.38.** Untersuchung des Einflusses der Retentionszeit eines Peaks auf die Peakbasisbreite für die Trennung eines komplexen BSA-Thyroglobulin-Verdau mittels eines 540 min Gradienten auf verschiedenen PS/DVB-Monolithen (UV-Daten). Aufteilung des 540 min Gradienten in neun „Elutionsfenster“ à 60 min.

Wie aus **Abbildung 2.38** ersichtlich, sind die Peakbreiten unabhängig von der Elutionszeit des Analyten. Vergleicht man z.B. die Peakbasisbreiten der 150 mm Säule #2 im Elutionsfenster zwischen 60-120 min mit denen im Elutionsfenster zwischen 480-540 min, so sieht man, dass nahezu identische Peakbreiten erhalten wurden. Dieses Verhalten der Peptide, dass sie unabhängig von der Retentionszeit vergleichbare Werte in den Peakbreiten haben, ist entscheidend für die Steigerung der Peakkapazitäten durch längere Trennsäulen oder längere Gradientzeiten. Würden spät eluierende Peaks signifikant höhere Peakbreiten als früh eluierende Peaks aufweisen, so könnte der durch längere Gradientzeiten erhaltene Vorteil durch die deutlich höhere Peakbasisbreiten wieder zunichte gemacht werden. Somit wäre

eine Verbesserung der Peakkapazitäten durch längere Trennsäulen oder längere Gradienten nicht möglich.

Neben dem Einfluss der Gradientdauer auf die Peakbreiten wurde im Rahmen dieser Studie auch die Abhängigkeit der Peakkapazitäten von der Säulenlänge und Gradientdauer untersucht. Die Ergebnisse für die aus den UV- und MS-Daten berechneten Peakkapazitäten sind in **Abbildung 2.39** sowie in **Tabelle 2.22** (Anhang) für verschiedene Säulenlängen und Gradientzeiten dargestellt.



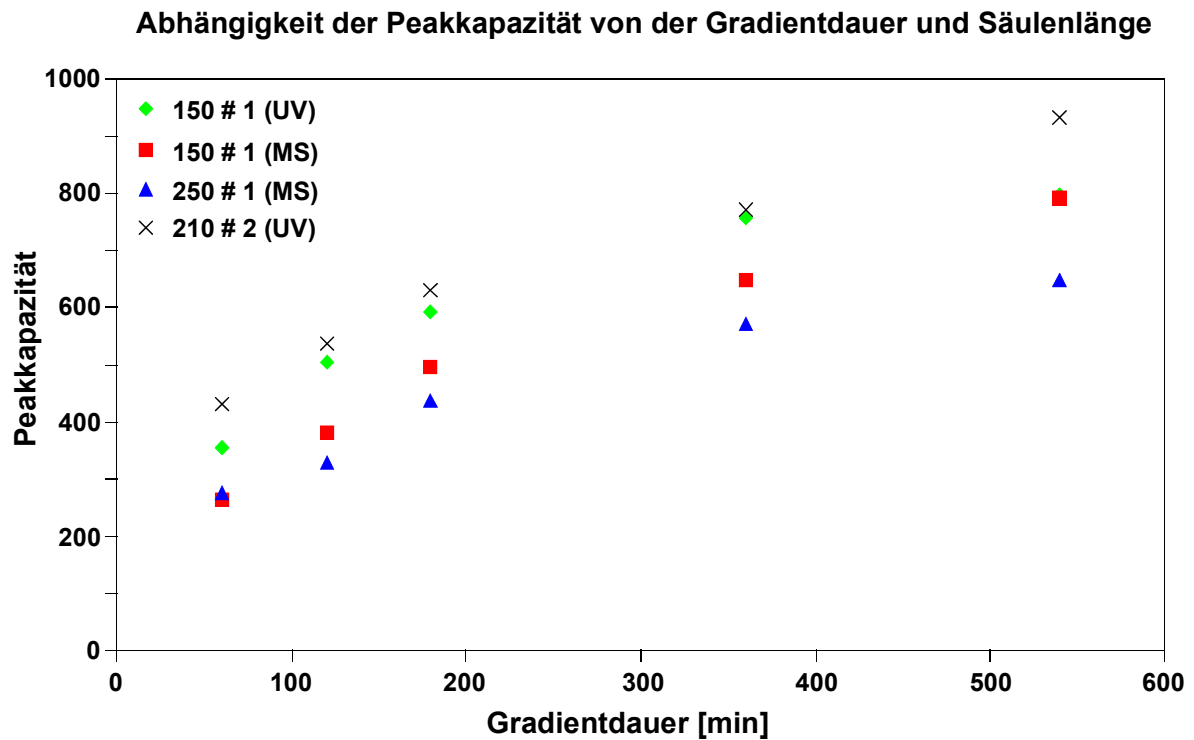
**Abbildung 2.39.** Berechnete Peakkapazitäten für die Trennung eines komplexen BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf verschiedenen PS/DVB-Monolithen mittels unterschiedlichen Trennsäulen, Säulenlänge und Gradientzeiten.

Wie aus **Abbildung 2.39** ersichtlich, wurden die höchsten Peakkapazitäten mit 933 auf der 210 mm Säule #2 und einer Gradientdauer von 540 min bestimmt, während die niedrigsten Werte (469) für die Säule 250 #2 erhalten wurden. Vergleicht man die Werte der beiden 150 mm Säulen (540 min) miteinander, so ergeben sich mit Peakkapazitäten von 798 (#1, UV) und 806 (#2, UV) für beide Säulen vergleichbar gute Werte. Dies zeigt, dass beide Trennsäulen vergleichbar gute Trenneffizienzen haben, während es bei den beiden 210 mm und vor allem bei den beiden 250 mm Säulen signifikante Unterschiede in der Trennleistung gibt. Weiterhin geht aus den

Daten von **Abbildung 2.39** hervor, dass, mit Ausnahme von Säule 210 #2 und 250 #2, für alle Säulenlängen vergleichbar gute Trenneffizienzen erhalten wurden. Während die Steigerung der Säulenlänge von 37.5 mm auf 150 mm noch eine signifikante Verbesserung der Trennleistung gebracht hat, wurden für die Steigerung der Säulenlänge von 150 mm auf 250 mm keine so starken Verbesserungen mehr erhalten. Dies kann eventuell dadurch erklärt werden, dass der Syntheseprozess für die 210 mm und 250 mm Trennsäulen noch nicht soweit optimiert ist, als dies für die ausgereiften 150 mm Säulen der Fall ist. So kann es z.B. sein, dass es bei Herstellung der 210 mm und 250 mm Säulen zur Ausbildung leichter Inhomogenitäten kommt, die wiederum die Trennleistung der Säule herabsetzen können. Aufgrund der vorliegenden Messdaten können jedoch größere Inhomogenitäten ausgeschlossen werden, da sich diese wesentlich stärker in den Werten für die Peakbasisbreite sowie für die Peakkapazitäten widerspiegeln würden. Vergleicht man weiterhin die erhaltenen Peakkapazitäten der ungekoppelten 210 mm Monolithen (**Abbildung 2.39**) mit denen der gekoppelten Säulen (**Abbildung 2.35**), so konnte durch den Verzicht auf die Kopplung eine signifikante Verbesserung der Peakkapazitäten erhalten werden. Während mit der gekoppelten 210 mm Säule eine Peakkapazität von 756 erreicht wurde, konnte dieser Wert durch die ungekoppelten Säulen auf 789 (#1) und 933 (#2) gesteigert werden. Dies entspricht einer Verbesserung der Peakkapazitäten um ca. 5% für Säule 210 #1 und 23% für Säule 210 #2.

Wie bereits für die Peakbreiten, wurde auch für die Peakkapazitäten der Einfluss der Gradientdauer und Säulenlänge untersucht. In **Abbildung 2.40** ist die Abhängigkeit der Peakkapazitäten von der Gradientdauer für eine 150 mm, eine 210 mm und eine 250 mm Säule grafisch dargestellt.

Analog zu den ungekoppelten Säulen (**Abbildung 2.35**) wurde auch für die gekoppelten Säulen ein vergleichbarer Einfluss der Gradientdauer auf die Peakkapazitäten erhalten ( $\sqrt{m}$ -Abhängigkeit). Auch hier wurde, wie bereits für Peakbreiten (**Tabelle 2.13**), auch für die Peakkapazitäten das Verhältnis zwischen Steigerung der Gradientdauer und der daraus resultierenden Steigerung der Peakkapazitäten untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 2.14** zusammengefasst.



**Abbildung 2.40.** Abhängigkeit der Peakkapazitäten von der Gradientdauer und Säulenlänge.

**Tabelle 2.14.** Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge und Gradientzeit auf die Peakkapazität. Dazu wurde das Verhältnis zwischen den Peakkapazitäten von Gradientdauer A zu Gradientdauer B untersucht (Theoretische Werte: 120/60 min=1.41, 180/60 min=1.72, 360/60 min=2.45 und 540/60 min=3.00).

Säule	Verhältnis Peakkapazitäten (Grad. A / Grad. B)			
	120/60 min	180/60 min	360/60 min	540/60 min
150 #1 (UV)	1.4	1.7	2.1	2.3
150 #1 (MS)	1.5	1.9	2.5	3.0
150 #2 (UV)	1.4	1.5	1.9	2.1
210 #1 (UV)	1.4	1.6	2.0	2.3
210 #2 (UV)	1.3	1.5	1.8	2.2
210 #2 (MS)	1.3	1.3	1.9	2.3
250 #1 (UV)	1.3	1.7	2.1	2.4
250 #1 (MS)	1.2	1.6	2.1	2.4
250 #2 (UV)	1.3	1.6	1.9	2.2

Wie bereits für die Abhängigkeit der Peakbreiten von der Gradientdauer, wurde auch für die Peakkapazitäten eine gute Übereinstimmung zwischen erwarteten und experimentellen Werten erhalten. So wurde die beste Übereinstimmung für die

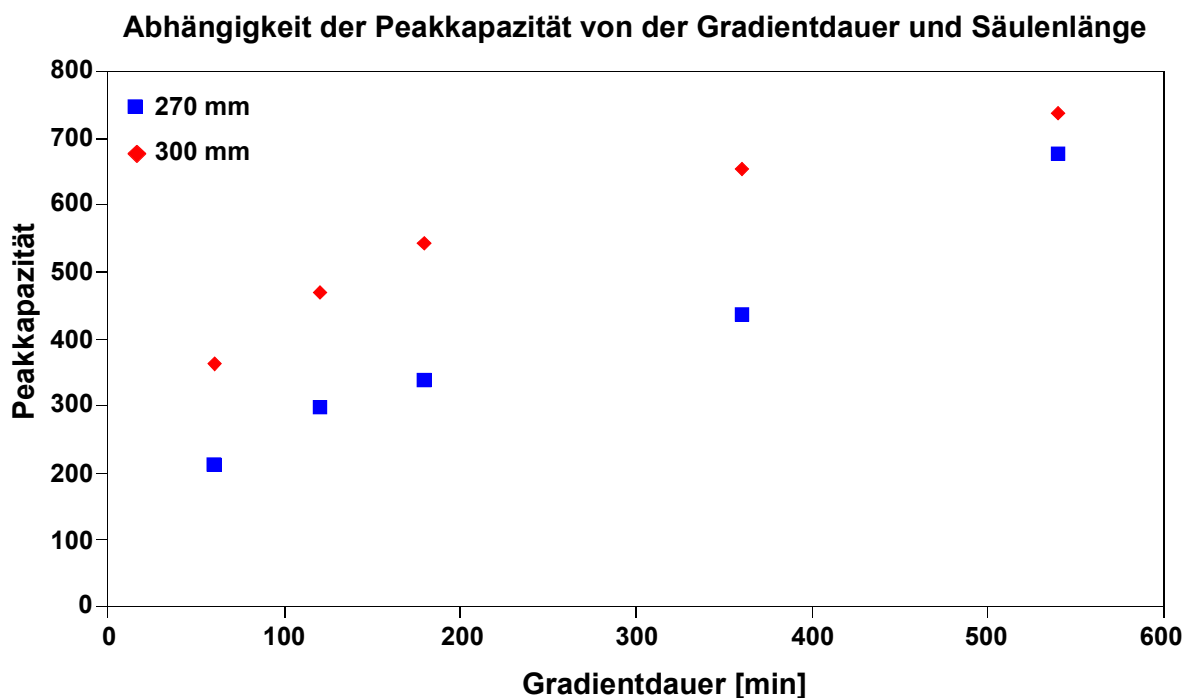
Verdopplung der Gradientdauer von 60 min auf 120 min für Säule 150 #1 (UV) mit 0.4%, während mit einer Abweichung von ca. 15% für Säule 250 #1 (MS) die größten Abweichungen bestimmt wurden. Vergleichbare Werte wurden auch für die Erhöhung der Gradientdauer um Faktor 3 (60 min auf 180 min), Faktor 6 (60 min auf 360 min) und Faktor 9 (60 min auf 540 min) erhalten. So wurde mit einer Abweichung von ca. 2% für Säule 250 #1 (UV) eine sehr gute Übereinstimmung erhalten (Erhöhung  $t_g$  von 60 min auf 180 min), während mit ca. 27% für Säule 210 #2 (MS) eine schlechtere, aber immer noch akzeptable Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erhalten wurde. Ein ähnlicher Trend konnte mit einer Abweichung von 0.4% für Säule 150 #1 (UV) und 30% für Säule 150 #2 (UV) für die Erhöhung der Gradientdauer um Faktor 9 von 60 min auf 540 min beobachtet werden.

Insgesamt kann aus den erhaltenen Daten gefolgert werden, dass die besten Trenneffizienzen und höchsten Peakkapazitäten mit langen, ungekoppelten Säulen sowie langen Gradientzeiten erhalten wurden. Vergleicht man z.B. die Peakkapazitäten von Säule 210 #2 (**Abbildung 2.40** oder **Tabelle 2.22**) für eine Analysenzeit von 60 min (430) mit den Werten bei einer Trennzeit von 540 min (933), so konnte durch die Erhöhung der Gradientdauer um Faktor 9 eine signifikante Verbesserung (Faktor 2.17) erreicht werden. Somit stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu der von P.J. Schoenmakers aufgestellten These [46], dass eine Erhöhung der Gradientdauer zu keiner signifikanten Steigerung der Peakkapazitäten führt. Wie aus den vorliegenden Daten ersichtlich ( $\sqrt{t}$ -Abhängigkeit der Peakkapazität von der Gradientdauer), kann durch die Steigerung der Gradientdauer jedoch keine unbegrenzte Erhöhung der Peakkapazitäten erreicht werden, da z.B. eine Erhöhung der Gradientdauer um Faktor 20 maximal zu einer Steigerung der Peakkapazitäten um Faktor  $\sqrt{20}$  (4.5) führt. Hierbei steht nun die Erhöhung der Analysenzeit in keinem akzeptablen Verhältnis zur erhaltenen Steigerung der Peakkapazität, während dies für eine Steigerung bis Faktor 9 (Faktor 9 in Analysenzeit ergibt Faktor 3 in Peakkapazität) durchaus noch der Fall ist.

Weiterhin konnte in dieser Studie bewiesen werden, dass die Verwendung ungekoppelter Monolithen, im Vergleich zu gekoppelten Säulen, zu einer Steigerung der Peakkapazitäten um bis zu 23% führen kann. Somit sind lange, ungekoppelte PS/DVB-Monolithen bestens für komplexe Trennprobleme geeignet.

### 2.5.5. Einfluss der Säulenlänge und Gradientdauer unter Verwendung langer, ungekoppelter PS/DVB-Monolithen

Im Rahmen dieser Studie wurde ein 270 x 0.2 mm i.D. und ein 300 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolith mit unterschiedlichen Gradientenzeiten (1h-9h) zur Trennung eines komplexen BSA-Thyroglobulin-Verdaus verwendet. Die Messungen wurden auf einem Ultimate 3000 Micro-HPLC-System mittels UV-Detektion durchgeführt. Auch hier wurden wiederum der Einfluss der Säulenlänge und der Gradientzeit auf die Peakbreiten und Peakkapazitäten untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in **Tabelle 2.23** und in **Abbildung 2.41** zusammengefasst.



**Abbildung 2.41.** Abhängigkeit der Peakkapazität von der Säulenlänge und Gradientdauer für eine 270 x 0.2 mm i.D. und eine 300 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Trennsäule.

Wie aus **Abbildung 2.41** ersichtlich, wurde sowohl für den 270 mm als auch für den 300 mm Monolithen ein ähnlicher Trend wie für die kürzeren Trennsäulen erhalten. Auch hier hängt die Peakkapazität mit  $\sqrt{t}$  von der gewählten Gradientdauer ab. Als

maximale Peakkapazitäten wurde für den 270 mm Monolithen eine Peakkapazität von 676 und für den 300 mm Monolithen eine Peakkapazität von 736 bestimmt. Somit konnte durch die Erhöhung der Säulenlänge von 250 mm auf 270 mm bzw. 300 mm keine zusätzliche Steigerung der Peakkapazitäten mehr erreicht werden. Es ist lediglich eine leichte Verbesserung der Peakkapazitäten (8%) bei der Steigerung der Säulenlänge von 270 mm auf 300 mm (11% in der Länge) zu beobachten. Vergleicht man diese Werte jedoch mit denen der ungekoppelten 150 mm, 210 mm und 250 mm Säulen, so wurden ähnliche Peakkapazitäten erhalten. Wie bereits in Kapitel 2.5.4 erläutert, könnte dies mit der noch nicht vollständig optimierten Synthese der überdurchschnittlich langen Monolithen zusammenhängen. Auch für diese Monolithen wurde der Einfluss der Gradientdauer auf die Peakkapazitäten untersucht. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2.15.** Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge und Gradientzeit auf die Peakkapazität. Dazu wurde das Verhältnis zwischen den Peakkapazitäten von Gradientdauer A zu Gradientdauer B untersucht (Theoretische Werte: 120/60 min=1.41, 180/60 min=1.72, 360/60 min=2.45 und 540/60 min=3.00).

Säule	Verhältnis Peakkapazitäten (Grad. A/ Grad. B)			
	120/60 min	180/60 min	360/60 min	540/60 min
270 mm	1.3	1.4	1.8	2.0
300 mm	1.4	1.6	2.1	3.2
Säule	Abweichung Exp.-Erw. [%]			
	120/60 min	180/60 min	360/60 min	540/60 min
270 mm	8.1	16.9	26.5	32.3
300 mm	1.0	8.2	16.3	5.7

Wie aus **Tabelle 2.15** ersichtlich, wurden sowohl für die 270 mm Säule als auch für die 300 mm Säule gute bis akzeptable Übereinstimmungen zwischen den experimentellen und den erwarteten Werten ( $\sqrt{m}$ -Abhängigkeit) erhalten. Die besten Übereinstimmungen wurden dabei mit einer Abweichung von 1% für die Steigerung von 60 min auf 120 min, mit 8.2% für die Steigerung von 60 min auf 180 min, mit 16.3% für die Steigerung von 60 min auf 360 min und mit 5.7% für die Steigerung

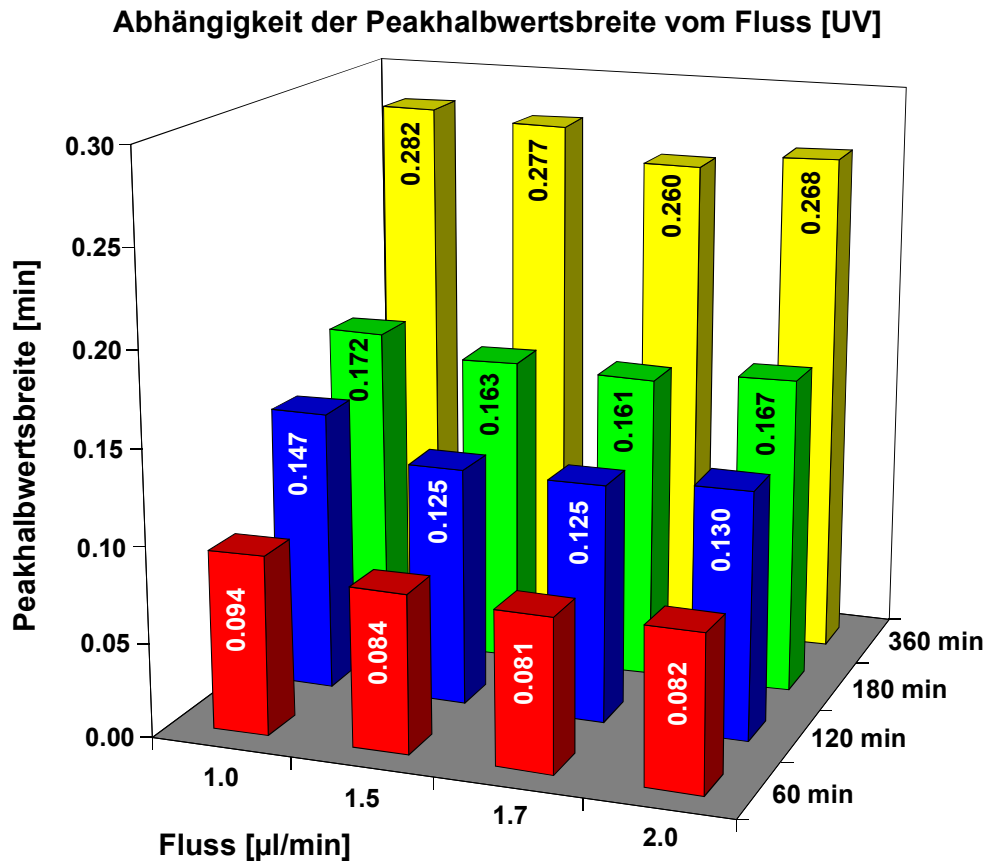


von 60 min auf 540 min für den 300 mm Monolithen erhalten. Für den 270 mm Monolithen wurde lediglich für die Verdopplung der Gradientzeit (60 min auf 120 min) mit einer Abweichung von 8.1%, gute Übereinstimmungen erhalten. Für die restlichen Gradienten betrug die Abweichung zwischen 16.9% und 32.3%. Trotz dieser deutlich höheren Werte können jedoch auch diese Werte noch als akzeptabel bezeichnet werden. Somit konnte auch für diese beiden Trennsäulen der postulierte Trend bestätigt werden.

### **2.5.6. Einfluss der Flussrate auf die Peakhalbwertsbreite und die Peakkapazität bei der Trennung eines komplexen Verdaus**

Um den Einfluss der Flussrate auf die Peakhalbwertsbreite und die Peakkapazität untersuchen zu können, wurde ein komplexer BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einem 150 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen mit verschiedenen Flussraten (1.0 µl/min – 2.0 µl/min) chromatographiert. Zusätzlich wurde die Gradientdauer zwischen 1h bis 6h variiert und die Messdaten per UV-Detektion aufgezeichnet. Alle Versuche wurden auf einem Ultimate 3000 Mikro-HPLC-System durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in **Tabelle 2.24** (Anhang) bzw. in **Abbildung 2.42** für die Peakhalbwertsbreite und **Abbildung 2.43** für die Peakkapazität zusammengestellt.

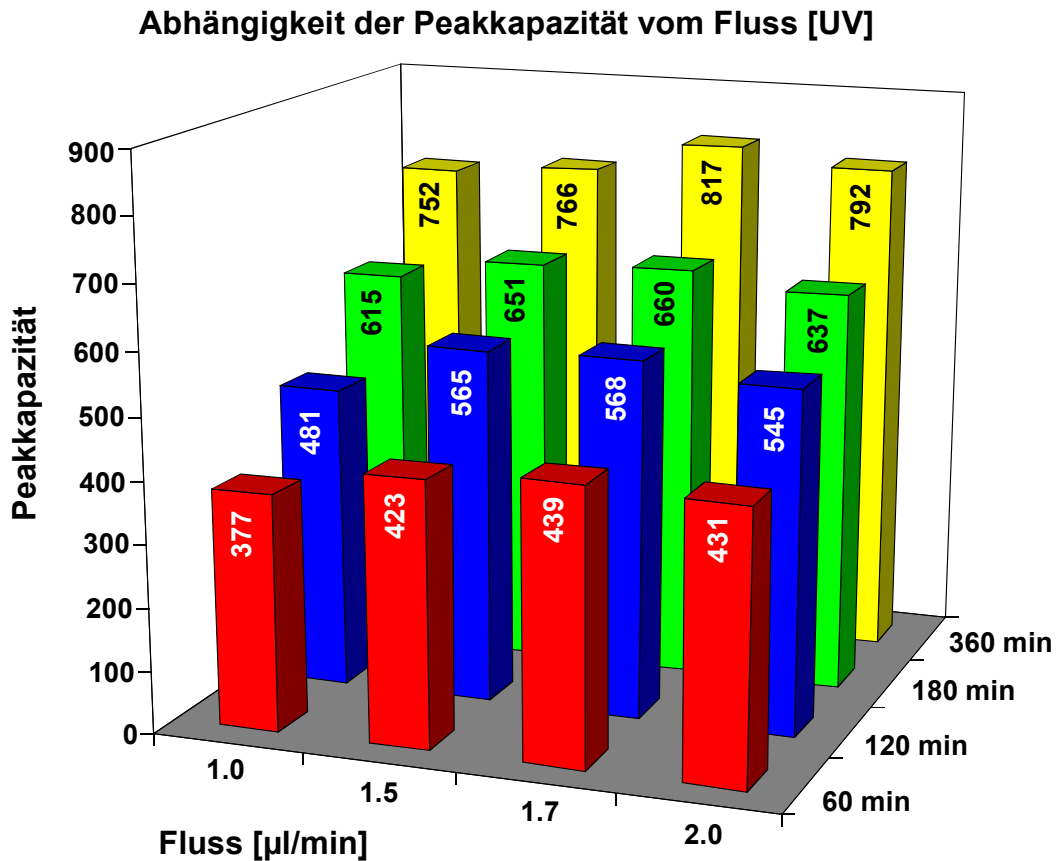
Wie aus den bestimmten Daten ersichtlich, zeigt die Flussrate für den untersuchten Bereich zwischen 1.0 µl/min bis 2.0 µl/min keinen signifikanten Einfluss auf die Peakhalbwertsbreiten. Wie aus **Abbildung 2.42** ersichtlich, wurden nur sehr geringe Schwankungen in den Peakhalbwertsbreiten für alle untersuchten Gradientzeiten festgestellt. So differierte für eine Gradientzeit von 60 min die Peakhalbwertsbreite zwischen 0.081 min (1.7 µl/min) und 0.094 min (1.0 µl/min), was einer Schwankung von ca. 14% entspricht. Ähnliche Werte wurden auch für den 120 min Gradienten beobachtet. Hier wurden Werte zwischen 0.125 min (1.5 µl/min und 1.7 µl/min) und 0.147 min (1.0 µl/min) gemessen (15%), während für den 180 min und den 360 min Gradienten mit 6.4% (180 min, 0.161-0.172 min) und 7.8% (360 min, 0.260-0.282 min) etwas geringere Schwankungen bestimmt werden konnten.



**Abbildung 2.42.** Einfluss der Flussrate bei verschiedenen Gradientenzeiten auf die Peakhalbwertsbreite. Zur Erhebung der Daten wurde ein BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einem 150 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen getrennt (UV-Detektion).

Die höchsten Werte für die Peakhalbwertsbreite wurden für einen Fluss von 1.0 µl/min erhalten und die niedrigsten Peakhalbwertsbreiten für einen Fluss von 1.7 µl/min. Die Untersuchung des Einflusses der Flussrate auf die Peakhalbwertsbreite war daher wichtig, da wegen der unterschiedlichen Druckabfälle nicht alle Säulenlängen unter den gleichen experimentellen Bedingungen (Flussrate) betrieben werden können. Würden jedoch verschiedene Flussraten zu signifikanten Unterschieden in den Peakhalbwertsbreiten bzw. den Peakkapazitäten führen, so wäre es schwierig bis unmöglich, verschiedene Säulenlängen direkt miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass auch Ergebnisse von verschiedenen Säulenlängen mit unterschiedlichen Flussraten problemlos miteinander verglichen werden dürfen.

Da die Peakkapazitäten direkt aus den Peakbreiten berechnet werden, liegt also auch für den Einfluss der Flussrate auf die Peakkapazitäten ein ähnlicher Trend vor (**Abbildung 2.43**).



**Abbildung 2.43.** Einfluss der Flussrate bei verschiedenen Gradientenzeiten auf die Peakkapazität für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf einem 150 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen (UV-Detektion).

Für die Trennung des BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf dem 150 mm Monolithen wurden Peakkapazitäten zwischen 377 (1.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) und 439 (1.7  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) bei einem 60 min Gradienten und zwischen 752 (1.0  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) und 817 (1.7  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) für einen 360 min bestimmt. Auch hier konnten nur sehr geringe Schwankungen zwischen den einzelnen Flussraten festgestellt werden, und für alle untersuchten Flüsse konnten hohe Peakkapazitäten bestimmt werden.

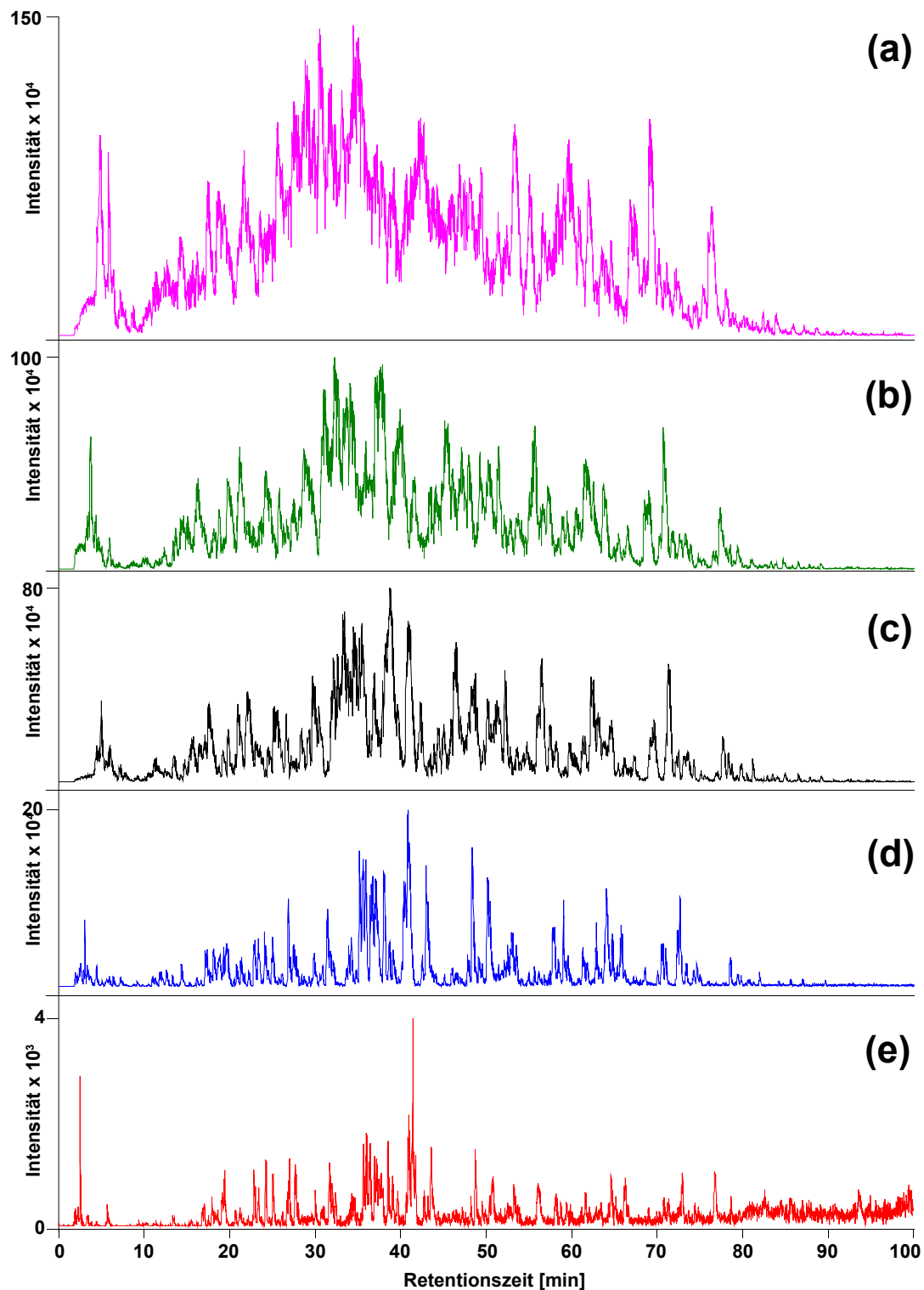
Insgesamt kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass die Flussrate keinen signifikanten Einfluss auf die Peakhalbwertsbreite (Peakbasisbreite) und die

Peakkapazität hat und daher Messungen mit verschiedenen Flussraten problemlos direkt miteinander verglichen werden dürfen.

### **2.5.7. Beladbarkeit langer PS/DVB-Monolithen mittels BSA-Thyroglobulin-Verdau und P2693 Peptid-Standard**

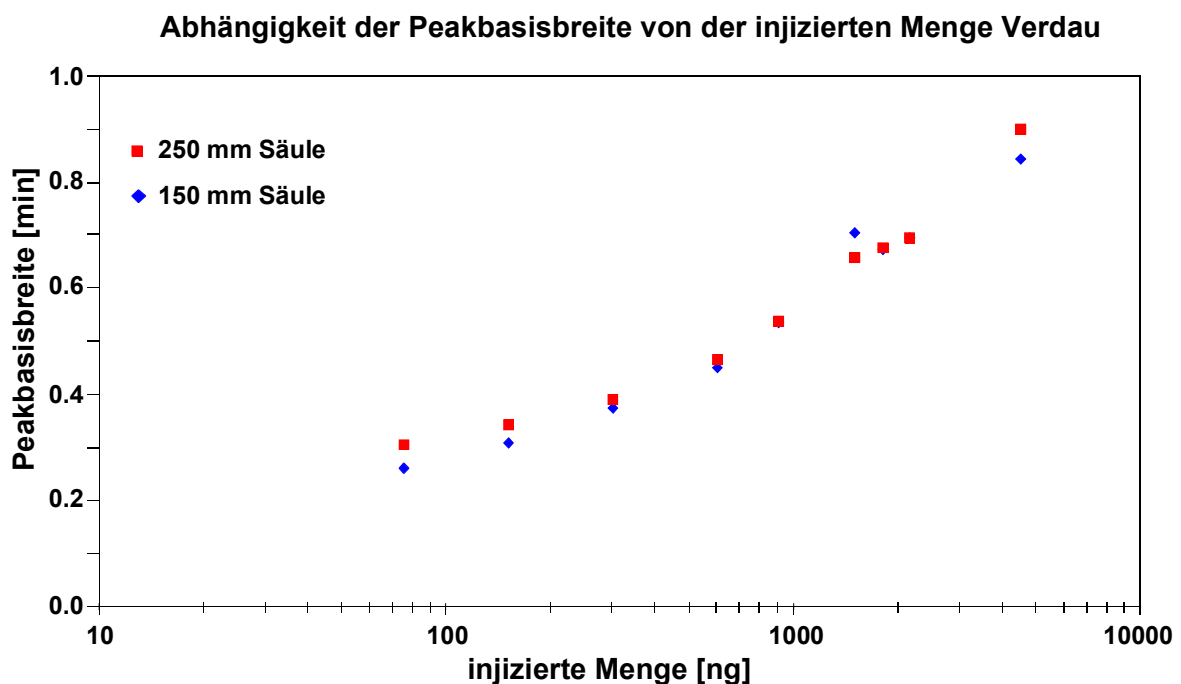
In diesem Teil der Monolithenstudie wurde die Beladbarkeit zweier PS/DVB-Monolithen mittels eines BSA-Thyroglobulin-Verdau und eines P2693 Peptid-Standards bestimmt. Dazu wurden ein 150 x 0.2 mm i.D. und ein 250 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolith mittels eines Ultimate U3000 Mikro-HPLC-Systems sowie eines Bruker Micro-ToF-Massenspektrometers untersucht. Für die Auswertung der Messungen des Verdau wurden MS-Daten verwendet, während für die Bestimmung der Beladbarkeit mittels des P2693 Peptid-Standards lediglich UV-Daten herangezogen wurden. Die Beladungsstudie für den Verdau wurde nur auf einem 150 x 0.2. mm i.D. Monolithen durchgeführt. Für den Verdau wurden dabei Mengen zwischen 133 ng bis 8 µg untersucht, während für den Standard Mengen zwischen 200 pg und 10 ng injiziert wurden. Für die MS-Untersuchungen wurden 32 Peptide, für die UV-Messungen 3 Peptide (Brad. Frag. [1-5], Meth. Enkephalin und Bombesin) herangezogen. Die Ergebnisse dieser Studie sind in tabellarischer Form für den Verdau in **Tabelle 2.25** und in **Tabelle 2.26** für den Peptid-Standard zusammengefasst (Anhang). In **Abbildung 2.44** ist das Rekonstruierte Totalionenstromchromatogramm für die Trennung des Verdau auf einem 150 mm Monolithen abgebildet. Das RTICC für die Trennung auf der 250 mm Säule ist in **Abbildung 2.54** im Anhang dieses Kapitels dargestellt. Für den komplexen Verdau wurde in dieser Studie dabei ein Gradient von 120 min Minuten gewählt.

Um die Beladbarkeit der jeweiligen Trennsäulen untersuchen zu können, wurden die experimentell bestimmten Peakbasisbreiten gegen den Logarithmus der jeweiligen injizierten Mengen an Verdau bzw. Peptid-Standard aufgetragen. Die Ergebnisse für den Verdau sind in **Abbildung 2.45**, die für den Standard in **Abbildung 2.46** dargestellt.



**Abbildung 2.44.** Rekonstruiertes Totalionenstromchromatogramm (RTICC) für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf einer 150 x 0.2 mm i.D. Säule. Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; (A) 0.05% TFA in Wasser, (B) A+80% ACN; Gradient: 0-60% ACN in 120 min; Fluss: 1.5  $\mu$ l/min; 55°C; Scan: 100-3000 m/z; Trockengas: 4 l/min; Probe: 8.054  $\mu$ g (a), 3.796  $\mu$ g (b), 2.684  $\mu$ g (c), 0.536 ng (d), 0.133 ng (e).

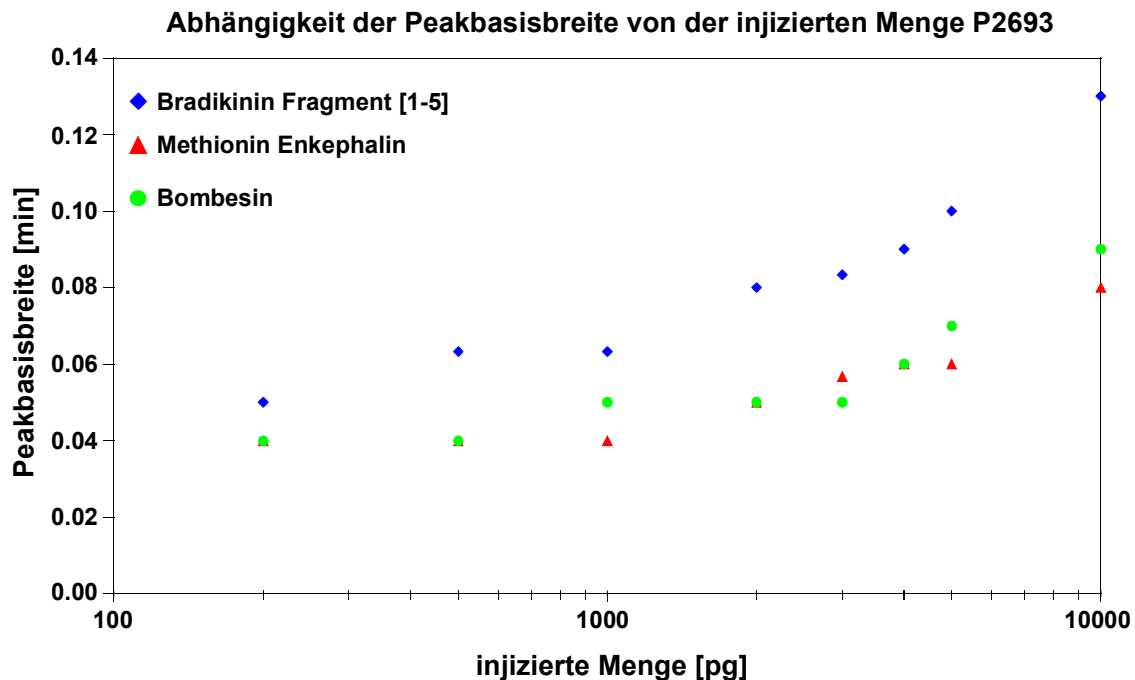
Wie aus **Abbildung 2.44** ersichtlich, konnte der komplexe BSA-Thyroglobulin-Verdau mit einem 120 min Gradienten auf der 150 mm Säule bei allen untersuchten Konzentrationen gut getrennt werden. Ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{g}$  ist ein stärkerer Verlust an Trennleistung erkennbar. Dieser Verlust an Trennleistung ist signifikant für die maximale Beladbarkeit einer Trennsäule, da die Beladbarkeit als die Menge an Analyt definiert ist, die ohne merklichen Verlust an Trennleistung noch chromatographiert werden kann. Die maximale Beladbarkeit der 150 mm Säule kann auch anhand von **Abbildung 2.45** bestimmt werden.



**Abbildung 2.45.** Experimentelle Ergebnisse für die Beladungsstudie eines 150 (blau) und eines 250 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen (rot) unter Verwendung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus und einer Gradientendauer von 120 min (MS-Daten).

In **Abbildung 2.45** sind die mittleren Peakbasisbreiten von 32 untersuchten Peptiden in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Die maximale Beladbarkeit der Säule ist dann erreicht, wenn ein signifikanter Anstieg in den Peakbreiten festzustellen ist. Für den Verdau konnte sowohl für die 150 mm als auch für die 250 mm Säule eine maximale Beladbarkeit von ca. 3  $\mu\text{g}$  bestimmt werden. Zusätzlich zur Bestimmung der Beladbarkeit mittels eines Verdaus wurde die Beladbarkeit für einen 150 mm Monolithen auch aus den UV-Daten des Peptid-

Standards bestimmt. Die Bestimmung der Beladbarkeit erfolgte dabei aus den UV-Daten dreier im Standard enthaltener Peptide. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 2.46** dargestellt.



**Abbildung 2.46.** Experimentelle Ergebnisse für die Beladungsstudie eines 150 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen unter Verwendung eines P2693 Peptid-Standards (UV-Daten).

**Abbildung 2.46** zeigt, dass für alle drei untersuchten Peptide eine vergleichbare Beladbarkeit bestimmt werden konnte. Diese liegt für den 150 mm Monolithen bei ca. 10 ng, da hier ein signifikanter Anstieg in den Peakbreiten festgestellt werden konnte. Insgesamt konnte für die beiden untersuchten Monolithen sowohl für den Verdau als auch für den Peptid-Standard eine hohe Beladbarkeit bestimmt werden. Diese Beladbarkeit ist wichtig, da sie eine Aussage darüber macht, wie viel Probe maximal auf einer bestimmten Säule getrennt werden kann, ohne dass es zu einem merklichen Verlust an Trennleistung kommt.

### 2.5.8. Bestimmung der Permeabilität langer PS/DVB-Monolithen

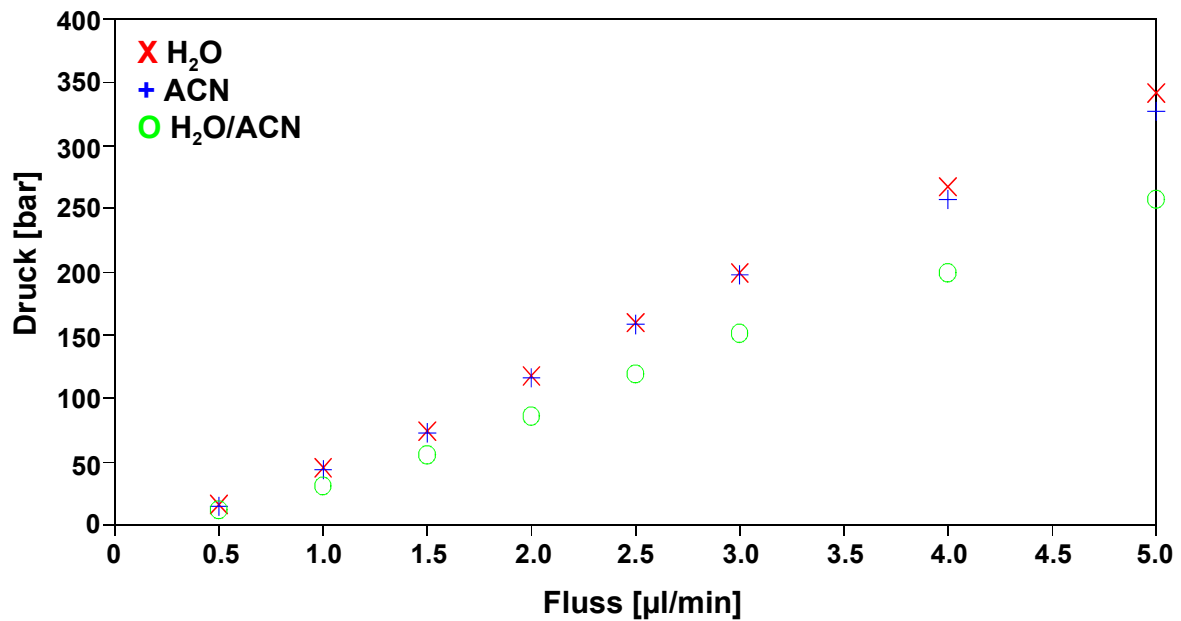
Neben den chromatographischen Parametern ist vor allem die Permeabilität einer Trennsäule entscheidend für ihre Anwendbarkeit als chromatographisches Trennmedium. Nur Trennsäulen, die eine Flussstabilität innerhalb des experimentell genutzten Bereiches aufweisen, können als Trennsäulen in der Chromatographie eingesetzt werden. Ein Nachteil vieler polymerer Phasen ist, dass sie beim Kontakt mit organischen Lösemitteln wie z.B. Acetonitril zu quellen beginnen und es durch den vom HPLC-System erzeugten Druck zu einer Verformung des Packungsbettes kommen kann. Dieses Quellen führt zu einem signifikanten Anstieg des Säulendrucks. Daher können in der modernen HPLC nur diejenigen Säulen eingesetzt werden, die über einen weiten Flussbereich eine ausreichende mechanische Stabilität des Packungsbettes gewährleisten und nicht zu quellen beginnen.

Um diese Stabilität für die langen PS/DVB-Monolithen untersuchen zu können, wurden für eine 210 x 0.2 mm i.D. und eine 270 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Säule, bei Raumtemperatur (25°C) und einer Flussrate von 1.5 µl/min, Druck-Fluss-Kurven aufgenommen. Dazu wurde die Abhängigkeit des Säulendrucks von der Flussrate mittels verschiedenen Laufmitteln (H<sub>2</sub>O, ACN) für die beiden Trennsäulen bestimmt. Ein Beispiel für die Druck-Fluss-Kurve eines 210 mm Monolithen mit verschiedenen Laufmitteln ist in **Abbildung 2.47** dargestellt. Die entsprechende Druck-Fluss-Kurve für den 270 mm Monolithen ist in **Abbildung 2.57** im Anhang dieses Kapitels abgebildet.

Sowohl **Abbildung 2.47** als auch **Abbildung 2.57** zeigen, dass unabhängig vom gewählten Laufmittel über den gesamten untersuchten Flussbereich eine hohe mechanische Stabilität der beiden Trennsäulen vorliegt und es zu keinem Quellen der Phasen gekommen ist. Für alle untersuchten Laufmittel konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen Flussrate und Druckabfall bestimmt werden. So wurde für H<sub>2</sub>O ein R<sup>2</sup>-Werte von 0.9981 und für Acetonitril und die Wasser-Acetonitril-Mischung jeweils ein R<sup>2</sup>-Wert von 0.9971 bestimmt. Vergleichbare Werte wurden auch für den 270 mm Monolithen bestimmt (H<sub>2</sub>O: 0.9888, ACN: 0.9857, H<sub>2</sub>O/ACN: 0.9731).



### Druck-Fluss-Kurve eines 210 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen



**Abbildung 2.47.** Druck-Fluss-Kurve eines 210 X 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen bei 25°C. Zur Bestimmung der Druck-Fluss-Kurve wurden verschiedene Laufmittel und Flussraten zwischen 0.5-5.0 µl/min verwendet.

Weitere wichtige Parameter für die Charakterisierung einer Trennsäule sind die Porosität  $\varepsilon$ , die spezifische Permeabilität  $B_0$  sowie der Teilchendurchmesser  $d_p$ . Um die Porosität  $\varepsilon$  aus den experimentellen Daten berechnen zu können, wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\varepsilon = \frac{F}{u \cdot r_c^2 \cdot \Pi}$$

**Gleichung 2.26.** Berechnung der Porosität  $\varepsilon$  aus der volumetrischen Flussrate  $F$  [m<sup>3</sup>/s], der Lineargeschwindigkeit  $u$  der mobilen Phase [m/s] und dem Säulenradius  $r_c$  [m].

Alle benötigten physikalischen Größen konnten direkt aus den experimentellen Daten bestimmt werden.

Die Berechnung der spezifischen Permeabilität erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$B_0 = \frac{u \cdot \eta \cdot L}{\Delta p}$$

**Gleichung 2.27.** Gleichung zur Berechnung der spezifischen Permeabilität  $B_0$  aus der Lineargeschwindigkeit  $u$ , der Viskosität  $\eta$  [kg/m·s], der Säulenlänge  $L$  [m] und dem Druckabfall  $\Delta p$  (bei 1.5  $\mu$ l/min).

Zur Berechnung von  $dp$  wurde die semiempirische Kozeny-Carman-Gleichung verwendet:

$$B_0 = \frac{dp^2 \cdot \varepsilon^3}{180 \cdot (1 - \varepsilon)^2}$$

**Gleichung 2.28.** Gleichung zur Berechnung des korrespondierenden Teilchendurchmessers  $dp$  aus der spezifischen Permeabilität  $B_0$  und der Porosität  $\varepsilon$ .

Die Ergebnisse für die Berechnung der spezifischen Permeabilität  $B_0$  und des relativen Teilchendurchmessers  $dp$  sind in **Tabelle 2.16** aufgeführt.

**Tabelle 2.16.** Ergebnisse für die Berechnung der spezifischen Permeabilität  $B_0$  und der korrespondierenden Teilchengröße  $dp$  für verschiedene Säulenlängen und verschiedene Laufmittel.

spez. Permeabilität	$B_0$ (210mm - H <sub>2</sub> O)	3.99855E-15	m <sup>2</sup>
	$B_0$ (210mm - ACN)	1.46624E-15	m <sup>2</sup>
	$B_0$ (210mm - H <sub>2</sub> O:ACN 1:1)	3.21006E-15	m <sup>2</sup>
	$B_0$ (270mm - H <sub>2</sub> O)	2.68035E-16	m <sup>2</sup>
	$B_0$ (270mm - ACN)	1.03379E-16	m <sup>2</sup>
	$B_0$ (270mm - H <sub>2</sub> O:ACN 1:1)	2.40011E-16	m <sup>2</sup>
dp	dp (210 mm - H <sub>2</sub> O)	8.71642E-07	m
	dp (210 mm - ACN)	5.27826E-07	m
	dp (210 mm - H <sub>2</sub> O:ACN 1:1)	7.80988E-07	m
	dp (270 mm - H <sub>2</sub> O)	7.07142E-08	m
	dp (270 mm - ACN)	4.39164E-08	m
	dp (270 mm - H <sub>2</sub> O:ACN 1:1)	6.69155E-08	m

Vergleicht man die berechneten spezifischen Permeabilitäten aus **Tabelle 2.16** von Wasser und Acetonitril, so sieht man, dass für Wasser eine deutlich höhere

Permeabilität als für Acetonitril bestimmt werden konnte. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass es beim Kontakt der stationären Phase mit dem organischen Laufmittel Acetonitril zu einem Aufquellen der Phase gekommen ist. Dieser Vorgang wurde sowohl für die 210 mm als auch für die 270 mm Säule beobachtet. Vergleicht man die Werte von Wasser und Acetonitril mit denen der Mischung, so sieht man, dass bei Verwendung dieses Laufmittels ein Mittelwert zwischen reinem Wasser und reinem ACN erhalten wurde. Das geringste Aufquellen der stationären Phase konnte mit dem stark hydrophilen Wasser beobachtet werden, was dadurch erklärt werden kann, dass dieses Laufmittel wenig mit der stark hydrophoben stationären Phase wechselwirkt. Dementsprechend wurde das stärkste Quellen für das hydrophobste Laufmittel Acetonitril beobachtet.

Insgesamt konnte trotz des Aufquellens der stationären Phase mit reinem Acetonitril als Laufmittel eine hohe mechanische Stabilität für beide untersuchten Säulen festgestellt werden.

### 2.5.9. Zusammenfassung

Aufbauend auf den Ergebnissen aus Teil I dieser Arbeit (37.5-150 mm Monolithen Kapitel 2.4.3-2.4.5) wurden nun mehrere längere gekoppelte und ungekoppelte Monolithen (150-300 mm) hergestellt und mittels HPLC und HPLC-MS auf ihre Trenneffizienz hin untersucht. Als Analyt diente dabei ein komplexer BSA-Thyroglobulin-Verdau.

Prinzipiell liegt dem Versuch der Steigerung der Peakkapazität durch Erhöhung der Säulenlänge die Theorie zugrunde, dass sich die Peakbreiten nicht proportional zur Säulenlänge, sondern lediglich mit der Wurzel der Säulenlänge ( $\sqrt{m}$  mit  $m$  = Faktor der Steigerung der Säulenlänge) eingehen. Verdoppelt man also die Säulenlänge ( $m=2$ ), so sollte sich demnach die Peakbreite um  $\sqrt{2}$  (1.4142) erhöhen. Der sich daraus ergebende Vorteil sollte in höheren Peakkapazitäten für längere Trennsäulen resultieren. Zusätzlich zur Säulenlänge wurde in dieser Studie ebenfalls der Einfluss der Gradientdauer (1h-9h) sowie der Flussrate (1 $\mu$ l/min-2 $\mu$ l/min) auf die Peakbreiten und Peakkapazitäten untersucht. Abschließend wurde in dieser Studie noch die

Beladbarkeit langer PS/DVB-Monolithen anhand einer 150 mm und einer 250 mm Säule mittels eines komplexer BSA-Thyroglobulin-Verdaus und eines P2693 Peptid-Standards bestimmt. Auch die physikalischen Parameter der Trennsäule wie spezifische Permeabilität, Porosität und Teilchendurchmesser wurden für eine 210 mm und eine 270 mm Säule anhand verschiedener Druck-Fluss-Kurven ermittelt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die neuen, längeren PS/DVB-Monolithen unter Verwendung langer Gradienten in der Lage waren, Peakkapazitäten bis annähernd 1000 zu generieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Säulenfluss keinen signifikanten Einfluss auf die Peakbreiten der Analyten sowie auf die Peakkapazitäten hat. Anhand der gemessenen Daten konnte auch die postulierte Theorie, dass sich die Peakbreite zur Säulenlänge nicht direkt proportional sondern lediglich mit der Wurzel der Säulenlänge ändert, bestätigt werden. Neben dem Einfluss der Säulenlänge auf die Peakbreite konnte ein vergleichbarer Trend auch für die Steigerung der Gradientdauer festgestellt werden. Auch hier führt eine Steigerung der Gradientdauer um Faktor  $m$  zu einer Erhöhung der Peakbreiten und Peakkapazitäten um Faktor  $\sqrt{m}$ , was dazu führt, dass längere Gradienten zu einer signifikanten Verbesserung der Peakkapazitäten führen. Da die Peakkapazitäten jedoch nicht linear von der Gradientdauer abhängen, sondern lediglich mit Wurzel eingehen, ist jedoch eine Steigerung der Peakkapazitäten durch Erhöhung der Gradientdauer nicht unbegrenzt möglich. Im Rahmen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass bis zu einer Verzehnfachung der Gradientzeit eine sehr gute Steigerung der Peakkapazitäten möglich war, während noch längere Analysenzeiten keinen größeren Zugewinn an Peakkapazität mehr bewirkten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin der Unterschied zwischen gekoppelten und ungekoppelten Trennsäulen untersucht. Es konnte so gezeigt werden, dass durch Verbesserung der Kopplungstechnik eine wesentliche Verbesserung der Trenneffizienz erreicht werden konnte, gekoppelte Säulen jedoch im Vergleich zu ungekoppelten Säulen über eine deutlich geringere Trennleistung verfügen. Zum Abschluss dieser Studie wurde noch die mechanische Stabilität der PS/DVB-Monolithen mittels verschiedener Laufmittel untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass auch längere Monolithen, unabhängig vom gewählten Laufmittel, über einen sehr weiten Flussbereich über eine sehr hohe mechanische Stabilität verfügen.

Diese Stabilität ist eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz langer Monolithen in der HPLC.

Abschließend konnte durch die Studie gezeigt werden, dass die homogene Synthese langer PS/DVB-Monolithen mit hohen Trenneffizienzen und hohen Peakkapazitäten möglich ist. In Zusammenarbeit mit der Firma LC-Packings konnte dabei der Herstellungsprozess soweit optimiert werden, dass auch für sehr lange Trennsäulen (300 mm) keine nennenswerten Inhomogenitäten mehr aufgetreten waren. Mit Peakkapazitäten von ca. 1000 bei gleichzeitigen Druckabfällen von ca. 300-350 bar konnte weiterhin gezeigt werden, dass die neuen langen PS/DVB-Säulen bestens für die Trennung auch sehr komplexer Mischungen geeignet sind. Im Gegensatz zu neueren Techniken, wie z.B. UHPLC, die spezielle HPLC-Systeme verlangen, können diese Trennsäulen bei normalem Druck (300-400 bar) betrieben werden und sind somit für den Einsatz auf konventionellen HPLC-Systemen geeignet. Damit stellen die langen PS/DVB-Monolithen eine kostengünstige und leistungsfähige Alternative zu UHPLC dar.

## 2.6. Literaturverzeichnis

1. J. W. Dolan, L. R. Snyder, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, D. L. Saunders, L. V. Heukelem and T. J. Waeghe, *J. of Chromatogr. A*, 803 (1998) 1.
2. W. S. Hancock, R. C. Chloupek, J. J. Kirkland and L. R. Snyder, *J Chromatogr A*, 686 (1994) 31.
3. P. L. Zhu, L. R. Snyder, J. W. Dolan, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, L. C. Sander and T. J. Waeghe, *J. of Chromatogr. A*, 756 (1996) 21.
4. M. M. Bushey and J. W. Jorgenson, *Anal. Chemistry*, 62 (1990) 161.
5. G. Guiochon, L. A. Beaver, M. F. Gonnord, A. M. Siouffi and M. Zakaria, *J. of Chromatogr.*, 255 (1983) 415.
6. D. R. Stoll and P. W. Carr, *J. of Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 5034.
7. J. E. MacNair, G. J. Opiteck, J. W. Jorgenson and M. A. Moseley, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11 (1997) 1279.
8. J. E. MacNair, K. C. Lewis and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 983.
9. J. E. MacNair, K. D. Patel and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 700.
10. K. Lan and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 709.
11. A. D. Jerkovich, J. S. Mellors and J. W. Jorgenson, *LC-GC North Am.*, 21 (2003) 600.
12. J. S. Mellors and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5441.
13. Y. Shen, R. Zhang, R. J. Moore, J. Kim, T. O. Metz, K. K. Hixson, R. Zhao, E. A. Livesay, H. R. Udseth and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 3090.
14. A. Premstaller, H. Oberacher and C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4386.
15. A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A.-M. Timperio, L. Zolla, J.-P.

- Chervet, N. Cavusoglu, A. Van Dorsselaer and C. G. Huber, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2390.
16. D. A. Skoog and J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1996.
  17. H. Engelhardt, Rohrschneider and M., *Deutsche Chromatographische Grundbegriffe zur IUPAC Nomenklatur* [Web Page]. Available at <http://www.uni-saarland.de/fak8/huber/pdf/CHROBEGR97.pdf>, accessed 8 June 2004.
  18. W. Götzinger and J. Kyranos, *American Laboratory (Shelton Connecticut)*, 8 (1998) 30.
  19. L. R. Snyder and D. L. Saunders, *J. of Chromogr. Sci.*, 7 (1969) 195.
  20. L. R. Snyder, J. W. Dolan and J. R. Gant, *J. Chromatogr.*, 165 (1979) 3.
  21. J. W. Dolan, J. R. Grant and L. R. Snyder, *J. of Chromatography*, 165 (1979) 31.
  22. H. Engelhardt and H. Elgass, *J. of Chromatogr.*, 158 (1978) 249.
  23. H. Elgass, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1978.
  24. P. Jandera and J. Churacek, *J. of Chromatogr.*, 91 (1974) 207.
  25. P. Jandera and J. Churacek, *J. of Chromatogr.*, 91 (1974) 223.
  26. P. Jandera and J. Churacek, *J. of Chromatogr.*, 93 (1974) 17.
  27. P. Jandera and J. Churacek, *J. of Chromatogr.*, 104 (1975) 9.
  28. P. Jandera and J. Churacek, *J. of Chromatogr.*, 104 (1975) 23.
  29. P. Jandera and J. Churacek, *J. of Chromatogr.*, 115 (1975) 9.
  30. C. Liteanu and S. Gocan, *Gradient Elution Chromatography*, Wiley, New York, 1974.

31. U. Neue, *J. of Chromatogr. A*, 1079 (2005) 153.
32. R. P. W. Scott and P. Kucera, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 749.
33. R. P. W. Scott and P. Kucera, *J. of Chromatogr.*, 83 (1973) 257.
34. P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet, R. Tijssen and L. de Galan, *J. of Chromatogr.*, 149 (1978) 519.
35. M. Borowko, M. Jaroniec, J. Narkiewicz, A. Patrykiewicz and W. Rudinski, *J. of Chromatogr.*, 153 (1978) 309.
36. M. Borowko, M. Jaroniec, J. Narkiewicz, A. Patrykiewicz and W. Rudinski, *J. of Chromatogr.*, 153 (1978) 321.
37. R. S. Alm, R. J. P. Williams and A. Tiselius, *Acta Chem. Scand.*, 6 (1952) 826.
38. R. Snyder, *Chromatogr. Rev.*, 7 (1965) 1.
39. L. R. Snyder and H. D. Warren, *J. of Chromatogr.*, 15 (1964) 344.
40. L. R. Snyder, *J. of Chromatogr.*, 13 (1964) 415.
41. Y. Zhang, G. Zhou, M. Bao, Y. Li and P. Lu, *Chromatographia*, 14 (1981) 135.
42. H. Omyla, Universität des Saarlandes, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland, 2000.
43. C. G. Huber, A. Premstaller and H. Oberacher, *Method and Apparatus for Separating Polynucleotides Using Monolithic Capillary Columns*, US patent application U. S., 60/178.553 .
44. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., 1979.
45. X. Wang, W. E. Barber and P. W. Carr, *J. of Chromatogr. A*, 1107 (2006) 139.
46. P. J. Schoenmakers, G. Vivo-Truyols and W. M. C. Decrop, *J. Of Chromatogr. A*, 1120 (2006) 282.



## 2.7. Anhang

### 1. Tabellarischer Anhang

**Tabelle 2.17.** Tabellarische Zusammenstellung der bestimmten mittleren Peakbasisbreiten sowie der berechneten Peakkapazitäten (für den Peptid Standard) für die beiden 150 mm Monolithen (22-03-2005 #3 und #4) sowie deren kürzere Teilstücke (mit GVK).

<b>P2693 Peptid-Standard</b>				
<b>Säule</b>	<b>Säulenlänge [mm]</b>	<b>w<sub>h</sub> mittel [min]</b>	<b>w<sub>b</sub> mittel [min]</b>	<b>P<sub>mittel</sub></b>
<b>22-03-2005 # 4</b>	150	0.033	0.056	135
Teilstück 1	75	0.022	0.037	102
Teilstück 2	75	0.024	0.042	91
Teilstück 1a	37.5			
Teilstück 1b	37.5	0.025	0.042	46
Teilstück 2a	37.5			
Teilstück 2b	37.5	0.017	0.029	65
<b>22-03-2005 # 3</b>	150	0.038	0.064	118
Teilstück 1	75	0.027	0.046	83
Teilstück 2	75	0.032	0.054	70
Teilstück 1a	37.5	0.023	0.039	50
Teilstück 1b	37.5			
Teilstück 2a	37.5	0.020	0.033	57
Teilstück 2b	37.5			

**Tabelle 2.18.** Tabellarische Zusammenstellung der ermittelten mittleren Peakbasisbreiten sowie der berechneten Peakkapazitäten (für die Protein-Mischung) für die beiden 150 mm Monolithen (22-03-2005 #3 und #4) sowie deren kürzere Teilstücke (mit GVK).

<b>Protein-Mischung</b>				
<b>Säule</b>	<b>Säulenlänge [mm]</b>	<b>w<sub>h</sub> mittel [min]</b>	<b>w<sub>b</sub> mittel [min]</b>	<b>P<sub>mittel</sub></b>
<b>22-03-2005 # 4</b>	150	0.147	0.249	76
Teilstück 1	75	0.088	0.150	63
Teilstück 2	75	0.104	0.177	53
Teilstück 1a	37.5	0.066	0.112	42
Teilstück 1b	37.5	0.084	0.142	34
Teilstück 2a	37.5	0.091	0.155	31
Teilstück 2b	37.5	0.072	0.122	39
<b>22-03-2005 # 3</b>	150	0.182	0.309	61
Teilstück 1	75	0.105	0.179	53
Teilstück 2	75	0.107	0.182	52
Teilstück 1a	37.5	0.107	0.182	26
Teilstück 1b	37.5	0.101	0.171	28
Teilstück 2a	37.5	0.125	0.212	23
Teilstück 2b	37.5	0.099	0.169	28

**Tabelle 2.19.** Tabellarische Zusammenstellung der bestimmten mittleren Peakbasisbreiten sowie der berechneten Peakkapazitäten (für den Verdau) für die beiden 150 mm Monolithen (22-03-2005 #3 und #4) sowie deren kürzere Teilstücke (ohne GVK).

<b>Cytochrom C Verdau</b>				
<b>Säule</b>	<b>Säulenlänge [mm]</b>	<b>w<sub>h</sub> mittel [min]</b>	<b>w<sub>b</sub> mittel [min]</b>	<b>P<sub>mittel</sub></b>
<b>22-03-2005 # 4</b>	150	0.063	0.108	233
Teilstück 1	75	0.071	0.120	209
Teilstück 2	75	0.079	0.134	188
Teilstück 1a	37.5	0.103	0.175	144
Teilstück 1b	37.5	0.109	0.186	136
Teilstück 2a	37.5	0.101	0.171	147
Teilstück 2b	37.5	0.094	0.159	158
<b>22-03-2005 # 3</b>	150	0.071	0.121	208
Teilstück 1	75	0.081	0.137	183
Teilstück 2	75	0.092	0.157	160
Teilstück 1a	37.5	0.107	0.181	139
Teilstück 1b	37.5	0.110	0.187	135
Teilstück 2a	37.5	0.109	0.185	136
Teilstück 2b	37.5	0.092	0.157	161

**Tabelle 2.20.** Tabellarische Zusammenstellung der mittleren Peakbasisbreiten sowie der berechneten Peakkapazitäten (für die Protein-Mischung) für die beiden 150 mm Monolithen (22-03-2005 #3 und #4) sowie deren kürzere Teilstücke (ohne GVK).

Protein-Mischung				
Säule	Säulenlänge [mm]	w <sub>h</sub> mittel [min]	w <sub>b</sub> mittel [min]	P <sub>mittel</sub>
<b>22-03-2005 # 4</b>	150	0.147	0.249	76
Teilstück 1	75	0.136	0.231	81
Teilstück 2	75	0.155	0.264	71
Teilstück 1a	37.5	0.167	0.284	67
Teilstück 1b	37.5	0.198	0.336	56
Teilstück 2a	37.5	0.212	0.361	52
Teilstück 2b	37.5	0.175	0.297	63
<b>22-03-2005 # 3</b>	150	0.182	0.309	61
Teilstück 1	75	0.167	0.284	66
Teilstück 2	75	0.183	0.310	61
Teilstück 1a	37.5	0.194	0.329	57
Teilstück 1b	37.5	0.205	0.348	54
Teilstück 2a	37.5	0.210	0.357	53
Teilstück 2b	37.5	0.183	0.311	62
<b>Kopplung 1</b>	180	0.164	0.279	68
<b>Kopplung 1b</b>	120	0.152	0.259	73
Säule L <sub>1</sub>	210	0.114	0.193	97
Säule L <sub>2</sub>	210	0.124	0.210	89

**Tabelle 2.21.** Experimentelle Ergebnisse für die Untersuchung gekoppelter PS/DVB-Monolithen (120-210 mm) mit verschiedenen Kopplungsvarianten (vgl. **Abbildung 2.28**).

Anwendung gekoppelter PS/DVB-Monolithen - ohne GVK							
Säule	Länge [mm]	P2693		Proteine		Cyt. C Verdau	
		w <sub>b</sub> mittel [min]	P <sub>mittel</sub>	w <sub>b</sub> mittel [min]	P <sub>mittel</sub>	w <sub>b</sub> mittel [min]	P <sub>mittel</sub>
L <sub>1</sub> , 210 mm - alt	210	0.210	37	0.391	48	0.374	68
L <sub>2</sub> , 210 mm - alt	210	0.146	52	0.253	74	0.177	125
L <sub>1</sub> , 210 mm - neu	210	0.079	96	0.193	97	0.150	168
L <sub>2</sub> , 210 mm - neu	210	0.094	80	0.210	89	0.177	142
L <sub>3</sub> , 120 mm - neu	120	0.086	90	0.259	73	0.140	180
L <sub>4</sub> , 180 mm - neu	180	0.146	52	0.279	68	0.163	154

**Tabelle 2.22.** Experimentelle Ergebnisse der Untersuchung langer, ungekoppelter PS/DVB-Monolithen verschiedener Längen mittels linearen Gradienten zwischen 60 und 540 min (BSA-Thyroglobulin-Verdau).

<b>Auswertung - Daten ungekoppelte Säulen</b>									
<b>60 min</b>									
	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>
	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 2</b>	<b>210 # 1</b>	<b>210 # 2</b>	<b>210 # 2</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 2</b>
<b>W<sub>n</sub>, mittel</b>	0.100	0.134	0.092	0.101	0.082	0.104	0.108	0.129	0.170
<b>W<sub>b</sub>, mittel</b>	0.169	0.228	0.157	0.172	0.140	0.176	0.184	0.219	0.288
<b>P<sub>mittel</sub></b>	355	264	384	349	430	342	328	275	209
<b>120 min</b>									
	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>
	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 2</b>	<b>210 # 1</b>	<b>210 # 2</b>	<b>210 # 2</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 2</b>
<b>W<sub>n</sub>, mittel</b>	0.140	0.186	0.136	0.151	0.132	0.160	0.164	0.215	0.260
<b>W<sub>b</sub>, mittel</b>	0.238	0.315	0.231	0.256	0.224	0.271	0.278	0.366	0.442
<b>P<sub>mittel</sub></b>	505	382	521	470	536	444	432	329	273
<b>180 min</b>									
	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>
	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 2</b>	<b>210 # 1</b>	<b>210 # 2</b>	<b>210 # 2</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 2</b>
<b>W<sub>n</sub>, mittel</b>	0.179	0.214	0.180	0.192	0.168	0.247	0.190	0.243	0.310
<b>W<sub>b</sub>, mittel</b>	0.304	0.364	0.306	0.327	0.286	0.419	0.323	0.412	0.527
<b>P<sub>mittel</sub></b>	594	495	589	552	631	431	558	438	343
<b>360 min</b>									
	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>
	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 2</b>	<b>210 # 1</b>	<b>210 # 2</b>	<b>210 # 2</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 2</b>
<b>W<sub>n</sub>, mittel</b>	0.281	0.328	0.290	0.310	0.275	0.320	0.316	0.370	0.528
<b>W<sub>b</sub>, mittel</b>	0.477	0.557	0.492	0.526	0.467	0.543	0.537	0.629	0.897
<b>P<sub>mittel</sub></b>	755	647	733	685	772	664	671	573	403
<b>540 min</b>									
	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>	<b>MS</b>	<b>UV</b>
	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 1</b>	<b>150 # 2</b>	<b>210 # 1</b>	<b>210 # 2</b>	<b>210 # 2</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 1</b>	<b>250 # 2</b>
<b>W<sub>n</sub>, mittel</b>	0.399	0.403	0.395	0.404	0.341	0.405	0.408	0.491	0.679
<b>W<sub>b</sub>, mittel</b>	0.677	0.684	0.671	0.686	0.580	0.688	0.694	0.835	1.153
<b>P<sub>mittel</sub></b>	798	790	806	789	933	786	779	648	469

**Tabelle 2.23.** Untersuchung des Einflusses der Säulenlänge und Gradientdauer auf die Peakbreiten und die Peakkapazitäten bei 270 und 300 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen. Die Auswertung erfolgte ausschließlich über UV-Daten.

<b>Auswertung UV-Daten</b>		
	<b>60 min</b>	
	<b>300 # 2</b>	<b>270 # 2</b>
<b>w<sub>h</sub></b>	0.098	0.166
<b>w<sub>b</sub></b>	0.166	0.283
<b>P<sub>K</sub></b>	363	213
	<b>120 min</b>	
	<b>300 # 2</b>	<b>270 # 2</b>
<b>w<sub>h</sub></b>	0.151	0.238
<b>w<sub>b</sub></b>	0.256	0.404
<b>P<sub>K</sub></b>	470	298
	<b>180 min</b>	
	<b>300 # 2</b>	<b>270 # 2</b>
<b>w<sub>h</sub></b>	0.196	0.314
<b>w<sub>b</sub></b>	0.332	0.534
<b>P<sub>K</sub></b>	542	338
	<b>360 min</b>	
	<b>300 # 2</b>	<b>270 # 2</b>
<b>w<sub>h</sub></b>	0.324	0.487
<b>w<sub>b</sub></b>	0.551	0.827
<b>P<sub>K</sub></b>	654	436
	<b>540 min</b>	
	<b>300 # 2</b>	<b>270 # 2</b>
<b>w<sub>h</sub></b>	0.432	0.471
<b>w<sub>b</sub></b>	0.734	0.800
<b>P<sub>K</sub></b>	736	676

**Tabelle 2.24.** Einfluss der Flussrate bei verschiedenen Gradientzeiten auf die Peakhalbwertsbreite und die Peakkapazität. Es wurde ein BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einem 150 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen getrennt und die Daten per UV-Detektion aufgezeichnet.

Auswertung - UV Daten				
60 min				
	1.0	1.5	1.7	2.0
<b>W<sub>h, mittel</sub></b>	0.094	0.084	0.081	0.082
<b>W<sub>b, mittel</sub></b>	0.160	0.142	0.137	0.139
<b>P<sub>mittel</sub></b>	377	423	439	431
120 min				
	1.0	1.5	1.7	2.0
<b>W<sub>h, mittel</sub></b>	0.147	0.125	0.125	0.130
<b>W<sub>b, mittel</sub></b>	0.250	0.213	0.212	0,221
<b>P<sub>mittel</sub></b>	481	565	568	545
180 min				
	1.0	1.5	1.7	2.0
<b>W<sub>h, mittel</sub></b>	0.172	0.163	0.161	0.167
<b>W<sub>b, mittel</sub></b>	0.293	0.277	0.273	0.283
<b>P<sub>mittel</sub></b>	615	651	660	637
360 min				
	1.0	1.5	1.7	2.0
<b>W<sub>h, mittel</sub></b>	0.282	0.277	0.260	0.268
<b>W<sub>b, mittel</sub></b>	0.479	0.470	0.441	0.455
<b>P<sub>mittel</sub></b>	752	766	817	792

**Tabelle 2.25.** Ergebnisse der Beladungsstudie für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf einem 150 und einem 250 x 0.2. mm i.D. PS/DVB-Monolithen. Die Auswertung der Daten erfolgte aus 32 Peptiden mittels eines Micro-ToF-Massenspektrometers.

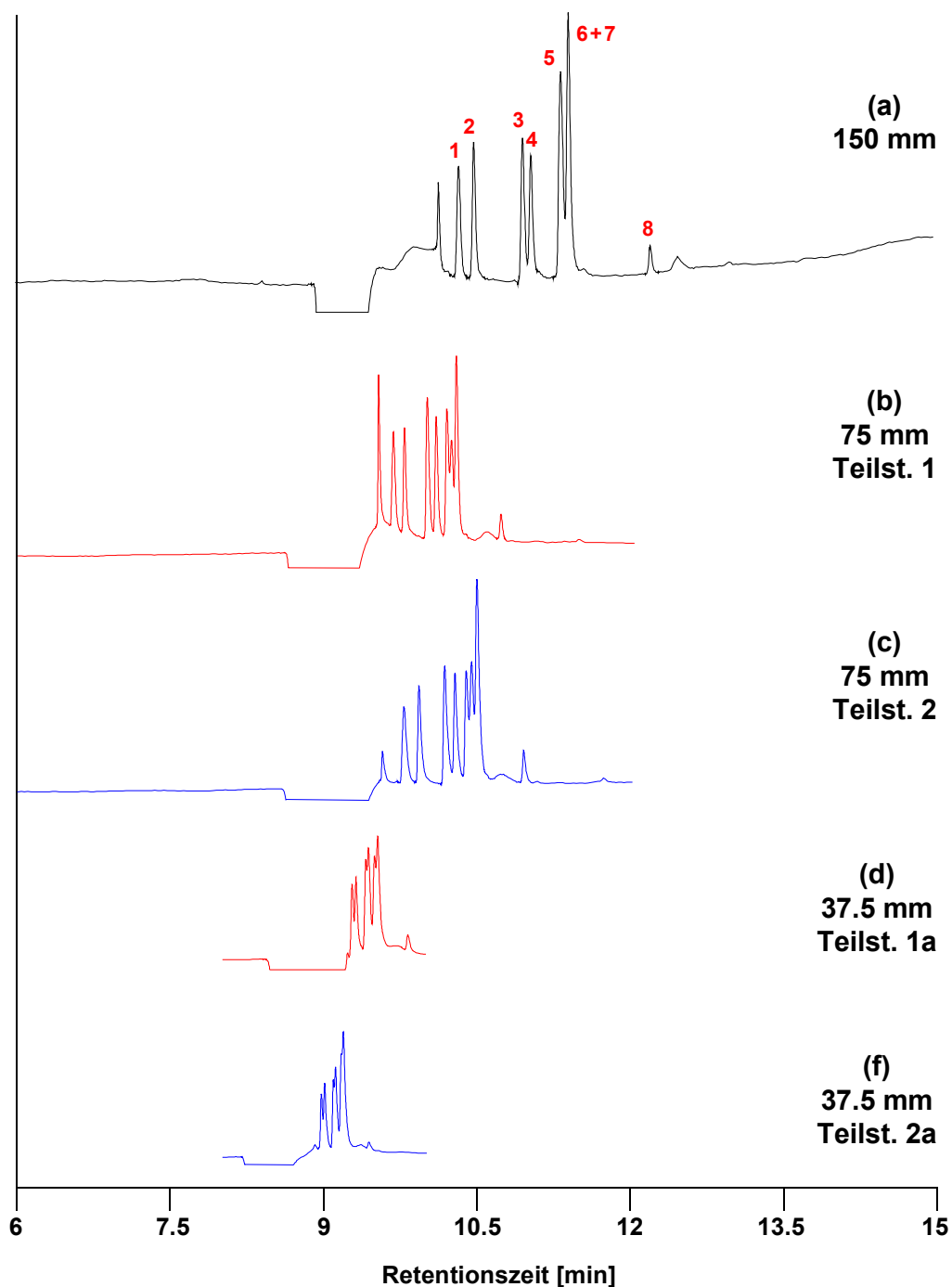
<b>Beladungsstudie Verdau (MS)</b>			
<b>150 mm Säule</b>			
<b>Totale Masse [ng]</b>	<b>w<sub>h, mittel</sub></b>	<b>w<sub>b, mittel</sub></b>	<b>P<sub>mittel</sub></b>
133.30	0.154	0.261	460
267.80	0.181	0.308	390
536.94	0.221	0.376	320
1073.88	0.265	0.451	267
1610.82	0.314	0.533	226
2684.70	0.415	0.706	171
3221.64	0.396	0.673	179
3796.10	0.409	0.695	174
8054.10	0.496	0.843	143
<b>250 mm Säule</b>			
<b>Totale Masse [ng]</b>	<b>w<sub>h, mittel</sub></b>	<b>w<sub>b, mittel</sub></b>	<b>P<sub>mittel</sub></b>
133.30	0.179	0.304	395
267.80	0.202	0.342	351
536.94	0.229	0.390	309
1073.88	0.275	0.467	258
1610.82	0.317	0.538	224
2684.70	0.387	0.658	183
3221.64	0.397	0.675	179
3796.10	0.408	0.694	174
8054.10	0.529	0.899	135

**Tabelle 2.26.** Ergebnisse der Beladungsstudie für die Trennung eines P2693 Peptid-Standards auf einem 150 x 0.2. mm i.D. PS/DVB-Monolithen. Die Auswertung der Daten erfolgte anhand dreier, im Standard enthaltener Peptide (Brad. Frag. [1-5], Meth. Enkephalin und Bombesin) und der dazugehörigen, mittels UV-Detektion bestimmten, Peakbreiten.

<b>Beladungsstudie P2693 (UV)</b>			
<b>150 mm Säule</b>			
<b>Totale Masse [ng]</b>	<b>w<sub>h, mittel</sub></b>	<b>w<sub>b, mittel</sub></b>	<b>P<sub>mittel</sub></b>
<b>0.20</b>	0.04	0.07	104
<b>0.50</b>	0.05	0.08	99
<b>1.00</b>	0.05	0.08	92
<b>2.00</b>	0.05	0.09	85
<b>3.00</b>	0.05	0.09	82
<b>4.00</b>	0.06	0.10	76
<b>5.00</b>	0.06	0.11	71
<b>10.00</b>	0.08	0.13	57

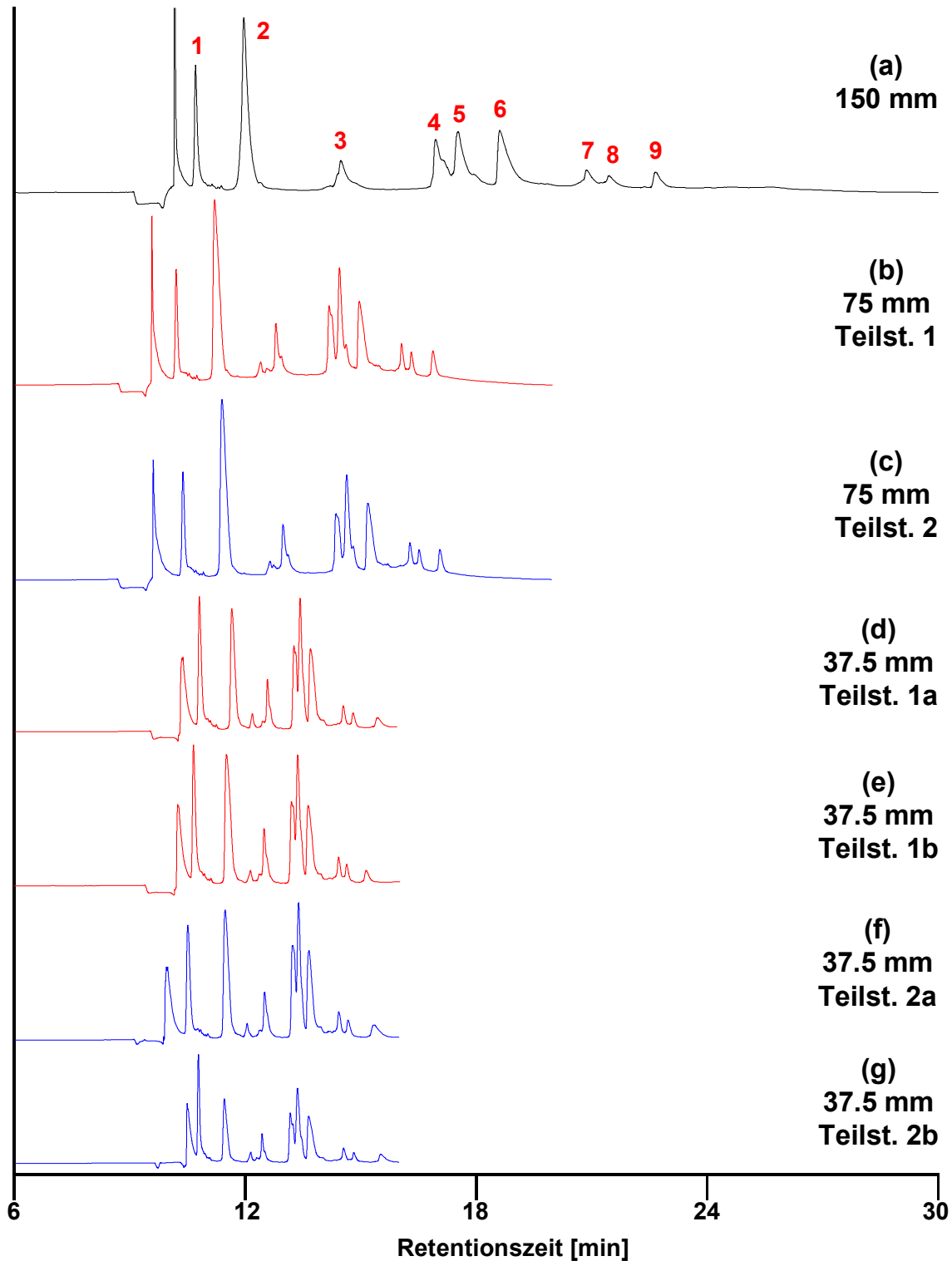


## 2. Chromatogramme



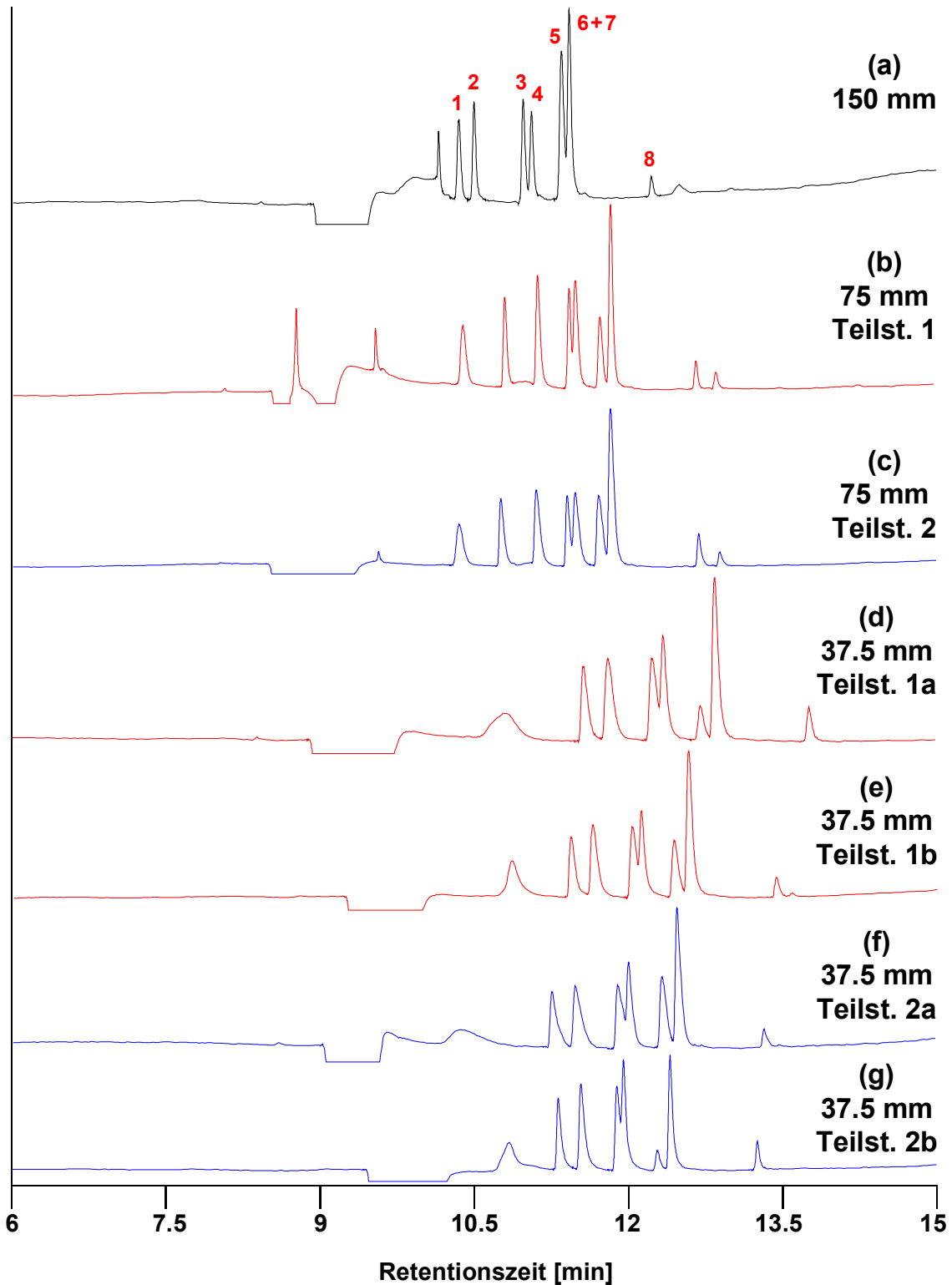
**Abbildung 2.48.** Trennung eines P2693 Peptid-Standards auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005#3) mit Verwendung des GVK.

Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: (a) 0-50.4% ACN in 7.5 min, (b,c) 0-50.4% ACN in 3.75 min, (d-g) 0-50.4% ACN in 1.88 min; Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 55°C; 214 nm; Probe: 0.25 ng.



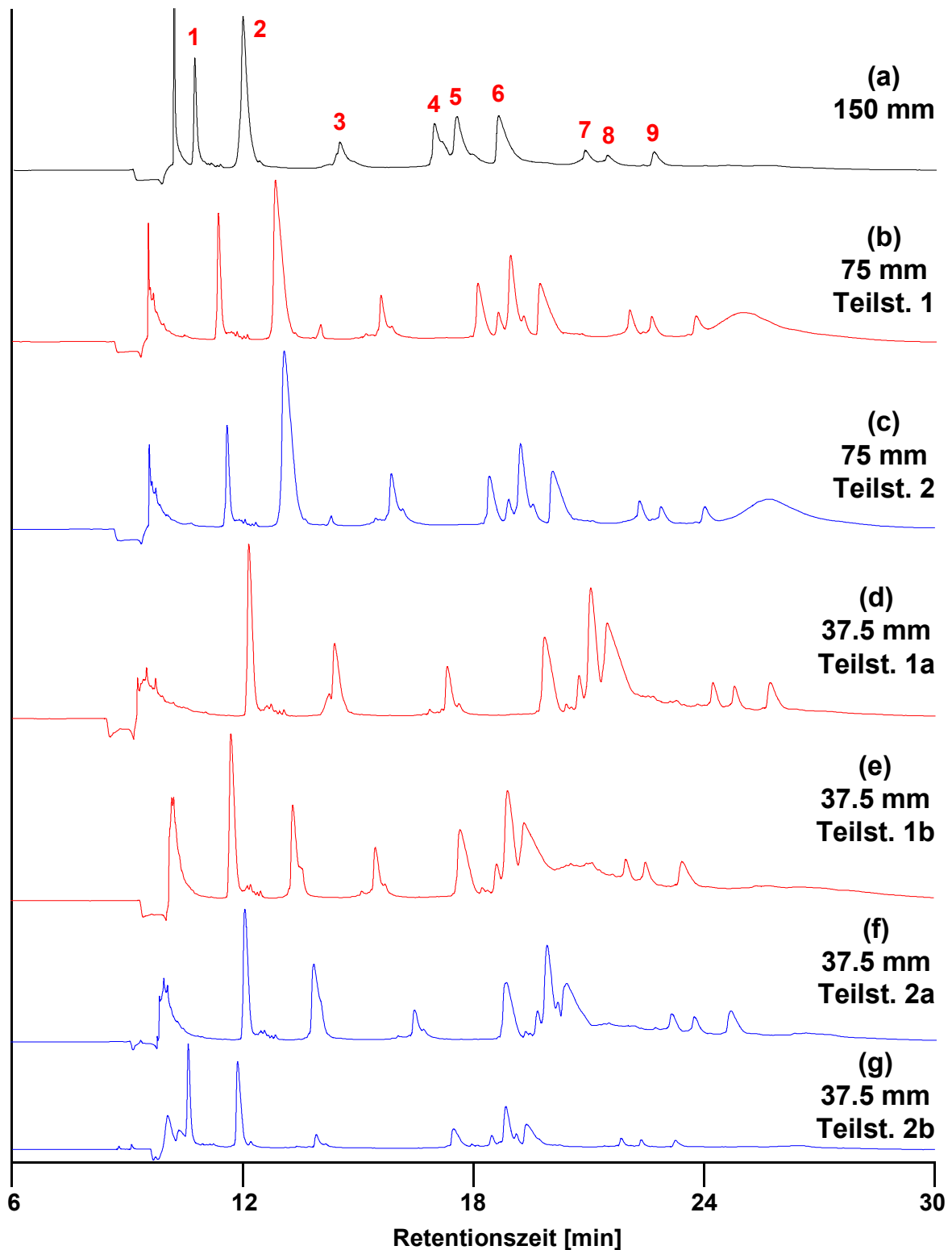
**Abbildung 2.49.** Trennung einer 9er Protein-Mischung auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005#3) mit Verwendung des GVK.

Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: (a) 16-32% ACN in 18.5 min, (b,c) 16-32% ACN in 9.25 min, (d-g) 16-32% ACN in 4.63 min; Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 55°C; 214 nm; Probe: 10 ng.



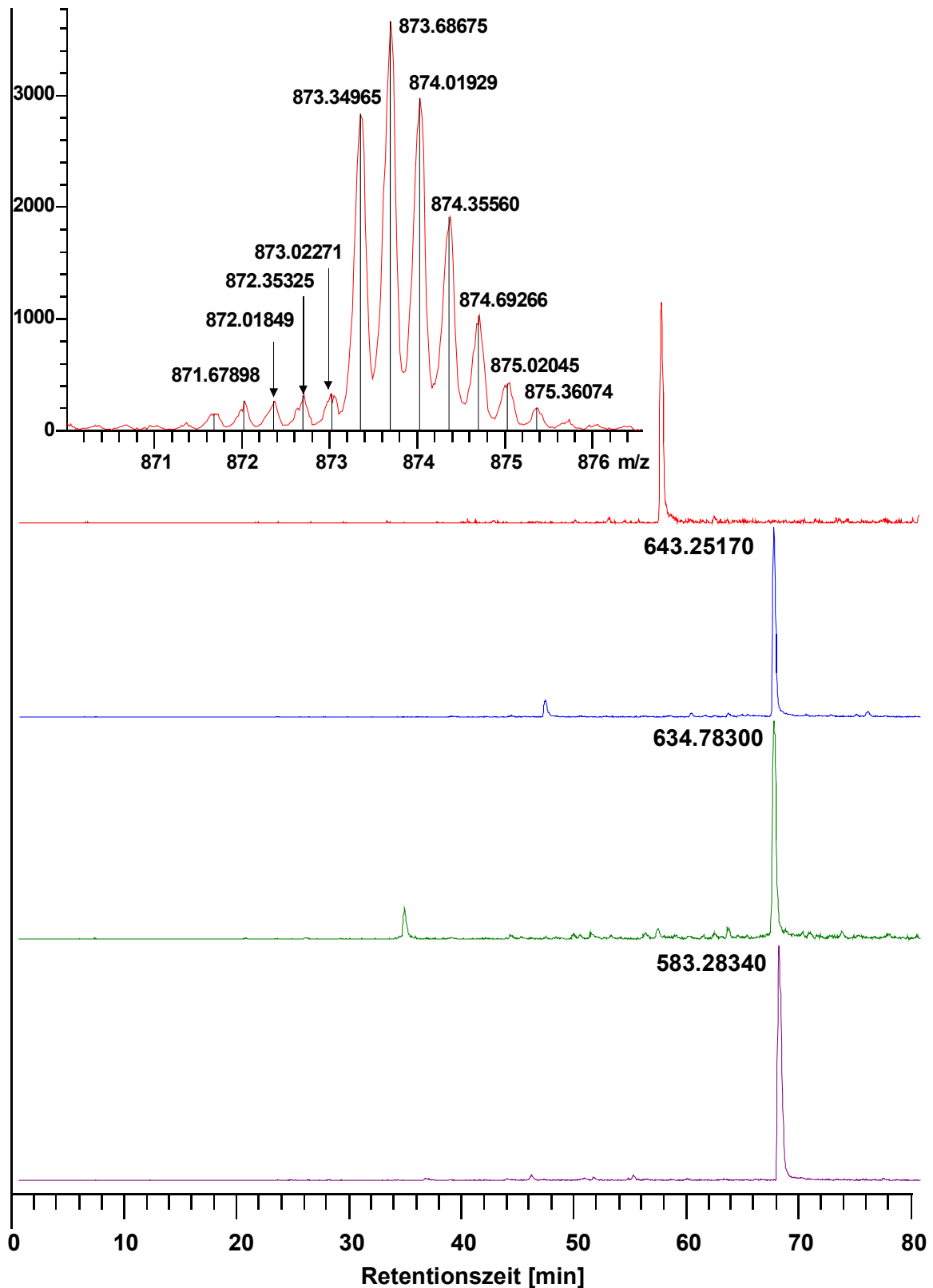
**Abbildung 2.50.** Trennung eines P2693 Peptid-Standards auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005#3) ohne Verwendung des GVK.

Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: 0-50.4% ACN in 7.5 min; Fluss: 2  $\mu$ l/min; Temperatur: 55°C; 214 nm; Probe: 0.25 ng.

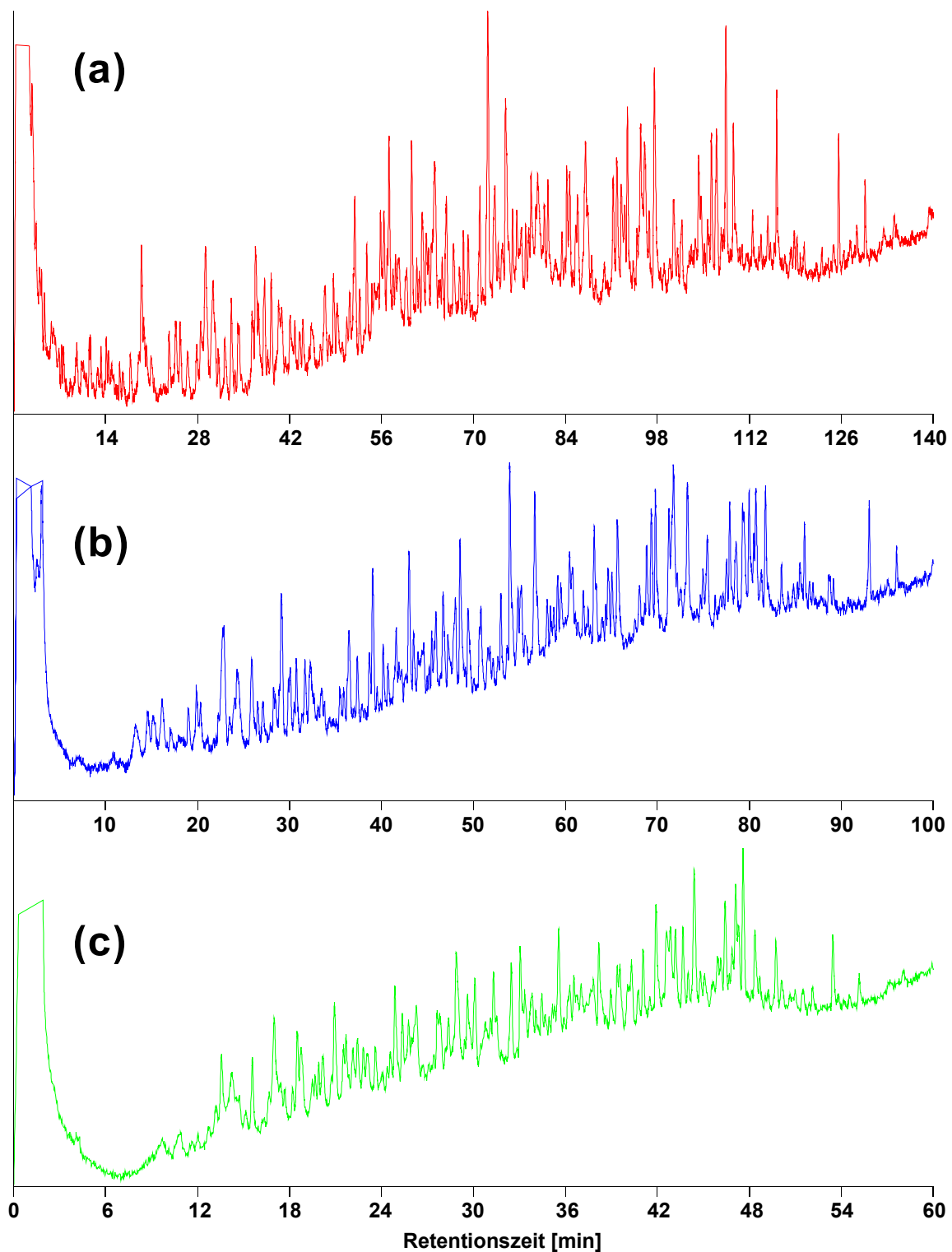


**Abbildung 2.51.** A Trennung einer 9er Protein-Mischung auf einem PS/DVB-Monolithen (22-03-2005#3) ohne Verwendung des GVK.

Säule: PS/DVB-Monolith, 150 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% Trifluoressigsäure in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: 16-32% ACN in 18.5 min; Fluss: 2  $\mu$ l/min; Temperatur: 55°C; 214 nm; Probe: 10 ng.

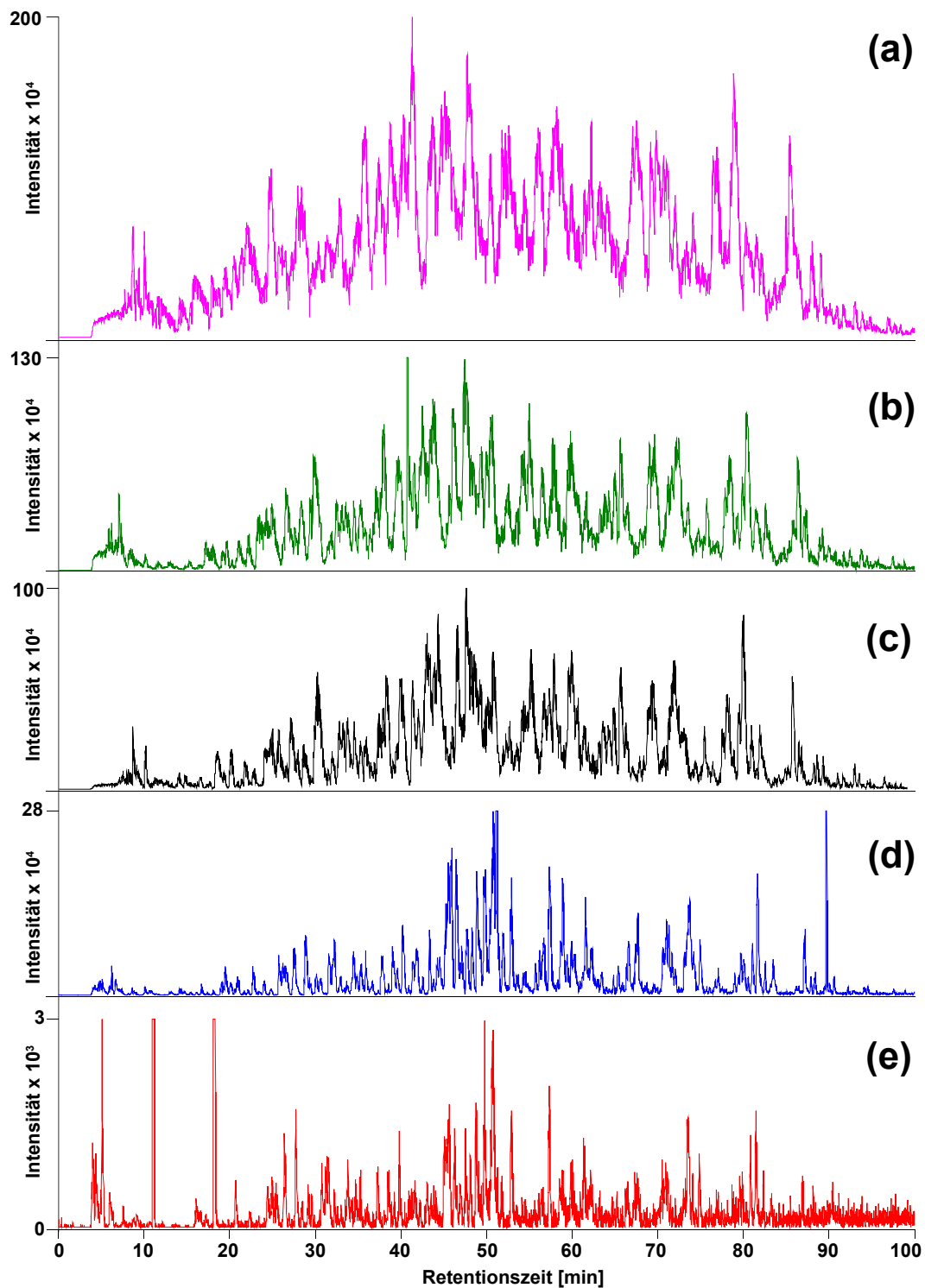


**Abbildung 2.52.** Overlay von vier verschiedenen Peptiden (Einzelionenspuren) des BSA-Thyroglobulin-Verdaus, gemessen auf einem gekoppelten 210 mm PS/DVB-Monolithen. Die Massengenauigkeit des Systems wird exemplarisch anhand eines Peptides mit einem m/z von 873.68675 demonstriert.



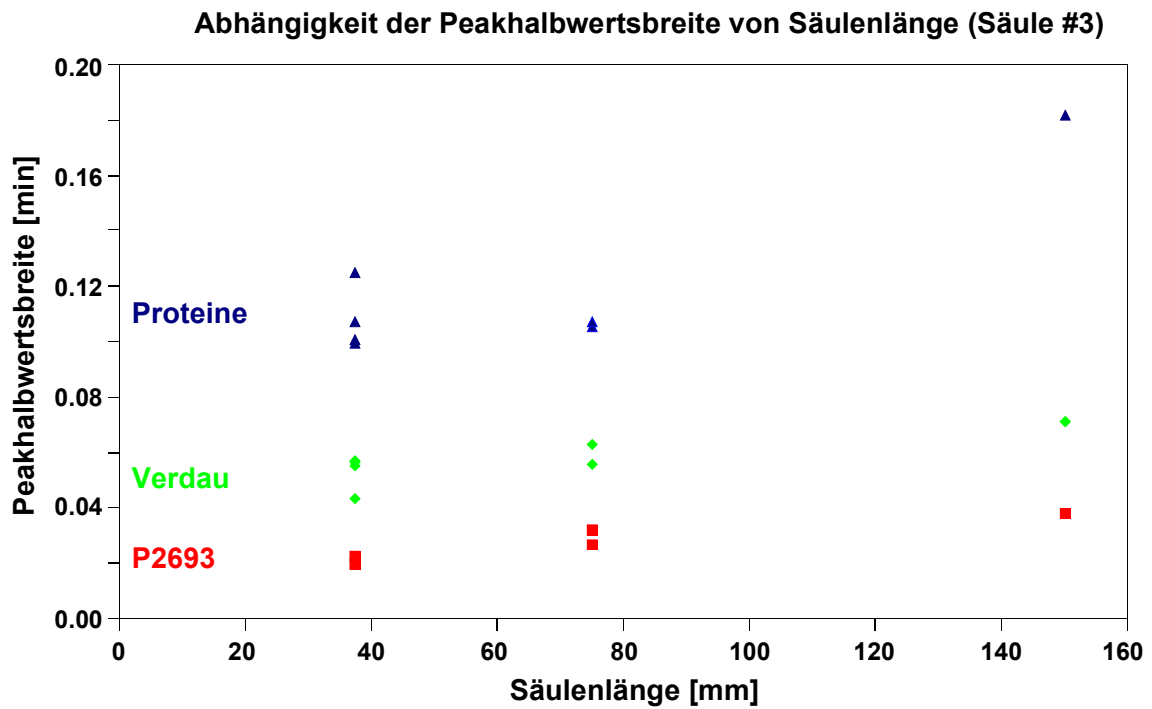
**Abbildung 2.53.** UV-Chromatogramm für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdau auf einer 210 mm Säule (Säule L<sub>2</sub>).

Säule: PS/DVB-Monolith, 210 x 0.2 mm i.D.; Laufmittel: (A) 0.05% TFA in Wasser, (B) A+80% ACN; linearer Gradient: 0-60% ACN in 180 min (a), 120 min (b), 60 min (c); Fluss: 1.5 µl/min; 55°C; 214 nm; Probe: BSA 1.02 pmol/µl, Thyroglobulin: 0.71 pmol/µl; Injektionsvolumen: 1.0 µl.



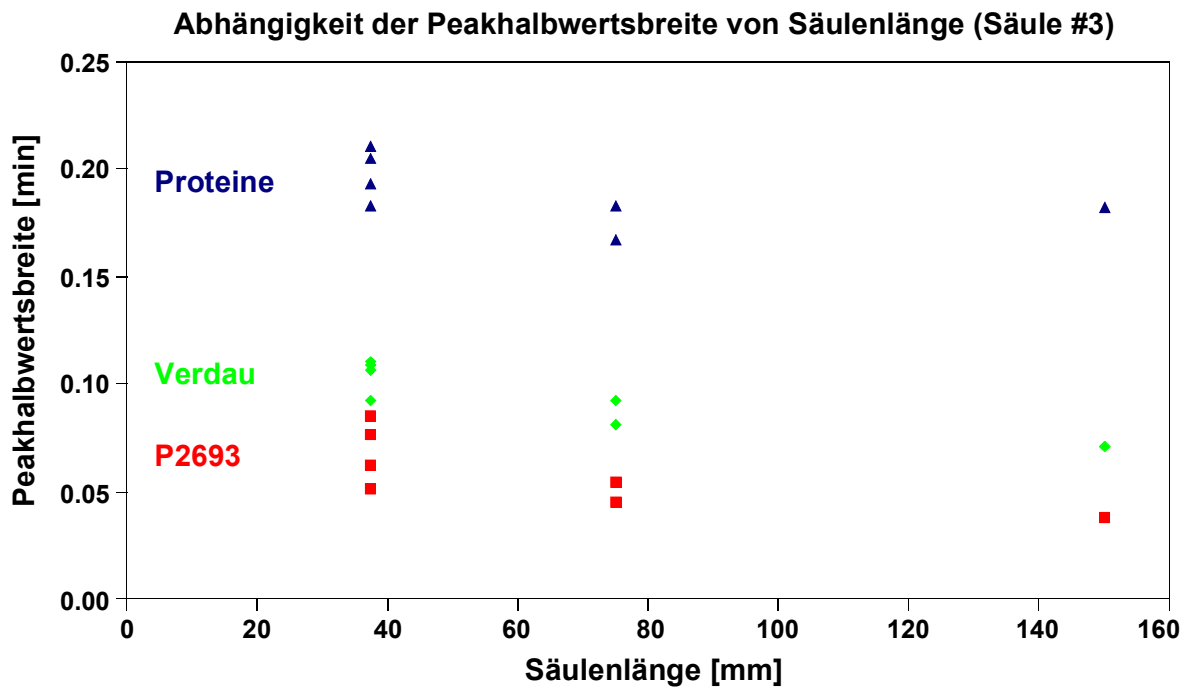
**Abbildung 2.54.** Rekonstruiertes Totalionenstromchromatogramm (RTICC) für die Trennung eines BSA-Thyroglobulin-Verdaus auf einer 250 x 0.2 mm i.D. Säule. Säule: PS/DVB-Monolith, 250 x 0.2 mm i.D.; (A) 0.05% TFA in Wasser, (B) A+80% ACN; Gradient: 0-60% ACN in 120 min; Fluss: 1.5 µl/min; 55°C; Scan: 100-3000 m/z; Trockengas: 4 l/min; Probe: 8.054 µg (a), 3.796 µg (b), 2.684 µg (c), 0.536 ng (d), 0.133 ng (e).

### 3. Abbildungen

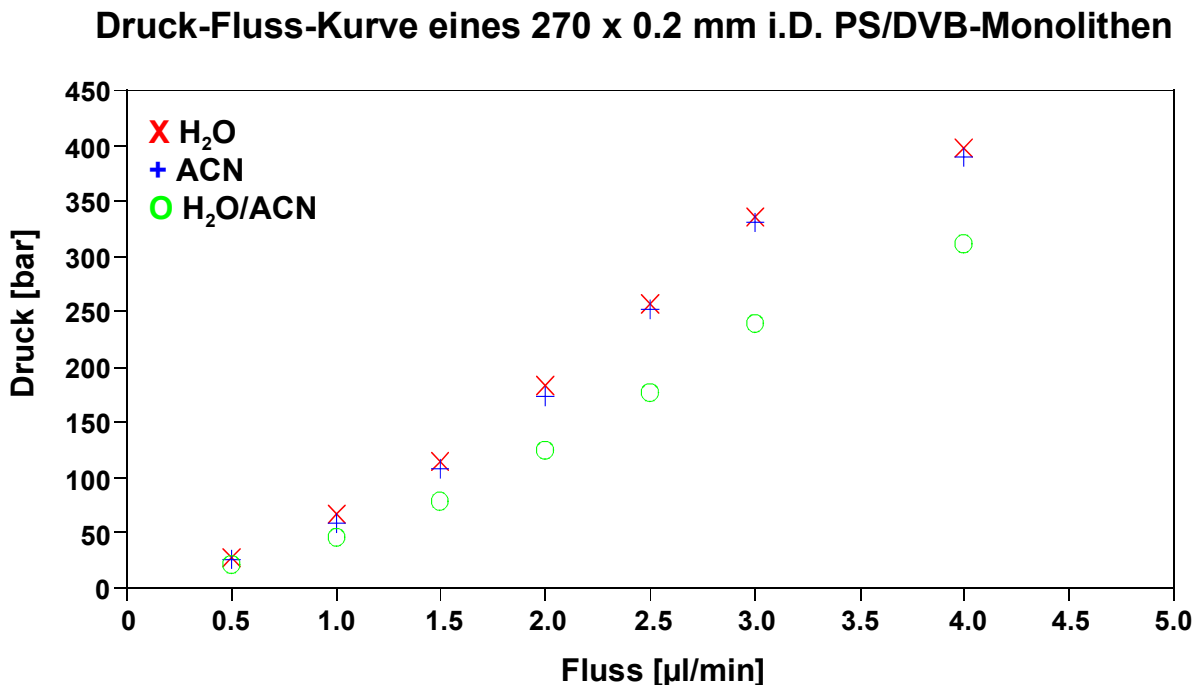


**Abbildung 2.55.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für verschiedene Analyten (Säule 22-03-2005#3). Für jede Säulenlänge wurde der Mittelwert aus allen Peakhalbwertsbreiten ermittelt und gegen die Säulenlänge aufgetragen (mit GVK).





**Abbildung 2.56.** Abhängigkeit der Peakhalbwertsbreite von der Säulenlänge für verschiedene Analyten (Säule 22-03-2005#3). Für jede Säulenlänge wurde der Mittelwert aus allen Peakhalbwertsbreiten ermittelt und gegen die Säulenlänge aufgetragen (ohne GVK).



**Abbildung 2.57.** Druck-Fluss-Kurve eines 210 x 0.2 mm i.D. PS/DVB-Monolithen bei 25°C. Zur Bestimmung der Druck-Fluss-Kurve wurden verschiedene Laufmittel und Flussraten zwischen 0.5-5.0 µl/min verwendet.

# Kapitel 3

---

**Entwicklung eines Retentionszeit-  
vorhersagemodells für synthe-  
tische Oligonukleotide**

---

## **3. Entwicklung von Retentionszeitvorhersage-Modellen für die Anwendung in der IP-RP HPLC**

### **3.1. Einführung**

Trotz der weit verbreiteten Anwendung der Chromatographie in den verschiedensten analytischen Arbeitsfeldern stellt die exakte Vorhersage des Retentionsverhaltens der Analyten die Wissenschaft immer noch vor ein großes, und in vielen Punkten noch weitgehend ungelöstes Problem. Ein guter Überblick über einige bereits etablierte Modelle wird von R.M. Smith in seinem Buch „Retention and Selectivity in liquid chromatography“ gegeben [1]. Die Probleme bei der Vorhersage der Retention können teilweise mit den sehr komplexen Vorgängen begründet werden, die in der Hochleistungsflüssig-Chromatographie (RP oder IP-RP-HPLC) ablaufen [2-5]. So wird das Retentionsverhalten in der HPLC von vielen verschiedenen Faktoren wie der Temperatur [6-8], den molekularen Eigenschaften des gelösten Stoffes [9], der verwendeten stationären Phase [10] oder der Laufmittelzusammensetzung [9,11,12] bestimmt. Während einige dieser Faktoren und ihr Einfluss auf die Retention bereits gut verstanden sind (Temperatur und Laufmittelzusammensetzung), ist der Effekt anderer wichtiger Parameter auf das Retentionsverhalten, wie die Struktur der Analyten, auch heute noch in großen Teilen nicht verstanden.

Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit der Vorhersage des Retentionsverhaltens auseinander gesetzt haben und die dabei sehr unterschiedliche Lösungsansätze verfolgen, dieses komplexe und schwierige Problem zu lösen. Einige dieser Modelle werden im folgenden Kapitel kurz erläutert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun, durch die Verwendung von Support-Vektor-Maschinen, ein neuer Ansatz gewählt. Der Vorteil dieses Verfahrens, das auf dem Prinzip des künstlichen Lernens basiert ist, dass es die Einbeziehung struktureller Eigenschaften für die Vorhersage des Retentionsverhaltens ermöglicht.

Prinzipiell unterscheidet man bei der Vorhersage der Retention zwei verschiedene Ansätze. Während eine Methode die Struktur des Analyten in die Vorhersage einbezieht, basiert die zweite auf einer Vorhersage ohne Berücksichtigung der

Struktur, was jedoch vor allem bei Biomolekülen oft nur zu sehr unbefriedigenden Ergebnissen führt.

Einer dieser Ansätze ist das Modell der Additiven Retentionsvorhersage (A.M.), das vor allem bei komplexen Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren angewandt wird. Bei diesem Modell wird die Retention durch Addition empirisch ermittelter Retentionsbeiträge der individuellen Aminosäuren bzw. Nukleotide ermittelt und anschließend durch Terme korrigiert, die die Gesamtstruktur des Moleküls berücksichtigen [13-17]. Ein weiterer weit verbreiteter Ansatz verwendet Lineare Freie Enthalpiebeziehungen (LFER), um Retention zu modellieren. Bei diesem Ansatz wird die Retention aus der Summe verschiedener Einzelbeiträge (Dispersions-, Dipol-Dipol-,  $\pi$ - $\pi$ -, Protonen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen usw.) ermittelt [10,18-26]. Alternative Modelle basieren auf Quantitativen Struktur-Retentions-Beziehungen (QSRR) [17,18,27-40], Linearen Lösemittelstärke-Theorien (LSST/LSS) oder Quantitativen Struktur-Enantiomeren-Retentions-Beziehungen (QSERR) [41]. Aus einigen dieser Modelle wurden bereits Computerprogramme (Drylab, PESOS, ICOS, DIAMOND) entwickelt, die zur Abschätzung des Retentionsverhaltens verwendet werden können [42,43]. Die meisten dieser Computerprogramme basieren auf Mapping-Methoden, chemometrischen oder iterativen Techniken.

Ein weiterer sehr viel versprechender Ansatz, der vor allem für Peptide entwickelt wurde, basiert darauf, dass die Retention nicht aus Eigenschaften der individuellen Molekülbausteine abgeleitet, sondern aus mit Testanalyten bekannter Struktur ermittelten Datensätzen erlernt wird [27]. So wurden z.B. die Retentionsdaten von ca. 7000 aus dem Proteom von *Deinococcus radiodurans* identifizierten Peptide dazu verwendet, ein künstliches neuronales Netzwerk (KNN) für die Vorhersage von Peptid-Retentionszeiten aus Peptidsequenzen aufzubauen [44]. Dabei werden bereits heute Genauigkeiten von 3-10 Prozent erzielt.

Ein weiteres Verfahren aus dem Bereich des statistischen Lernens sind die so genannten Supportvektormaschinen (SVMs). Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu KNN ist, dass sie zu exakt einer optimalen Lösung führen, während künstliche neuronale Netzwerke konvergierende Modelle sind, die oft nur zu einem lokal optimalen Modell führen. Im Bereich der Informatik und Mathematik bereits für die verschiedensten Anwendungen eingesetzt, wurde dieser Ansatz jedoch bis jetzt

noch nicht für die Vorhersage der Retention von Oligonukleotiden genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher dieses etablierte Verfahren zur Vorhersage der Retention von Oligonukleotiden unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen (Säule, Temperatur) genutzt werden. Das genaue Funktionsprinzip der Supportvektormaschinen wird im entsprechenden Kapitel (3.7.2) näher erläutert.

## **3.2. Literaturbeschriebene Modelle zur Vorhersage des Retentionsverhaltens in der HPLC**

### **3.2.1. Additiv mathematisches Vorhersagemodell**

Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, wurde versucht, das Problem der Retentionsvorhersage mittels einer Vielzahl verschiedener Modelle, mit unterschiedlichsten Ansätzen, zu lösen. Ein viel versprechender Modellansatz zur Retentionsvorhersage, besonders für die Anwendung im Bereich der Bioanalytik, basiert auf dem Prinzip der additiven Retention. Bei diesem Modell wird die Retention durch Addition empirisch ermittelter Retentionsbeiträge der individuellen Aminosäuren bzw. Nukleotide ermittelt und anschließend durch Terme korrigiert, die die Gesamtstruktur des Moleküls berücksichtigen [13-17]. Im Bereich der Retentionsvorhersage von Oligonukleotiden mittels additiver Retention ist vor allem die Arbeit von Gilar *et al.* [13] zu erwähnen. Die Gruppe um Martin Gilar bestimmte die, für die Berechnung erforderlichen empirischen Parameter auf der Basis von Homooligonukleotiden experimentell und entwickelte auf dieser Grundlage ein Vorhersage-Modell für die Retention allgemeiner Heterooligonukleotide, das besonders bei hohen Trenntemperaturen eine sehr gute Beschreibung des Retentionsverhaltens erlaubt. Damit dies jedoch überhaupt möglich ist, müssen verschiedene Annahmen gelten:

- 1.) Durch geeignete Wahl der Säulentemperatur kann das Entstehen von Sekundärstrukturen verhindert werden (60°C, Acetonitrilgehalt).

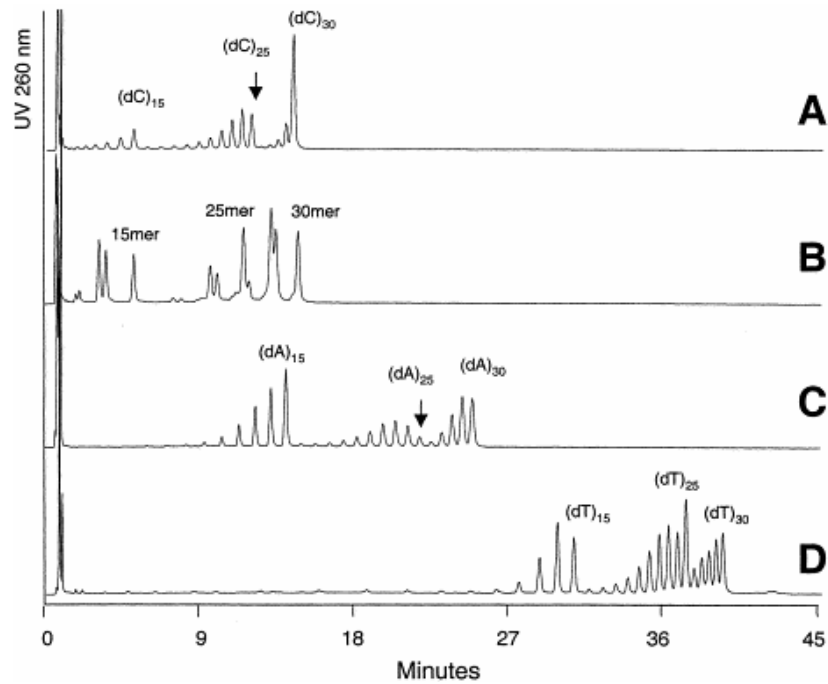
- 2.) Das Oligonukleotid wird in einer mobilen Phase mit einer Zusammensetzung unterhalb des kritischen Elutionsschwellenwertes vollständig an der stationären Phase adsorbiert. Wenn der Gradient die kritische Elutionsstärke der mobilen Phase erreicht, wird die Retention des Oligonukleotids unendlich gering, und das Oligonukleotid eluiert (on-off-Modell).
- 3.) Die kritische Elutionsstärke der mobilen Phase (Prozent Acetonitril) entspricht der Elutionsstärke der mobilen Phase zum Zeitpunkt der Elution des Oligonukleotidpeaks.
- 4.) Das Ausmaß der Ionenpaarbildung ändert sich nicht im Verlauf der Gradientenelution.

Experimentelle Untersuchungen von Gilar zeigten, dass zwischen der Länge des untersuchten Oligonukleotids und dem Gehalt an Acetonitril zum Zeitpunkt der Elution folgende logarithmische Beziehung besteht:

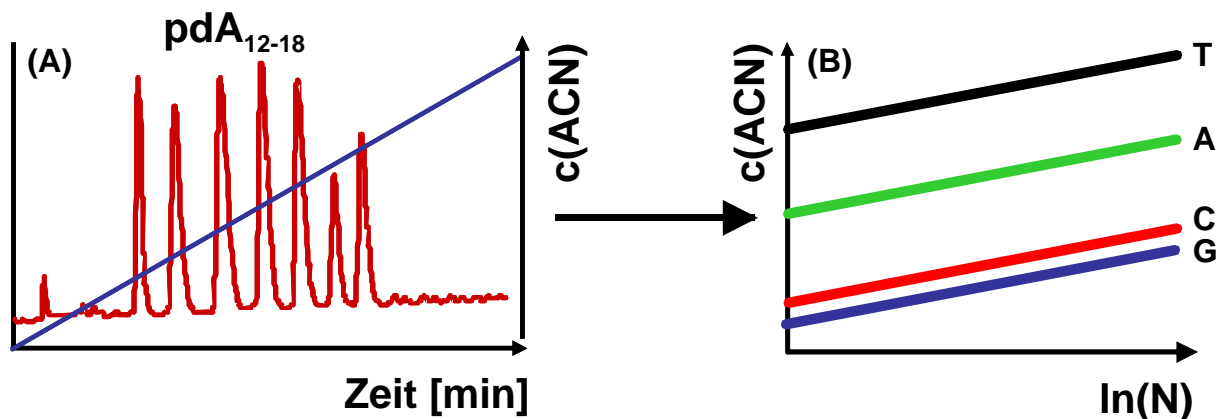
$$y = z \cdot \ln(N) + w$$

**Gleichung 3.1.** Logarithmische Beziehung in der IP-RP-HPLC zwischen der Länge des Oligonukleotids und dem Acetonitril- Gehalt zum Zeitpunkt der Elution.

In **Gleichung 3.1** repräsentiert die Variable  $y$  die Elutionsstärke der mobilen Phase (% Acetonitril) zum Zeitpunkt der Elution und  $N$  die Zahl der Nukleotide, während  $z$  und  $w$  Konstanten sind. Die Werte für die Stärke der mobilen Phase (% Acetonitril) zum Zeitpunkt der Elution wurden aus den Retentionszeiten der jeweiligen Homooligonukleotide bestimmt (**Abbildung 3.1**).



**Abbildung 3.1.** Trennung eines 10-30mer Oligodesoxycytidins (A), eines 10-30mer Oligonukleotids mit der Wiederholfsequenz  $(CCG)_n$  (B), eines 10-30mer Oligodesoxyadenosins (C) und eines 10-30mer Oligodesoxythymidins. Trennbedingungen: Säule: XTerra MS  $C_{18}$ , 50 x 4.6 mm, 2.5  $\mu\text{m}$ ; mobile Phase, (A) ACN-0.1 M Triethylammoniumacetat (5:95, v/v), pH 7.0, (B) ACN-0.1 M Triethylammoniumacetat (15:85, v/v), pH 7.0, linearer Gradient, 0-67.5 % B in 45 min; Flussrate 1 ml/min; Temperatur 60°C. (Quelle: [13]).



**Abbildung 3.2.** Schematische Darstellung der Ermittlung der empirischen Parameter anhand der Trennung eines Homooligonukleotids ( $\text{pdA}_{12-18}$ ) (A). (B) zeigt die Ermittlung der Parameter für die vier verschiedenen Nucleobasen (T=schwarz, A=grün, C=rot und G=blau) gemäß ihrer Hydrophobie.

Die Konstanten  $z$  bzw.  $w$  können durch eine logarithmische Regression aus der Auftragung der Stärke der mobilen Phase (% Acetonitril y-Koordinate) gegen die Anzahl  $N$  der Nukleotide (x-Achse) ermittelt werden (**Abbildung 3.2**).

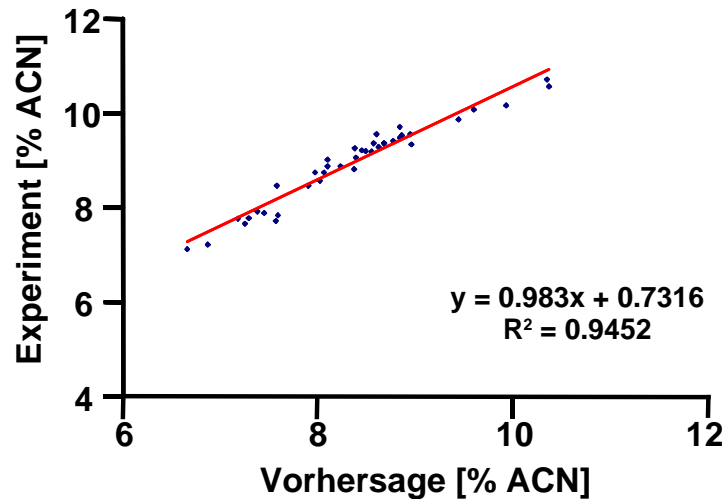
Für die Ermittlung der Konstanten wurden Homooligonukleotide mit einer Länge von 10-30 Basenpaaren verwendet (**Abbildung 3.1**), wobei vor allem die Trennung von Guanin-reichen Homooligonukleotiden ein in der Literatur bereits vielfach beschriebenes, generelles Problem in der HPLC darstellt [45-47]. Dies kann durch die extrem starken inter- und intramolekularen Wechselwirkungen von Guanin-reichen Sequenzen erklärt werden. Diese Wechselwirkungen bewirken, dass selbstkomplementäre Basen Loops oder Doppelstränge (self-association) ausbilden und dadurch das Retentionsverhalten beeinflussen. Ausgehend von den so ermittelten empirischen Koeffizienten, kann nun auch das Retentionsverhalten von Heterooligonukleotiden vorhergesagt werden. Dazu muss **Gleichung 3.1** wie folgt abgewandelt werden:

$$y = \left( \frac{n_a \cdot a + n_t \cdot t + n_c \cdot c + n_g \cdot g}{N} \right) \cdot \ln N + \left( \frac{n_a \cdot e + n_t \cdot f + n_c \cdot h + n_g \cdot i}{N} \right)$$

**Gleichung 3.2.** Gleichung zur Berechnung des Retentionsverhaltens von Heterooligonukleotiden basierend auf der Sequenz und der Gesamtlänge ohne Berücksichtigung struktureller Besonderheiten.

In **Gleichung 3.2** entsprechen die Konstanten  $a$ ,  $t$ ,  $c$  und  $g$  der  $z$ -Konstante aus **Gleichung 3.1** für jede einzelne Nukleinbase und die Konstanten  $e$ ,  $f$ ,  $h$  und  $i$  der entsprechenden Konstante  $w$ . Wie aus **Gleichung 3.2** ersichtlich, ergibt sich die Gesamtretention eines Heterooligonukleotids durch Addition der Retentionsbeiträge einzelnen Nukleobasen, wobei jedoch keine strukturellen Besonderheiten berücksichtigt werden. Durch die so ermittelten Werte konnte Gilar das Retentionsverhalten von Heterooligonukleotiden mit einer Länge von 10-60 Basen, bei erhöhten Temperaturen, sehr gut vorhersagen (**Abbildung 3.3**).





**Abbildung 3.3.** Vergleich zwischen experimentell ermittelter- und vorhergesagter Retentionszeit (via **Gleichung 3.2**) für 10-60mer Oligonukleotide bei einer Temperatur von 60°C.

Die Vorhersage für Sequenzen kleiner als 10-merer stimmt nicht exakt, da hier die in 4 gemachte Annahme laut Gilar nicht erfüllt werden. Für Oligonukleotide, die mehr als 60 Baseneinheiten enthalten, oder bei Erniedrigung der Trenntemperaturen wird die Ausbildung der Sekundärstruktur zu einem wichtigen Faktor. Da die Ausbildung dieser Sekundärstrukturen jedoch in Annahme 1 explizit ausgeschlossen wird, ist das Additive Modell somit für längere Oligonukleotide oder bei erniedrigten Trenntemperaturen nur stark eingeschränkt anwendbar.

Ein weiterer, entscheidender Nachteil dieses Additiven Modells ist, neben der Unzuverlässigkeit der Vorhersage bei niedrigen Temperaturen, die Tatsache, dass die empirischen Koeffizienten für jede Trenntemperatur erneut aufwändig bestimmt werden müssen. Eine Übertragung der bei Temperatur A bestimmten Konstanten, auf eine neue Temperatur B ist dabei nicht ohne eine massive Verschlechterung der Vorhersagequalität möglich. Somit ist das Additive Modell für die Realisierung eines praxistauglichen Retentionsvorhersage-Modells nur sehr bedingt geeignet.

### 3.2.2. Retentionsvorhersage mittels linearer Freier Enthalpiebeziehungen (LFER)

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, verwenden LFER-basierte Modelle verschiedene energetische Einzelbeiträge (Dispersions-, Dipol-Dipol-,  $\pi$ - $\pi$ -, Protonen-Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen, usw.), um das Retentionsverhalten eines Analyten vorherzusagen. Das LFER-Konzept geht dabei auf das von Kamlet und Taft entwickelte Linear Solvation Energy Relationship Modell (LSER) zurück [48-50]. Entwickelt wurde dieses Modell ursprünglich in der organischen Chemie, um Analyt- Lösemittel-Wechselwirkungen besser verstehen zu können [51]. Hierzu wurden von Kamlet und Taft vier solvatochrome Parameter des Lösemittels eingeführt:

- Polarität/Polarisierbarkeit ( $\pi^*$ )
- Wasserstoff-Brücken-Donator-Eigenschaften (Acidität,  $\alpha$ )
- Wasserstoff-Brücken-Akzeptor-Eigenschaften (Basizität,  $\beta$ )
- Korrekturfaktor  $\delta$  (beinhaltet strukturelle und elektronische Wechselwirkungen)

Laut Literatur basieren solvatochrome Phänomene auf den spektroskopischen Eigenschaften der Moleküle, die durch Lösemittelleffekte hervorgerufen werden (Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Analyten). Bestimmt werden können diese Parameter mittels spektrometrischer Messungen (UV-Vis, IR- und NMR). Dieses LSER-Konzept wurde bereits vielfach in der Gaschromatographie (GC) [52-57] und der HPLC [6,58,59] zur Beschreibung und Untersuchung von Trennungen verwendet.

Basierend auf diesem Konzept wurde für die Gaschromatographie von Rohrschneider [60,61] ein Modell zur Charakterisierung chromatographischer Eigenschaften und der Retentionszeitvorhersage entwickelt. Dazu entwickelte Rohrschneider einen relativen Retentions-Index-Wert  $\Delta I$  für fünf unterschiedliche Testsubstanzen (Benzol, Ethanol, Butanon, Nitromethan und Pyridon). Durch diese Testsubstanzen werden die verschiedenen möglichen Wechselwirkungen charakterisiert. Weiterhin geht Rohrschneider davon aus, dass sich die Gesamtretention aus der Addition der einzelnen Teilbeiträge ergibt, wobei er zur

Charakterisierung zwischen unpolaren (Dispersions-, London-Kräfte) und polaren (Induktions-, Orientierungs-, Ladungsüberführungskräften und Wasserstoffbrückenbindungen) Wechselwirkungen unterscheidet. Dieses Grundmodell wurde später von McReynolds [62] auf 10 Komponenten ausgeweitet und damit die Charakterisierung von 226 GC-Säulen erfolgreich durchgeführt. Dieses Rohrschneider-McReynolds-System hat sich heute als eines der leistungsfähigsten Modelle zur Vorhersage von Retention in der GC etabliert [51].

Im Gegensatz zu der großen Leistungsfähigkeit dieses Modells für die GC, ergeben sich bei seiner Anwendung in der HPLC viele Probleme. Diese können mit der weit höheren Komplexität eines HPLC Systems (zusätzliche Wechselwirkungen mit der mobilen Phase) erklärt werden. Genau wie in der GC beruht jedoch auch in der HPLC das LSER-Konzept auf der Aufspaltung der Gesamtretention in verschiedene Teilwechselwirkungen. Diese können mit folgender Gleichung beschrieben werden [51]:

$$\log k = (\log k)_0 + m(\delta_m^2 - \delta_s^2)V_2/100 + s(\pi_m^* - \pi_s^*) + a(\beta_m - \beta_s)\alpha_2 + b(\alpha_m - \alpha_s)\beta_2$$

**Gleichung 3.3.** Berechnung der Gesamtretention des LSER-Konzeptes aus molekularen Einzelwechselwirkungen.

Dabei setzt sich der Logarithmus des Retentionsfaktors ( $\log k$ ) aus einem unabhängigen Wert ( $\log k_0$ ), dem normierten Molvolumen des Analyten  $V_2/100$ , dem Hildebrandschen Löslichkeitsparameter  $\delta$  und den solvatochromen Parametern von Kamlet und Taft  $\pi^*$ ,  $\alpha$  und  $\beta$  zusammen. Weiterhin stehen in **Gleichung 3.3** die Indizes  $s$  für die stationäre und  $m$  für die mobile Phase des Systems, und der Index 2 stellt die Beziehung zum Analyten her [25]. Unter Verwendung des Hildebrandschen Löslichkeitsparameters  $\delta$  in der Form:  $\delta = \sqrt{\left(\frac{-E}{v}\right)}$ , wobei  $E$  die Kohäsionsenergie beschreibt, die benötigt wird, um ein Mol einer Substanz vom idealen Gaszustand in dessen flüssigen Zustand zu überführen ( $v$ =Molvolumen der Flüssigkeit [51]), kann **Gleichung 3.3** wie folgt vereinfacht werden:

$$\log k = (\log k)_0 + m_1 V_2 / 100 + s_1 \pi_2^* + a_1 \alpha_2 + b_1 \beta_2$$

**Gleichung 3.4.** Berechnung der Gesamretention aus molekularen Wechselwirkungen bei festgelegter mobiler und stationärer Phase.

In **Gleichung 3.4** hängen die Parameter  $m_1$ ,  $s_1$ ,  $a_1$  und  $b_1$  vom Löslichkeitsparameter  $\delta$ , der Polarität  $\pi^*$ , der Basizität  $\beta$  und der Acidität  $\alpha$  der stationären und mobilen Phase ab. Damit kann aus **Gleichung 3.4** eine gute Korrelation zwischen der Retention verschiedener Analyten bei gleicher stationärer und mobiler Phase hergeleitet werden. Sind also obige Parameter bestimmt, so kann man daraus für ein bestehendes und gut charakterisiertes System die Retention vorhersagen. Das Hauptproblem, das sich für die Beschreibung der Retention nach obiger Gleichung ergab ist, dass die benötigten Parameter nur sehr schwierig messtechnisch zugänglich sind und für einige, sehr seltene Analyten keinerlei Referenzdaten vorhanden sind. Ohne diese Daten jedoch ist eine exakte Vorhersage des Retentionsverhaltens nicht möglich. Um diesem Problem teilweise Rechnung zu tragen, führte Abraham zusätzliche Parameter ein, die direkt über die Analyten zugänglich sind [63]. Diese Parameter können durch Gleichgewichts-Messungen bestimmt werden. Solche Parameter sind z.B. der Verteilungskoeffizient zwischen einer organischen Phase (meist Oktanol) und Wasser [64], GC-Daten [60] und Daten, die sich auf die molekulare Struktur beziehen [63]. Daraus ergibt sich folgende Gleichung zur Bestimmung der Retention mittels LFER in HPLC-Systemen:

$$\log k = c + rR_2 + s\pi_2^* + a \sum \alpha_2^H + b \sum \beta_2^H + vW_x$$

**Gleichung 3.5.** Berechnung der Retention mittels LFER für die HPLC unter Einbeziehung der Abraham-Parameter.

In **Gleichung 3.5** stellt  $c$  einen konstanten Faktor,  $R_2$  den molaren Brechungsindex,  $\pi_2^*$  die Polarität/Polarisierbarkeit des Analyten,  $\sum \alpha_2^H$  die Acidität des Analyten und  $\sum \beta_2^H$  die Basizität des Analyten dar.  $V_x$  steht wiederum für das charakteristische Volumen nach McGowan. Die zur Lösung von **Gleichung 3.5** notwendigen Analyt-

Daten  $V_x$  und  $R_2$  werden durch Inkrementrechnungen [65] bestimmt, während alle weiteren Parameter durch multivariable Regression zugänglich sind. Dabei ist der Koeffizient  $r$  ein Maß für die Eigenschaft der stationären Phase, mit  $n$ - oder  $\pi$ -Elektronen des Analyten in Wechselwirkung zu treten, der Parameter  $s$  steht für Polarität/Polarisierbarkeit der Phase,  $a$  repräsentiert die Basizität der Phase, und  $b$  steht für die aciden Eigenschaften des Phasenmaterials. In **Gleichung 3.5** fließt die Hydrophobie durch den Koeffizienten  $v$  in die Berechnungen ein. Ein großer Vorteil des LFER-Modells ist, dass inzwischen für mehr als 2.000 verschiedene Verbindungen solvatochrome Daten zur Verfügung stehen [25]. Daher findet das LFER-Modell eine breite Anwendung in der HPLC [12,25,26,66-69].

Ein besonderes Problem bei der Anwendung des LFER-Modells stellt noch die in der Literatur irreführende Verwendung der Bezeichnungen LSER und LFER dar. Während Szepesy [25,26] streng zwischen dem ursprünglichen, auf spektroskopischen Daten basierenden **LSER-Konzept** und dem auf thermodynamischen Daten basierenden **LFER-Konzept**, differenziert, wird hingegen oft in der Literatur eine Vermischung beider Modelle durchgeführt.

Der Hauptnachteil des LFER-Modells besteht darin, dass eine exakte Vorhersage der Retention nur auf der Grundlage von exakten, experimentell bestimmten Daten möglich ist. Nur wenn das System aus Analyt, mobiler und stationärer Phase exakt charakterisiert ist, kann eine verlässliche Vorhersage des Retentionsverhaltens erfolgen. Da trotz aller Vereinfachungen die notwendigen Parameter experimentell bestimmt werden müssen, stellt dieses Modell keine optimale Methode zur Retentionszeitvorhersage dar. Auch ist die Ableitung neuer Parameter aus bereits bestimmten Parametern nur sehr bedingt bis gar nicht möglich, was zusätzlich die Anwendbarkeit dieses Verfahrens erheblich reduziert.

### **3.2.3. Anwendung von Quantitativen Struktur-Retentions-Beziehungen (QSRR) zur Retentionszeitvorhersage in der HPLC**

Ein weiteres Modell, das zur Vorhersage von Retentionszeiten in der Chromatographie Verwendung findet, ist das so genannte Quantitative-Structure-

Retentions-Relationships (QSRR) – Modell. Bei diesem Modell handelt es sich um statistisch abgeleitete Beziehungen zwischen chromatographischen Werten und strukturellen Unterschieden der zu untersuchenden Analyten, wobei die Grundlage dieses Modells vom LFER-Konzept gebildet wird. Wichtige Anwendungsgebiete des QSRR-Modells, neben der Retentionsvorhersage, liegen vor allem in den Bereichen:

- Vorhersage der Retention neuer Analyten
- Identifizierung struktureller Eigenschaften
- Erkennung molekularer Mechanismen in chromatographischen Prozessen
- Bestimmung physikalisch-chemischer Eigenschaften von Analyten (z.B. Hydrophobie)
- Vorhersage biologischer Aktivität oder Materialeigenschaften

Dieses Modell, welches ursprünglich nicht direkt für die Chromatographie entwickelt wurde, hat sich im Laufe der letzten Jahre in zahlreichen Bereichen der RP-HPLC zu einem leistungsstarken Instrument entwickelt, wobei man vor allem drei verschiedene Anwendungsgebiete unterscheidet [70,71].

- a) Die ältesten bekannten Anwendungsfelder beschäftigen sich mit dem Vergleich der Retention und dem wichtigen Verteilungskoeffizienten Oktanol-Wasser:  $\log k \sim P$  [72,73].
- b) Weitere Anwendungen gründen auf dem solvatochromen Vergleich mit der oben beschriebenen LFER-Methode [6,25,26,50].
- c) Das dritte große Anwendungsfeld liegt im Bereich der theoretischen Chemie. Hier beschreibt das Modell log k-Werte durch quantenchemische Indizes bzw. strukturelle Beschreibungen der theoretischen Chemie [74-76].

Ein sehr großer Vorteil des QSRR-Modells liegt darin, dass es auch strukturelle Eigenschaften für die Retentionsvorhersage einbezieht. Wie jedoch bereits beim LFER-Konzept gesehen, liegt auch bei diesem Modell der Hauptnachteil in der komplizierten und zeitaufwendigen Bestimmung der für die Anwendung des Modells notwendigen Parameter. So ist auch bei diesem Modell eine einfache Übertragung bereits bestimmter Parameter (für bestimmte Testanalyten) auf artverwandte oder

vergleichbare Analyten nicht möglich. Daher ist die Realisierung eines praxistauglichen Retentionsvorhersage-Modells mittels QSRR-Modells nur sehr schwer möglich. Ein weiterer, entscheidender Nachteil dieses Modells ist, dass die benötigten Parameter stark von experimentellen Parametern, wie z.B. der Trenntemperatur, abhängen. Daher müsste, um eine möglichst exakte Vorhersage zu ermöglichen, für möglichst viele Trenntemperaturen ein entsprechender Datensatz experimentell bestimmt werden.

### 3.2.4. Weitere literaturbekannte Modelle zur Vorhersage des Retentionsverhaltens in der Chromatographie

Neben dem bereits beschriebenen Additiven Modell, der Vorhersage mittels LFER oder dem QSRR-Modell gibt es noch eine Vielzahl weiterer Modelle, die versuchen, das Retentionsverhalten von Analyten zu beschreiben und vorherzusagen.

Eines dieser Modelle ist das mit dem LFER-Modell verwandte, so genannte **LSST oder LSS-Modell** (linear solvent strength theory – siehe auch Kapitel 2). Bei diesem Modell wird das Retentionsverhalten eines Analyten als Funktion der Zusammensetzung der mobilen Phase beschrieben. Dabei sind alle experimentell bestimmten Parameter charakteristisch für den untersuchten Analyten und können daher auch nicht auf andere Analyten übertragen werden. Da dieses Modell ebenfalls sehr stark von weiteren experimentellen Parametern wie Temperatur, stationäre Phase oder Laufmittelzusammensetzung abhängt, ist es nicht zur Einrichtung eines praxistauglichen Vorhersagemodells geeignet.

Ein weiteres in der Literatur beschriebenes Vorhersagemodell ist das von Kaliszan und Noctor eingeführte **QSERR-Modell** (quantitative structure-enantioselective retention relationships [41], das eine Spezialform des bereits in Kapitel 2.2.3 beschriebenen QSRR-Modells darstellt. Bei diesem Modell wird versucht, quantitative Strukturbeziehungen für die Vorhersage der Retention von Enantiomeren zu nutzen. Bei Enantiomeren handelt es sich um Stereoisomere, deren räumliche Strukturen sich wie Bild und Spiegelbild verhalten, ansonsten jedoch keinerlei strukturelle Unterschiede aufweisen.

Da diese sich nur in der räumlichen Anordnung von Substituenten an asymmetrischen Kohlenstoffatomen unterscheiden, stellt die Vorhersage der Retention solcher Analyten besondere Anforderungen an die Leistungsfähigkeit des Vorhersagemodells. Auch bei diesem Modell müssen bestimmte analyt-spezifische Parameter bestimmt werden, die für die Vorhersage benötigt werden. Aufgrund der Struktur der Enantiomere sind diese jedoch nur sehr schwer zugänglich, und somit ist eine exakte Retentionsvorhersage sehr schwierig zu realisieren.

In Zeiten leistungsfähiger Computersysteme nimmt auch die Zahl der computergestützten Vorhersagesysteme dramatisch zu. Einer dieser neuen und versprechenden Ansätze, der von Kaliszan und Baczek entwickelt wurde und vor allem für Vorhersage von Peptiden geeignet ist, basiert darauf, dass die Retention nicht aus Eigenschaften der individuellen Molekülbausteine abgeleitet wird, sondern aus mit Testanalyten bekannter Struktur ermittelten Datensätzen erlernt wird [27]. Ein wesentlicher Vorteil dieser „lernenden Systeme“ ist, dass die bereits aus bestimmten Analyten ermittelten Parameter relativ problemlos auf unbekannte Analyten übertragen werden können. Somit fällt die schwierige und zeitaufwändige Neubestimmung der vorhersagerelevanten Parameter weg.

### **3.3. Einflussfaktoren auf das Retentionsverhalten von Oligonukleotiden in der IP-RP-HPLC**

Entscheidend für die Entwicklung leistungsfähiger Retentionsvorhersage-Modelle ist die genaue Kenntnis der Einflussfaktoren, die das Retentionsverhalten von Oligonukleotiden beeinflussen. Das Retentionsverhalten von Oligonukleotiden wird in der IP-RP-HPLC von folgenden Faktoren bestimmt:

- Gesamtladung (Anzahl der Phosphodiestergruppen)
- Hydrophobie (Basensequenz, Art und Verteilung der Nukleobasen)
- Sekundärstruktur (Möglichkeit zur Interaktion mit der Oberfläche der stationären Phase)
- Parameter des Trennsystems (pH, Temperatur, chromatographischer Modus [77], stationäre und mobile Phase)



Neben diesen Faktoren muss bei der Untersuchung des Retentionsverhaltens von Oligonukleotiden vor allem zwischen Homooligonukleotiden, die nur aus einer einzelnen Nukleobase bestehen, und Heterooligonukleotiden, die aus verschiedenen Nukleobasen aufgebaut sein können, unterschieden werden [78]. Trotz der Vielzahl der verschiedenen Modelle gibt es bis heute noch keine eindeutige Theorie, die das Retentionsverhalten von Oligonukleotiden fehlerfrei beschreiben kann. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Retention von vielen unterschiedlichen Parametern beeinflusst wird, die sich gegenseitig mehr oder minder stark beeinflussen. Aufgrund der Komplexität der Vorgänge während einer chromatographischen Trennung ist es sehr schwierig, alle relevanten Parameter gleichzeitig und unabhängig von einander zu erfassen und ihren direkten Einfluss auf das Retentionsverhalten zu bestimmen.

Bereits bei den jeweiligen Einzelfaktoren, wie z.B. der Hydrophobie der einzelnen Nukleobasen, gibt es in der Literatur große Unterschiede. So existieren mehrere Arbeiten, in denen versucht wurde, die Hydrophobie der einzelnen Basen zu bestimmen. So ermittelte Ikuta [79] für ein Umkehrphasen-System eine empirische Gleichung, mit deren Hilfe die Gesamthydrophobie eines Oligonukleotids bestimmt werden kann. Lee und Kindsvater [80] stellten in ihrer Arbeit fest, dass die Hydrophobie der einzelnen Nukleobasen bei einem pH-Wert von 7.0 in der Reihenfolge  $C < G < T < A$  ansteigt. Die Pyrimidinbase Cytosin besitzt die geringste Hydrophobie, da sie neben der polaren Aminogruppe noch zusätzlich eine Carboxylgruppe enthält. Guanin besitzt eine geringere Hydrophobie als Adenin, da es im Vergleich zum Adenin, das nur eine polare Aminogruppe besitzt, zusätzlich noch über eine polare Carboxylgruppe verfügt. Im Gegensatz zu Lee und Kindsvater gibt Oefner jedoch, dem es als ersten gelungen ist die reinen Homooligonukleotide des Cytidins und Guanosins zu trennen [45], eine abweichende Hydrophobie der einzelnen Nukleobasen an. Aufgrund seiner experimentellen Befunde wurde für die Retention von Homooligonukleotiden auf PS-DVB- $C_{18}$ -Phasen die Reihenfolge  $G < C < A < T$  vorgeschlagen.

Neben der Hydrophobie kann die Retention der Oligonukleotide vor allem auch stark durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen beeinflusst werden. Dies ist u.a. der Grund, warum viele Retentionsvorhersage-Modelle, die diese Sekundärstrukturen nicht berücksichtigen (z.B. Additives Vorhersagemodell von Gilar und Otvos), nur für

HPLC-Trennungen angewendet werden können, bei denen die Trenntemperatur die Ausbildung solcher Sekundärstrukturen verhindert. Reduziert man die Trenntemperatur, so treten bei den meisten Modellen erhebliche Diskrepanzen zwischen experimentellen und vorhergesagten Retentionszeiten auf. Dies wird im späteren Teil dieser Arbeit noch genauer erläutert und anhand von experimentellen Daten bestätigt. Um solche strukturellen Unterschiede zu ermitteln, können z.B. molekulardynamische Simulationen durchgeführt werden. Molekulardynamische Simulationen [81-84] sind ein essentielles Hilfsmittel auf dem Gebiet der modernen Bioforschung, wobei deren Grundlagen dabei auf das Lösen der Newton'schen Bewegungsgleichungen für alle Atome zurück gehen, was eine zeitliche Entwicklung des Moleküls, beginnend von einem beliebig gewählten Startpunkt, erlaubt. So können strukturelle Unterschiede erkannt und untersucht werden.

### **3.4. Experimenteller Teil**

#### **3.4.1. Chemikalien und Oligonukleotide**

Acetonitril (HPLC, far UV), Formamid und Essigsäure (p.a.) wurden von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) bezogen. Triethylamin (p.a.) und Ethylendiamintetraacetat EDTA (p.a.) wurden von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) erworben. Die synthetischen Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) und Biospring (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Der zum Testen der monolithischen Trennsäulen verwendete p(dT)<sub>12-18</sub>-Standard wurde bei Amersham Bioscience Europe GmbH (Freiburg, Deutschland) erworben. Das verwendete Kohlendioxid 4.5 stammte von der Firma Praxair (Luxemburg). Das bei allen Versuchen verwendete Wasser wurde mit einem Wasseraufbereiter Marke Purelab Ultra Genetic (Reinstwasser) der Firma Elga (Siershahn, Deutschland) hergestellt. Die Multiplexprimer wurden dankenswerter Weise vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Walter (Lehrstuhl für Genetik/Epigenetik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) zur Verfügung gestellt.

### 3.4.2. HPLC-Laufmittel

Eine 1.0 M Stammlösung von Triethylammoniumacetat (TEAA) wurde durch Titration von wässrigem Triethylamin und Essigsäure auf pH 7.0 eingestellt. Aus dieser Stammlösung wurden die jeweiligen, entsprechend konzentrierten TEAA-HPLC-Laufmittel-Lösungen durch Verdünnen und anschließender Zugabe von Acetonitril hergestellt. Der angegebene pH-Wert der jeweiligen Eluenten wurde mittels elektronischem pH-Meter mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.1$  Einheiten eingestellt und entsprach damit immer dem Wert, der vor der Zugabe des organischen Solvens gemessen wurde. Alle verwendeten Laufmittel wurden vor ihrer Verwendung 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

### 3.4.3. Geräte und Säulen

#### Die analytischen HPLC-Systeme für die Retentionsstudie

Für die Vergleichsmessungen auf der Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-C<sub>18</sub>-Säule (50 x 4.6 mm I.D.) wurde im Rahmen der Retentionsstudie ein analytisches HPLC-System der Marke Summit (Dionex, Deutschland), verwendet. Dieses HPLC-System bestand aus einer binären, analytischen Hochdruck-Gradienten-Pumpe (Modell Summit P680A, HPG-2, Dionex), einem Vakuumentgaser (Modell Degasys DG-1210, Dionex), einem analytischen Autosampler mit integrierter Temperaturregulierung (Modell Summit ASI-100T, Dionex), einem Säulenofen (Modell Thermostat TCC-100, Dionex) und einem dualen UV-Wellenlängen-Detektor (Modell 2487, Waters, Milford, MA).

Grundlagenversuche im Vorfeld der Retentionsstudie, die den Einfluss der Prä-Coil bei der PS/DVB-C<sub>18</sub>-Säule sowie den Einfluss eines beheizten Injektionssystems auf die Trennleistung des HPLC-Systems untersuchten, wurden auf einem klassischen HPLC-System der Marke HP 1050 durchgeführt. Dieses bestand aus einer Niederdruckpumpe und einem Helium-Entgaser der Firma Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn, Deutschland), einem variablen Wellenlängendetektor der Firma Knauer (Berlin, Deutschland), einem Säulenofen (Modell Colum-Thermostat Jetstream 2 Plus, Knauer) und einem manuellen Injektor

(Modell 7125, Rheodyne, Rohnert Park, California, USA) mit einer 5  $\mu$ l Probenschleife.

### **Das Mikro-HPLC-System für die Retentionsstudie**

Die Messungen auf dem Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen (60 x 0.2 mm I.D.) und der C<sub>18</sub>-Silikasäule (150 x 0.25 mm I.D.) wurden mittels eines Mikro-Kapillar/Nano-HPLC-Systems (Modell Ultimate 3000, Dionex, Deutschland) durchgeführt. Dieses besteht aus zwei Niederdruck-Mikrogradienten-Pumpen (Modell LPG-3600, Dionex), einem Vakuumentgaser (Modell SRD-3600), einem integrierten Säulenofen und einem Fluss-Split-System (Modell FLM-3100, Dionex), einem Mikro-Autosampler (Modell WPS-3000, Dionex) und einem UV-Detektor (Modell UVD-3000, Dionex) mit einer 3nl-Z-Detektorzelle (Modell Ultimate, LC-Packings - A Dionex Company, Amsterdam).

### **Verwendete HPLC-Trennsäulen**

Für die Messungen auf dem Mikro-HPLC-System wurde ein Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolith (60 x 0.2 mm I.D.), der gemäß dem von Huber *et. al.* veröffentlichten Syntheseprotokoll [85] hergestellt wurde, und eine Vydac Everest C<sub>18</sub>-Silikasäule (150 x 0.25 mm I.D.) verwendet. Die analytische Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-C<sub>18</sub> Säule (50 x 4.6 mm I.D., 2  $\mu$ m Teilchengröße) wurde gemäß dem Huber *et. al.* veröffentlichten Protokoll [86] hergestellt.

### 3.4.4. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

#### Oligonukleotide zur Neu- und Weiterentwicklung der Retentionsstudie

In **Tabelle 3.1** sind diejenigen Sequenzen der Oligonukleotide aufgeführt, die zur Weiterentwicklung des Additiven Retentionsmodells von Gilar und zur Neuentwicklung des SVM-Modells verwendet wurden. Die markierten Bereiche der jeweiligen Sequenzen stellen Mutationen in Bezug auf die „Referenzsequenz (Nr. 37)“ dar. In dieser Studie wurden 39 Oligonukleotide untersucht, die durch eine die Varianz eines 24mers (GTA CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC) generiert wurden. Um den Einfluss der Gesamtlänge auf die Retention erfassen zu können, wurden zusätzlich 21 längere Oligonukleotide in einem Längenbereich zwischen 25-48 Nukleotiden und 8 kürzere mit 15-21 Nukleotiden untersucht. Für die Berücksichtigung möglicher Sekundärstrukturen wurden 4 weitere Sequenzen so ausgewählt, dass diese auch bei höheren Temperaturen stabile Haarnadelstrukturen ausbilden (Sequenzen 69-72 in **Tabelle 3.1**).

**Tabelle 3.1.** Sequenzen und molekulare Massen  $M_r$  der in der Retentionsstudie verwendeten synthetischen Oligonukleotide.

Nr.	Sequenz (5' -> 3')	Länge	MR
1	GTG CTC AGT GTA GCC CA <b>A</b> GAT GCC	24	7353.88
2	GTG CTC AGT GTA <b>ACC</b> CAG GAT GCC	24	7353.88
3	GTG CTC AGT <b>ATA</b> GCC CAG GAT GCC	24	7353.88
4	GTG CTC <b>AAT</b> GTA GCC CAG GAT GCC	24	7353.88
5	GTA CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC	24	7353.88
6	<b>ATG</b> CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC	24	7353.88
7	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT <b>CCC</b>	24	7329.85
8	GTG CTC AGT GTA GCC CAG <b>CAT</b> GCC	24	7329.85
9	GTG CTC AGT GTA GCC <b>CAC</b> GAT GCC	24	7329.85
10	GTG CTC AGT GTA <b>CCC</b> CAG GAT GCC	24	7329.85
11	GTG CTC AGT <b>CTA</b> GCC CAG GAT GCC	24	7329.85
12	GTG CTC <b>ACT</b> GTA GCC CAG GAT GCC	24	7329.85
13	<b>GTC</b> CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC	24	7329.85
14	<b>CTG</b> CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC	24	7329.85
15	GTG CTC AGT GTA <b>GGG</b> CAG GAT GCC	24	7449.94
16	GTG CTC AGT GTA <b>GCG GAG</b> GAT GCC	24	7449.94
17	GTG <b>CTT</b> CAG TGT AGC CCA GGA TGC C	25	7674.08
18	GTG <b>CTT TCA</b> GTG TAG CCC AGG ATG CC	26	7978.27

Fortsetzung **Tabelle 3.1.**

19	GTG CTT TTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC	27	8282.47
20	GTG CTT TTT CAG TGT AGC CCA GGA TGC C	28	8586.66
21	GTG CTT TTT TCA GTG TAG CCC AGG ATG CC	29	8890.86
22	GTG CTT TTT TTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC	30	9195.05
23	GTG CTC AGT GTA GCT CCA GGA TGC C	25	7674.08
24	GTG CTC AGT GTA GCT TCC AGG ATG CC	26	7978.27
25	GTG CTC AGT GTA GCT TTC CAG GAT GCC	27	8282.47
26	GTG CTC AGT GTA GCT TTT CCA GGA TGC C	28	8586.66
27	GTG CTC AGT GTA GCT TTT TCC AGG ATG CC	29	8890.86
28	GTG CTC AGT GTA GCT TTT TTC CAG GAT GCC	30	9195.05
29	GTG CTC AGT GTA GCC CAG TTT TGA TGC C	28	8586.66
30	GTG CTC AGT GTA GCC CAG TTT TTG ATG CC	29	8890.86
31	GTG CTC AGT GTA GCC CAG TTT TTT GAT GCC	30	9195.05
32	GTG CTC AGT GTA GCC CAG ACA GCC	24	7338.87
33	GTG CTC AGA GTA GCC CAG GAT GCC	24	7378.90
34	GTG CTC AAA GTA GCC CAG GAT GCC	24	7362.90
35	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAC AAC	24	7362.90
36	GTG CTC AGT GTA GCC CAG ACT GCC	24	7329.85
37	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC	24	7369.88
38	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCG	24	7409.91
39	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GGG	24	7449.94
40	GTG CTC AGT GTA GCC CAG ACA TCC	24	7313.85
41	GTG CTC AGT GTA GCC CAG AAT GCC	24	7353.88
42	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT ACC	24	7353.88
43	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCA	24	7393.91
44	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GAC	24	7393.91
45	GTG CTC AGT GTA GCC CGT GAT GCC	24	7360.86
46	GTG CTC AGT GTA GCC CAG ACA TAC	24	7337.88
47	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT AAC	24	7377.91
48	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GAA	24	7417.94
49	GTG CTC AGT GTA GCC CAT GAT GCC	24	7344.86
50	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCT	24	7384.89
51	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GAT	24	7408.92
52	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT TAA	24	7392.92
53	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GTT	24	7399.90
54	GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT TTT	24	7374.88
55	ATG CTT CAG TGT AGC CCA GTA	21	6421.28
56	ACT CAG TGT AGC CCA CGA TGC	21	6391.26
57	TGT AAC TTT CCA GGA TGC C	19	5778.85
58	GCT CAG TGT AGC CCA CGT T	19	5779.84
59	TAG CTT TCC AAG ATG CA	17	5169.47
60	TGT AGC TCC AAG ATG CC	17	5154.46
61	TAG CTT TCC AAG ATG	15	4567.07
62	TGT AGC TCC AAG ATG	15	4592.09
63	GTG CTC AGT ATA GCC CAG TTT TTT GAT GCC ATA	33	10109.68
64	CTC AGT GTA ACC CAG TTT TTT GAT GCC GTA GAT CAT	36	11016.27
65	GTG CTC AGT GTA ACC CAG TTT TTT GAT GCC GTA GAT CAT	39	11978.90

Fortsetzung **Tabelle 3.1.**

<b>66</b>	GTG CTC AGT GTA ACC CAG TTT TTT GAT GCC GTA GAT CAT AAA	42	12918.54
<b>67</b>	GTG CTC AGT GTA ACC CAG TTT TTT GAT GCC GTA GAT CAT AAA TTT	45	13831.13
<b>68</b>	GTG CTC AGT GTA ACC CAG TTT TTT GAT GCC GTA GAT CAT AAA TTT AGA	48	14786.77
<b>69</b>	GAG AGA GAG AGA GAG ATC TCT CTC TCT CTC TC	32	9824.51
<b>70</b>	GAG AGA GAG AGA TCT CTC TCT CTC	24	7352.89
<b>71</b>	GTG TGT GTG TGT ACA CAC ACA CAC	24	7352.89
<b>72</b>	GAG AGA GAT CTC TCT C	16	4881.27

**Sequenzen der Multiplex PCR-Primer**

In **Tabelle 3.2** sind die Sequenzen der Multiplexprimer aufgeführt, die als Realprobe zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des SVM-Modells verwendet wurden.

**Tabelle 3.2.** Sequenzen und molekulare Massen der PCR-Primer die als Realprobe zur Überprüfung des SVM-Modells verwendet wurden.

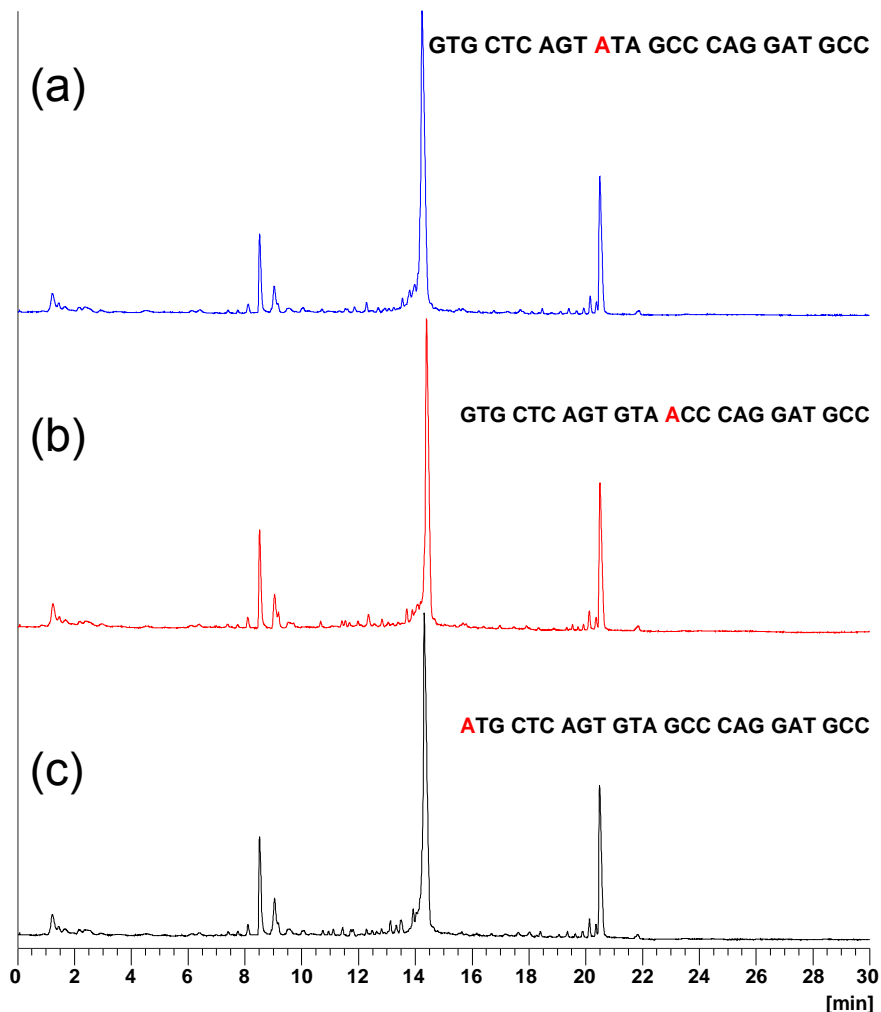
<b>Nr.</b>	<b>Sequenz ( 5´ -&gt; 3´ )</b>	<b>Länge</b>	<b>M<sub>r</sub></b>
<b>1</b>	GGG TTA ATT TGA GGT	15	4653.12
<b>2</b>	TAA GTT TTT TTT TGT TGT	18	5506.64
<b>3</b>	TTT AGT TAG AAA AAG TT	17	5247.55
<b>4</b>	GAA GAG TTT TTG GA	14	4357.94
<b>5</b>	GTT TAA ATA GGA AAT TT	17	5247.55
<b>6</b>	GTA GAG GTA GGT TGG	15	4728.18
<b>7</b>	GTT GGG ATT TTT GTA TTG	18	5581.70

**3.5. Eignung des Kapillar-HPLC-Systems zur präzisen und genauen Retentionsmessung**

**3.5.1. Einführung**

Im Rahmen dieser Studie wurde zunächst die Eignung des Kapillar-HPLC-Systems zur präzisen Messung der Retentionszeiten untersucht. Wie aus **Tabelle 3.1**

ersichtlich, wurden als Testsubstanzen für die Entwicklung der Retentionsstudie zahlreiche Oligonukleotide ausgewählt, deren Sequenzen sich oft nur um eine einzige Base (z.B. Sequenz 8, 37 und 41) oder um die Position einer Base innerhalb der Sequenz (z.B. Sequenz 1-6 Base Adenin, 7-14 Base Cytosin) unterscheiden. Ein Beispiel für die Trennung solcher Oligonukleotide, die sich nur in der Position einer einzelnen Nukleobase unterscheiden, ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 3.4.** Analyse von drei Oligonukleotiden, die sich nur um die Position einer Nukleobase in ihrer Sequenz unterscheiden, auf einem PS/DVB-Monolithen bei 80°C.

Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 40% ACN; linearer Gradient: 0-16% ACN in 30 min; Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 80°C; Probe: (dC)<sub>14</sub> (erster Peak), Oligonukleotid (zweiter Peak) und (dT)<sub>26</sub> (dritter Peak), (dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub> 1 ng/µl und Oligonukleotid 2.5 ng/µl.

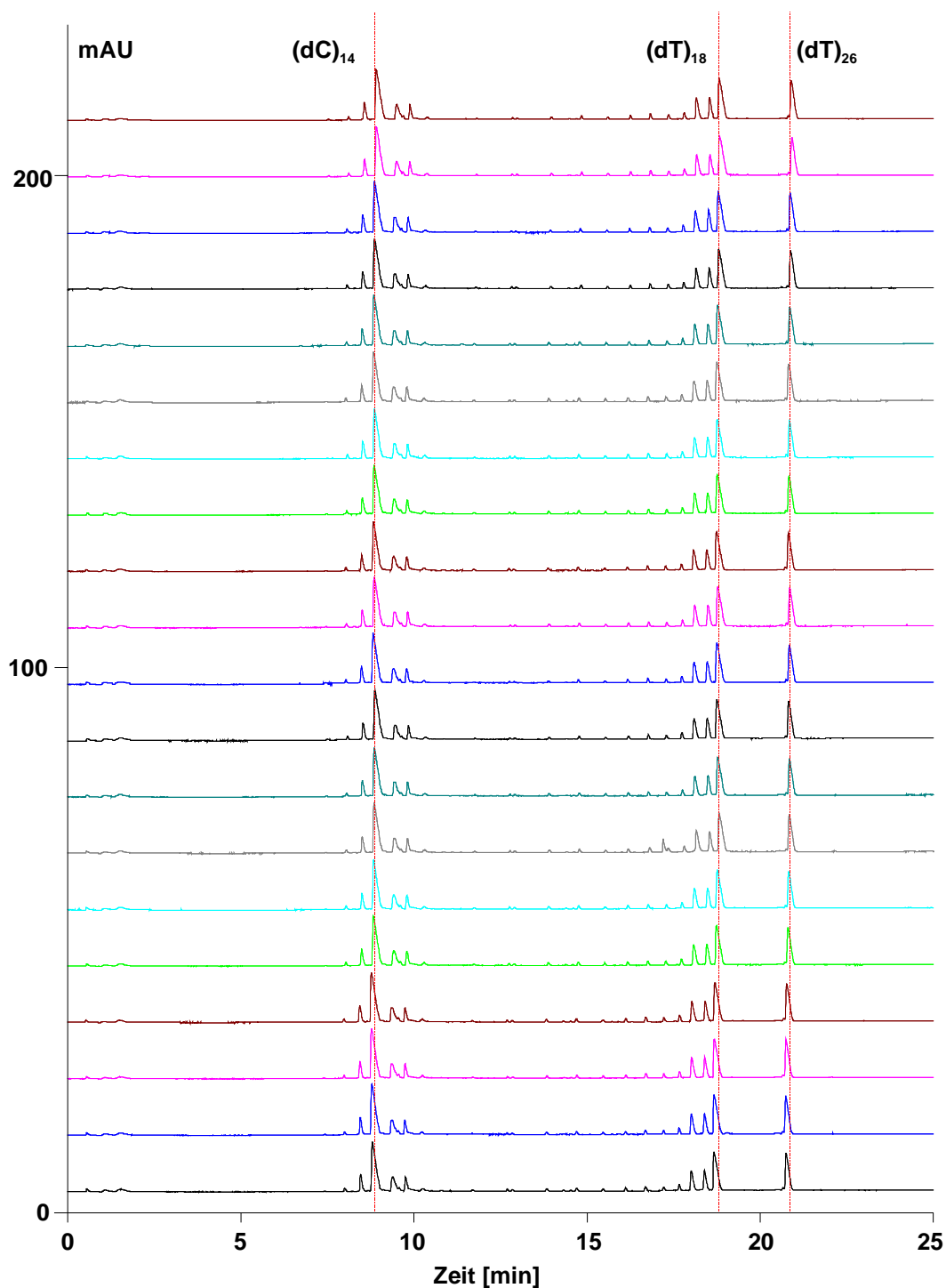


Wie aus **Abbildung 3.4** deutlich ersichtlich, unterscheiden sich die drei Oligonukleotide in ihren Retentionszeiten nur minimal. So eluiert das Oligonukleotid mit der Sequenz (c) nach 13.99 min, gefolgt von Sequenz (b) mit 14.00 min und (a) mit 14.08 min. Dies bedeutet, dass die drei Testsubstanzen sich nur um 0.7% in ihrer Gesamtretentionszeit unterscheiden. Dieses Beispiel macht deutlich, warum zur Entwicklung des Retentionszeitmodells sehr hohe Anforderungen an die Reproduzierbarkeit und Robustheit des Mikro-HPLC-Systems gestellt werden mussten. Um die Reproduzierbarkeit und Stabilität des neuen Dionex Ultimate 3000 Systems zu untersuchen, wurde in dieser Studie eine Mischung aus drei unterschiedlichen Oligonukleotiden ((dC)<sub>14</sub>, (dT)<sub>18</sub> und (dT)<sub>26</sub>) unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen (Temperatur, Gradientelution, unterschiedliche Acetonitril-Startgehalte (ACN-Startgehalt)) getestet. Als Säule wurde ein PS/DVB-Monolith (60 x 0.2 mm I.D.) verwendet. Der Einfluss des ACN-Startgehaltes auf die Selektivität der Trennung, der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und das Profil der Gradientensteigung, wurde mit Hilfe dreier verschiedener Gradienten (0-16%, 0.2-16.2% und 1-17% ACN in 30 min) bei gleicher Gradientensteigung (0.53% ACN/min), untersucht. Die Reproduzierbarkeit des Gradientenprofils wurde dabei durch zusätzliche UV-Detektion bei 210 nm nach Zusatz von 10 ppm Formamid in Laufmittel B untersucht. Um den Temperatureinfluss bestimmen zu können, wurden alle Messungen jeweils bei 40°C, 50°C und 70°C durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit und Stabilität des HPLC-Systems wurde jeweils durch 6 bis 20 Wiederholungsmessungen bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt und am Ende dieses Kapitels zusammengefasst und diskutiert.

### 3.5.2. Reproduzierbarkeit und Stabilität des Mikro-HPLC-Systems bei 70°C und unterschiedlichen Gradientbedingungen

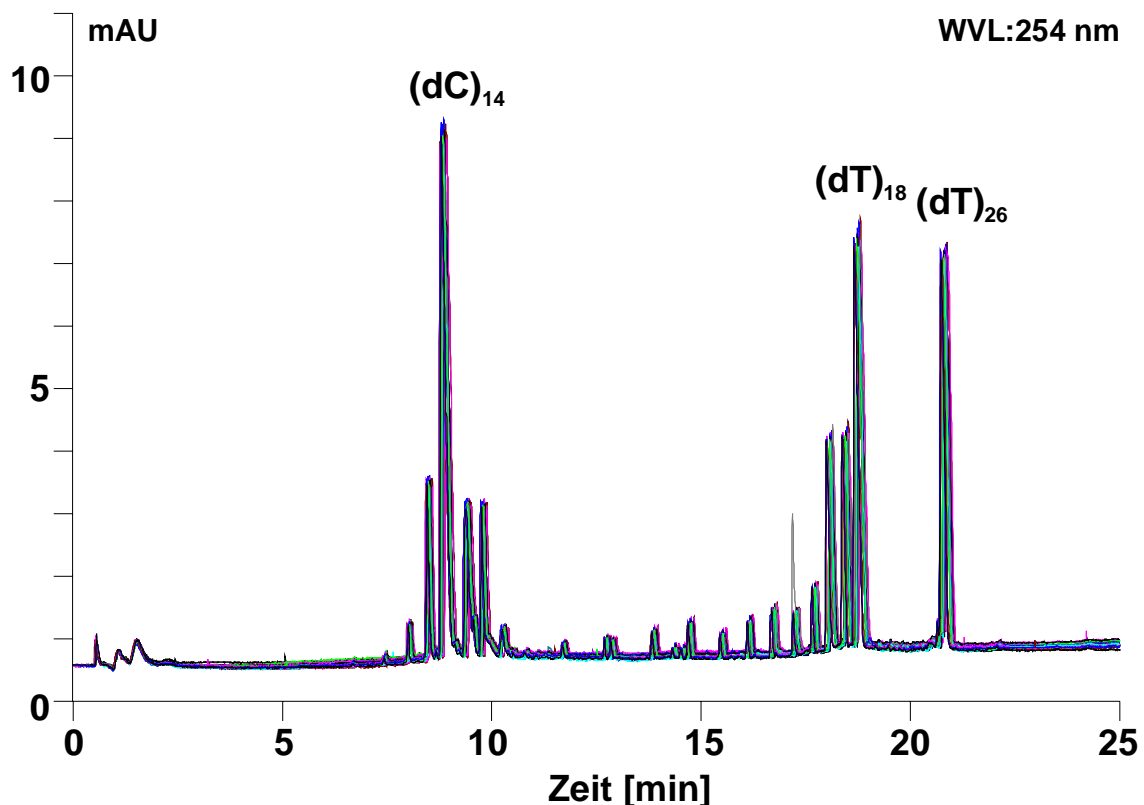
Um die Reproduzierbarkeit und Stabilität des Ultimate 3000 Systems (U3000) bei einer Trenntemperatur von  $T=70^{\circ}\text{C}$  untersuchen zu können, wurden mittels einer Oligonukleotid-Testmischung ((dC)<sub>14</sub>, (dT)<sub>18</sub> und (dT)<sub>26</sub>) bei unterschiedlichen Gradientbedingungen, je nach Acetonitril-Startgehalt, zwischen 10 (1-17% ACN) und 20 (0-16% ACN) Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Aus diesen Daten wurden anschließend die jeweiligen Standard- und relativen Standardabweichungen berechnet. **Abbildung 3.5** zeigt einen Overlay der Messergebnisse mit einem linearen Gradienten von 0-16% Acetonitril in 30 min bei einer Temperatur von  $T=70^{\circ}\text{C}$ . Wie daraus deutlich ersichtlich, konnte durch die Kombination des neuen U3000 Systems mit den etablierten PS/DVB-Monolithen eine sehr hohe Trenneffizienz und Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten erhalten werden. Dabei symbolisiert die gestrichelte Linie, die über die jeweiligen Oligonukleotide gelegt wurde, den Mittelwert der Retentionszeiten bezogen auf die 20 Wiederholungsmessungen. Die hohe Trenneffizienz dieses HPLC-Systems kann auch daran erkannt werden, dass neben den enthaltenen Testoligonukleotiden sogar einzelne Fehlsequenzen gefunden und aufgetrennt werden konnten. So konnten z.B. vom (dT)<sub>18</sub> Zielprodukt kürzere Fehlsequenzen mit einer Länge von 9 bis 17 Basen separiert werden. Gleiches gilt für das enthaltene (dC)<sub>14</sub>, von dem sowohl kürzere Fehlsequenzen (12-13mer) als auch längere Fehlsequenzen chromatographiert werden konnten. Bei den längeren Fehlsequenzen handelt es sich vermutlich um das 14mer Zielprodukt, das noch einige Schutzgruppen trägt, die während des Syntheseprozesses angebracht und im weiteren Reaktionsverlauf nicht vollständig abgespalten werden konnten. Ein ähnliches Fehlverhalten wurde bereits in meiner Diplomarbeit untersucht und nachgewiesen [87]. Besonders deutlich werden die hohe Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten sowie die gefundenen Fehlsequenzen auch aus **Abbildung 3.6**, bei der die Ergebnisse der Wiederholungsmessungen in einem Chromatogramm direkt übereinander gelegt wurden.



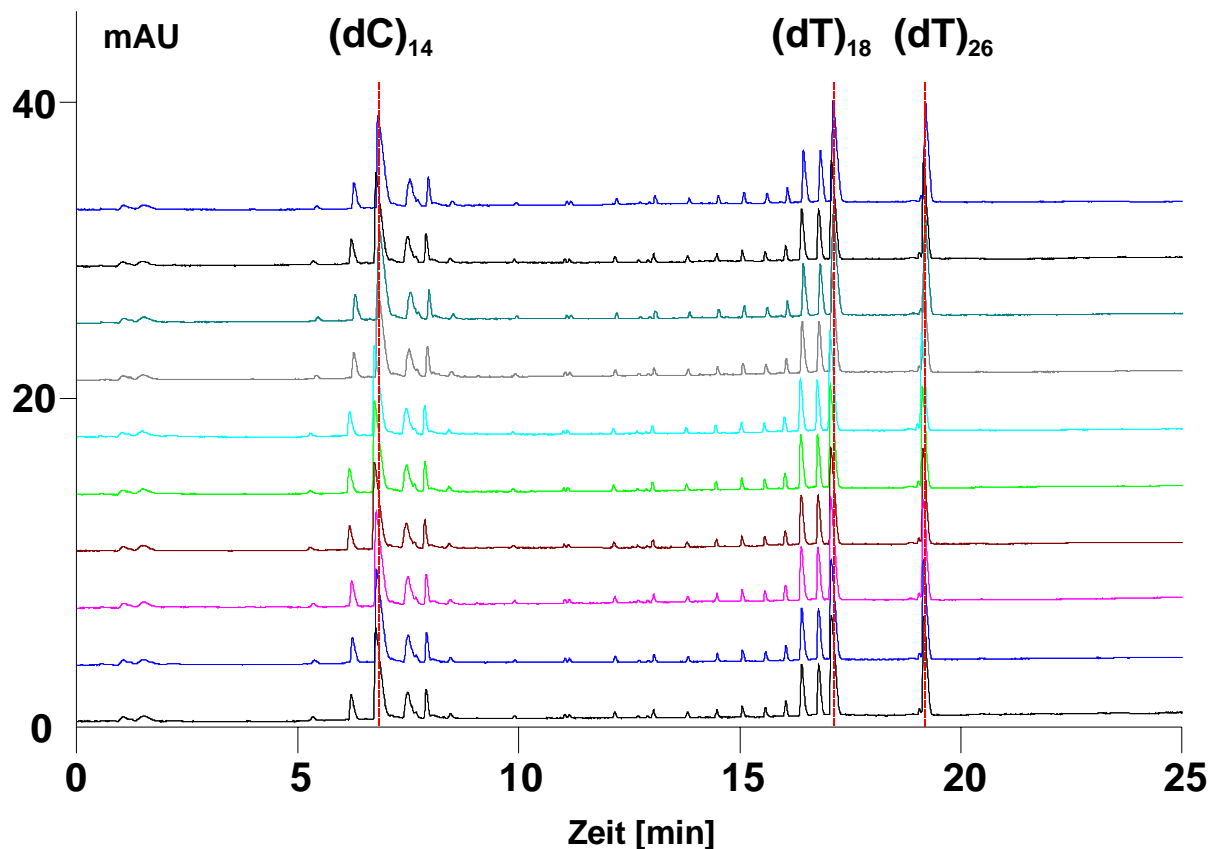
**Abbildung 3.5.** Trennung einer Oligonukleotid-Testmischung auf einem PS/DVB-Monolithen mit einem linearen Gradienten von 0-16% Acetonitril in 30 min bei  $T=70^{\circ}\text{C}$  zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Stabilität des U3000 Systems. Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 20% ACN und 10 ppm Formamid; linearer Gradient: 0-16% ACN in 30 min; Fluss: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Temperatur:  $70^{\circ}\text{C}$ ; Probe:  $(\text{dC})_{14}$  (erster Peak),  $(\text{dT})_{18}$  (zweiter Peak) und  $(\text{dT})_{26}$  (dritter Peak) mit 4  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

Aus den erhaltenen Messdaten wurde für das 14mer ((dC)<sub>14</sub>) eine relative Standardabweichung (RSD) von 0.438%, für das 18mer ((dT)<sub>18</sub>) eine RSD von 0.280% und für das 26mer ((dT)<sub>26</sub>) eine RSD von 0.261% berechnet. Vergleicht man diese Werte mit den vom Hersteller angegebenen Grenzwerten (0.300%, mittels Peptidtrennung bestimmt), so erhält man für alle Testsubstanzen sehr gute Ergebnisse bezüglich der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten. Lediglich das kürzeste enthaltene Oligonukleotid liegt über den vom Hersteller bestimmten Grenzwerten für die Reproduzierbarkeit. Diese Tendenz, dass das 14mer Oligonukleotid oberhalb der vom Hersteller festgelegten Grenzwerte liegt, wurde auch durch die Versuche mit höherem Acetonitril-Startgehalt (0.2% und 1%) bestätigt.



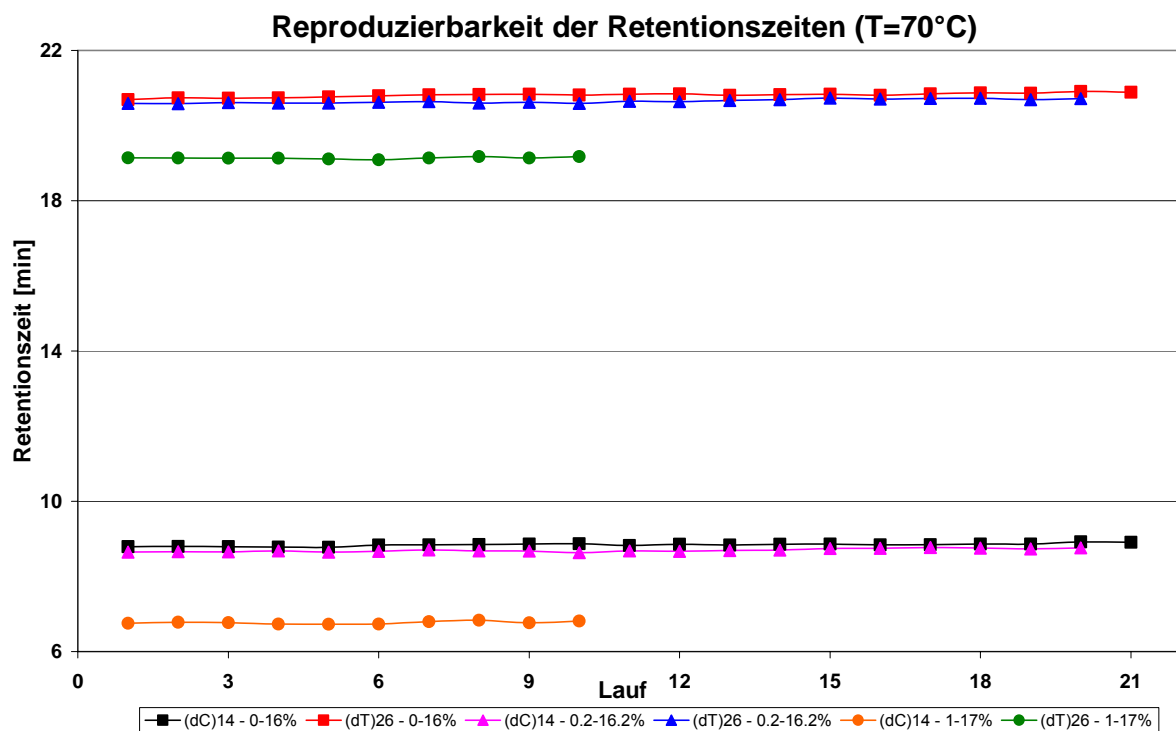
**Abbildung 3.6.** Overlay von 20 Wiederholungsmessungen der Oligonukleotid-Testmischung auf einem PS/DVB-Monolithen. Besonders deutlich werden hier die Fehlsequenzen und die hohe Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten. Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 20% ACN und 10 ppm Formamid; linearer Gradient: 0-16% ACN in 30 min; Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 70°C; Probe: (dC)<sub>14</sub> (erster Peak), (dT)<sub>18</sub> (zweiter Peak) und (dT)<sub>26</sub> (dritter Peak) mit 4 ng/µl.

So wurde für das 14mer bei einem Acetonitril-Startgehalt von 0.2% eine RSD von 0.485% und bei 1% eine RSD von 0.527% berechnet. Ein Overlay der 10 Messungen mit einem Acetonitril-Startgehalt von 1% ist in **Abbildung 3.7** dargestellt. Erhöht man den organischen Anteil des Laufmittels von 0% auf 1%, so verbessert sich die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten für das 18mer und 26mer Oligonukleotid deutlich. Während man bei einem Acetonitrilgehalt von 0% für das 18mer eine RSD von 0.280% erhält, reduziert sich dieser Wert bei der Erhöhung auf 1% Acetonitril auf 0.137%. Auch für das 26mer erhält man mit höherem ACN-Gehalt eine deutliche Verbesserung der relativen Standardabweichung (0.261% bei 0% ACN, 0.127% bei 1%).



**Abbildung 3.7.** Trennung einer Oligonukleotid-Testmischung auf einem PS/DVB-Monolithen mit einem linearen Gradienten von 1-17% Acetonitril in 30 min bei  $T=70^{\circ}\text{C}$  zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Stabilität des U3000 Systems. Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 20% ACN und 10 ppm Formamid; linearer Gradient: 1-17% ACN in 30 min; Fluss: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Temperatur:  $70^{\circ}\text{C}$ ; Probe:  $(\text{dC})_{14}$  (erster Peak),  $(\text{dT})_{18}$  (zweiter Peak) und  $(\text{dT})_{26}$  (dritter Peak) mit 4  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

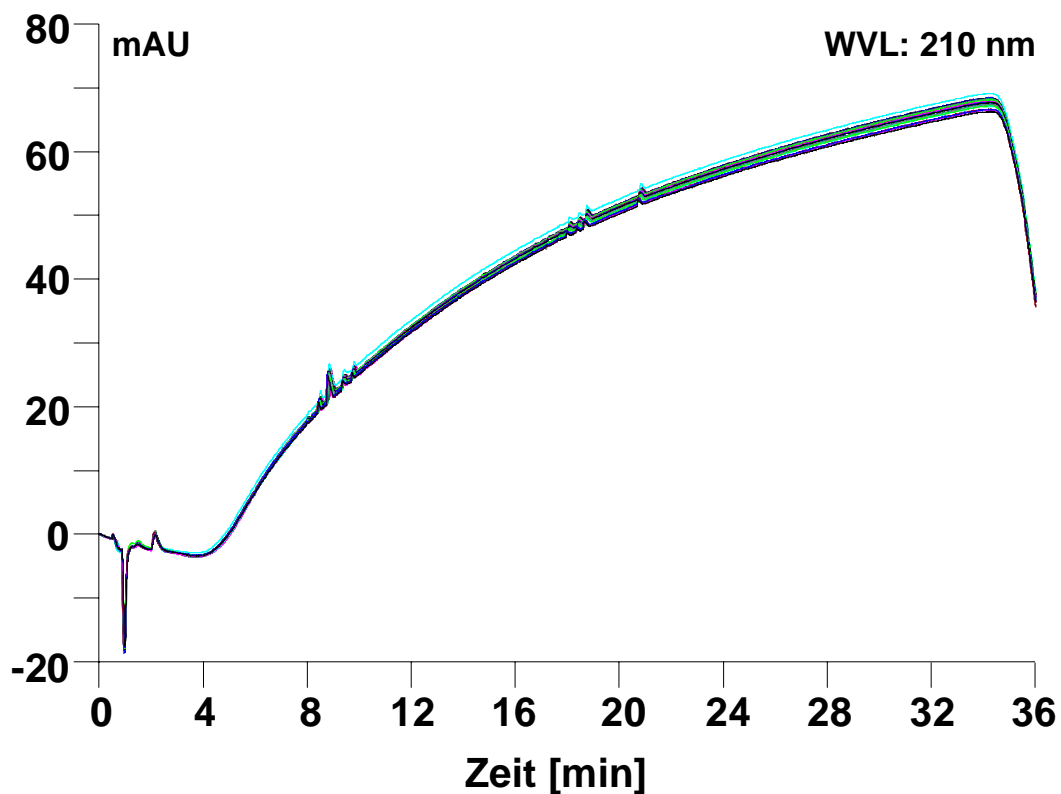
Vergleicht man diese Werte mit den Werten bei einem ACN-Startgehalt von 0.2% ((dC)<sub>14</sub>: 0.485%, (dT)<sub>18</sub>: 0.245%, (dT)<sub>26</sub>: 0.255%), so kann man bei den längeren Oligonukleotiden (18 und 26mer) eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit durch eine Erhöhung des organischen Anteils im Laufmittel und bei dem kürzeren 14mer Oligonukleotid eine merkliche Verschlechterung feststellen. Eine Zusammenfassung der erhaltenen experimentellen Messergebnisse ist in der nachfolgenden **Abbildung 3.8** für das 14mer und 26mer Oligonukleotid gegeben. Auch aus dieser Darstellung der Ergebnisse geht nochmals die hohe Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten für alle untersuchten Oligonukleotide und alle Gradient-Start-Bedingungen deutlich hervor.



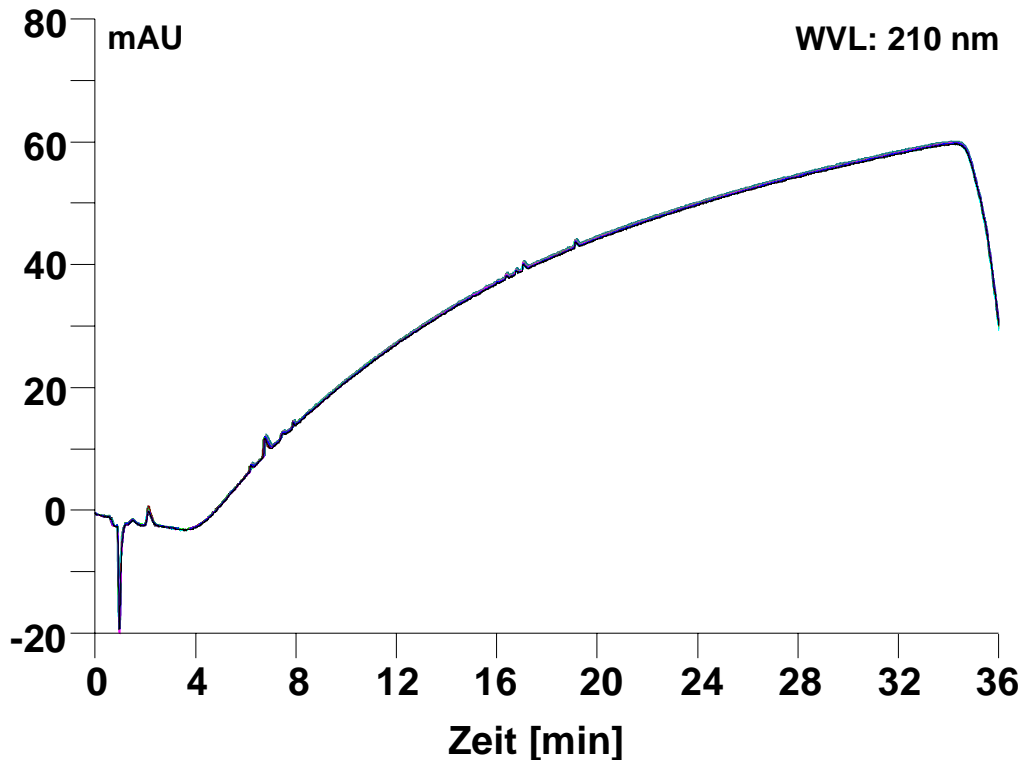
**Abbildung 3.8.** Ergebnisse der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten für eine Oligonukleotide-Testmischung mit unterschiedlichen ACN-Startgehalten (0%, 0.2% und 1%) auf einem PS/DVB-Monolithen bei T=70°C.

Um die Stabilität und Reproduzierbarkeit des U3000-Systems zu untersuchen, wurde neben den experimentellen Retentionszeiten auch die Wertewiederholbarkeit des Gradientenprofils untersucht, da man anhand dieses Profils feststellen kann, ob das System, bestehend aus Pumpen und Mischventil, fehlerfrei funktioniert. Stellt man

bei dieser Untersuchung größere Unregelmäßigkeiten in der Reproduzierbarkeit des Gradientenprofils fest, so kann in nachfolgenden Untersuchungen, z.B. durch Messung eines Stufengradienten, festgestellt werden, ob das Problem von den Pumpen oder dem Mischventil ausgeht. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Abmischung, wurde Laufmittel B Formamid zugegeben, das bei 210 nm aktiv und bei 254 nm relativ inaktiv ist. Dadurch wurden die Messungen der Oligonukleotide bei 254 nm nicht behindert, während parallel bei 210 nm auf einem 2. UV-Kanal das Gradientenprofil untersucht werden konnte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den nachfolgenden Abbildungen für 0% Acetonitril (**Abbildung 3.9**) und 1% Acetonitril (**Abbildung 3.10**) dargestellt.



**Abbildung 3.9.** Untersuchung des Gradientenprofils mit 10 ppm Formamid bei einer Wellenlänge von 210 nm und einem linearen Gradienten von 0-16% Acetonitril in 30 min. Overlay aus 20 Wiederholungsmessungen. Experimentelle Bedingungen wie **Abbildung 3.5**.



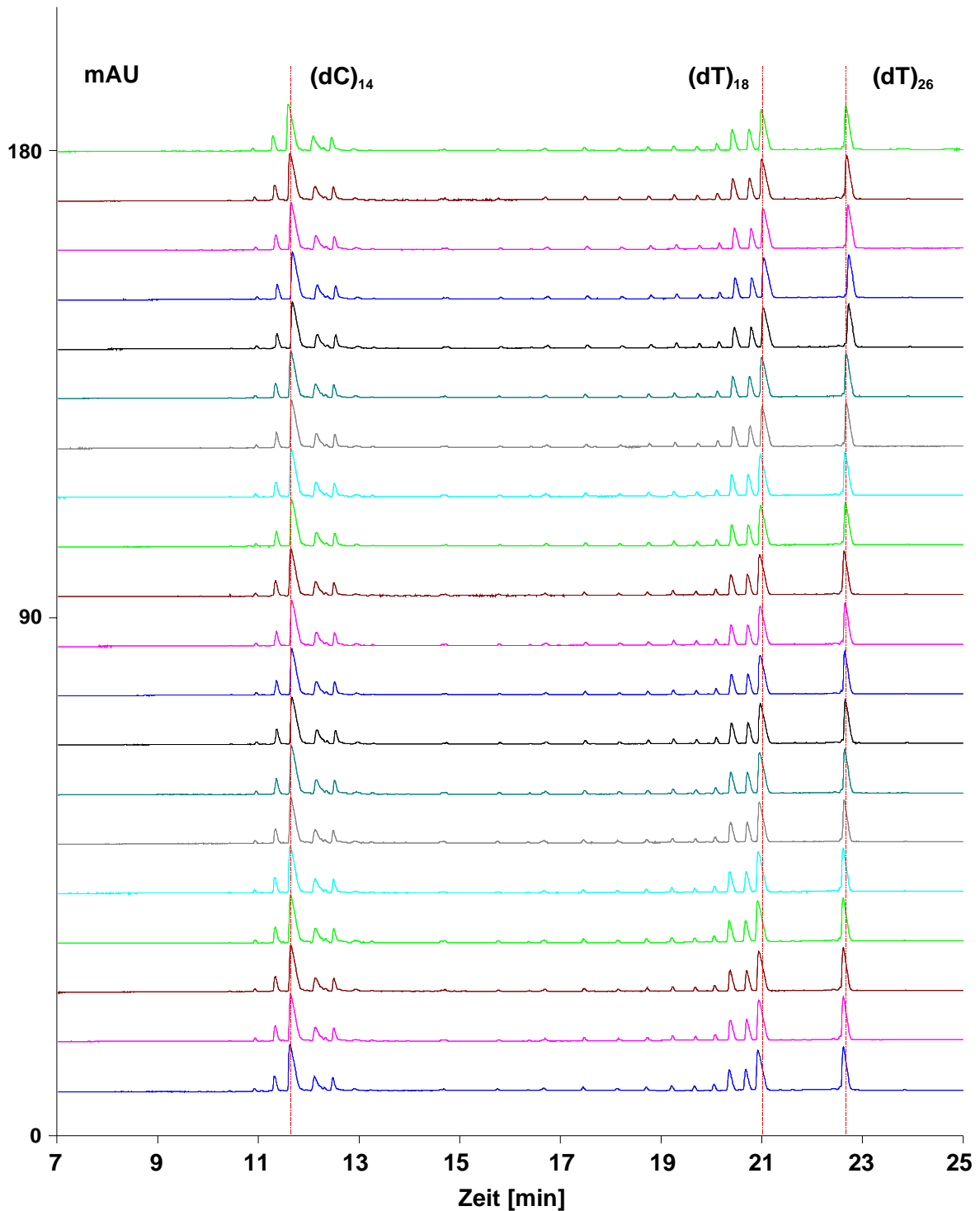
**Abbildung 3.10.** Untersuchung des Gradientenprofils mit 10 ppm Formamid bei einer Wellenlänge von 210 nm und einem linearen Gradient von 1-17% Acetonitril in 30 min. Overlay aus 10 Wiederholungsmessungen. Experimentelle Bedingungen wie **Abbildung 3.7**.

Wie aus **Abbildung 3.9** und **Abbildung 3.10** ersichtlich, hat man sowohl bei 0% Acetonitril als auch bei 1% Acetonitril eine Abweichung von einem ideal linearen Verhalten des Gradienten. Diese leichte Abweichung deutet jedoch nicht auf einen Defekt im Mischventil oder Pumpensystem hin, sondern kann vielmehr durch die Änderung des Absorptionskoeffizienten bei steigendem ACN-Gehalt während des Gradienten erklärt werden. Auch hier kann, wie bereits bei den Retentionszeiten, eine hohe Reproduzierbarkeit des Gradientenprofils festgestellt werden.



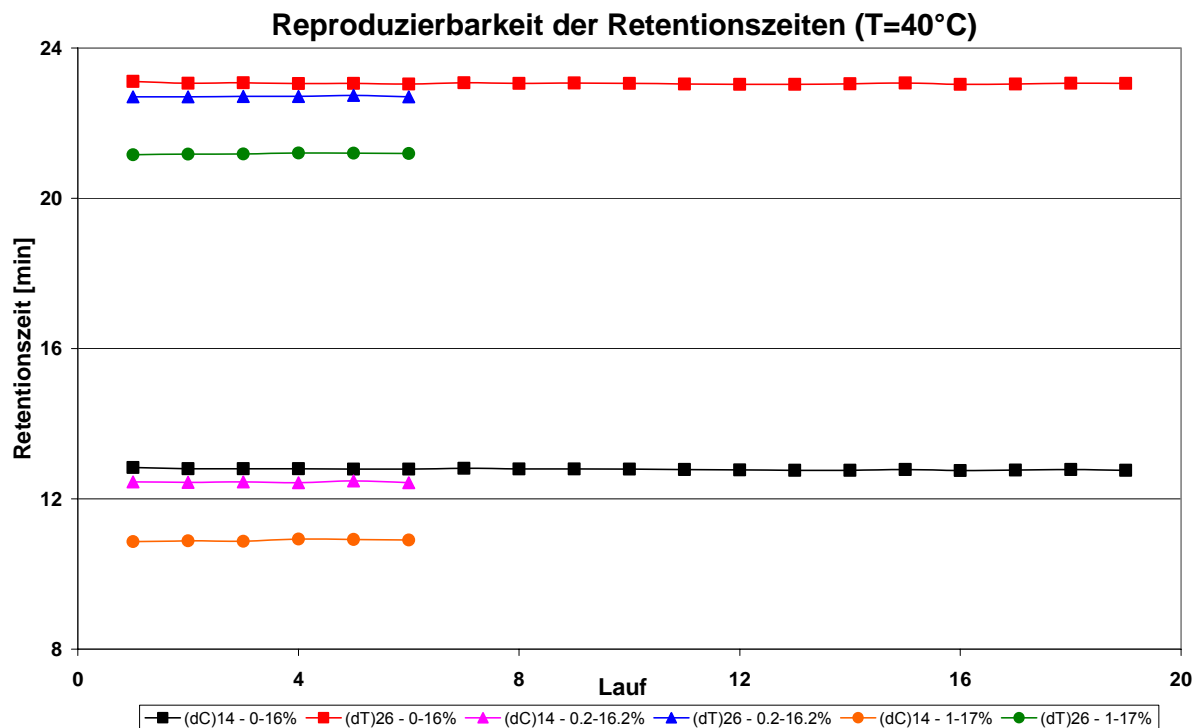
### 3.5.3. Reproduzierbarkeits- und Stabilitätsuntersuchungen bei Trenntemperaturen von 40°C und 50°C

Neben dem Einfluss von Acetonitril auf die Stabilität und Reproduzierbarkeit der Messwerte sollte in diesem Teil der Studie auch der Einfluss der Trenntemperatur untersucht werden. Dazu wurde, unter Beibehaltung aller anderen experimentellen Parameter (Gradientsteigung, verschiedene ACN-Startgehalte), die Temperatur von 70°C auf 50°C bzw. 40°C reduziert. Wie bereits in Kapitel 3.5.2 beschrieben, wurde auch bei diesen Temperaturen die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Messung mit einer Oligonukleotid-Testmischung und unterschiedlichen ACN-Gehalten untersucht. Auch hierbei wurden jeweils zwischen 6 bis 20 Wiederholungsmessungen durchgeführt. In **Abbildung 3.11** sind die Ergebnisse für die Trennung der Mischung mit einem linearen Gradienten von 0-16% in 30 min bei T=50°C dargestellt. Vergleicht man die Werte für die relative Standardabweichungen mit den Daten bei T=70°C, so sieht man, dass durch die Reduzierung der Temperatur eine signifikante Verbesserung eintritt. So ergibt sich für das 14mer Oligonukleotid bei dieser Temperatur eine RSD von 0.170%, während bei 70°C noch ein Wert von 0.438% erhalten wurde. Dies entspricht einer Verringerung der RSD um einen Faktor von ca. 2.5. Vergleichbare Verbesserungen wurden auch für das 18mer (70°C: 0.280%, 50°C: 0.166%) und das 26mer (70°C: 0.261, 50°C: 0.154) Oligonukleotid erhalten. Auch hier bewirkt die Herabsetzung der Trenntemperatur eine Verbesserung der RSD von annähernd 100%. Im Gegensatz zur Trenntemperatur von 70°C, wo eine Erhöhung des ACN-Startgehaltes zu einer Verschlechterung der RSD für das 14mer und zu einer merklichen Verbesserung für das 18mer und 26mer führt, verbessert sich bei 50°C die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten für alle untersuchten Oligonukleotide. Hat man bei einem ACN-Gehalt von 0% noch eine RSD von 0.170%, so verbessert sich dieser Wert bei der Erhöhung auf 1% auf 0.156%. Nur bei einer Konzentration von 0.2% Acetonitril wurde eine Verschlechterung auf 0.205% festgestellt.



**Abbildung 3.11.** Trennung einer Oligonukleotid-Testmischung auf einem PS/DVB-Monolithen mit einem linearen Gradienten von 0-16% Acetonitril in 30 min bei  $T=50^{\circ}\text{C}$  zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und Stabilität des U3000 Systems. Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 20% ACN und 10 ppm Formamid; linearer Gradient: 0-16% ACN in 30 min; Fluss: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Temperatur:  $50^{\circ}\text{C}$ ; Probe:  $(\text{dC})_{14}$  (erster Peak),  $(\text{dT})_{18}$  (zweiter Peak) und  $(\text{dT})_{26}$  (dritter Peak) mit 4  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

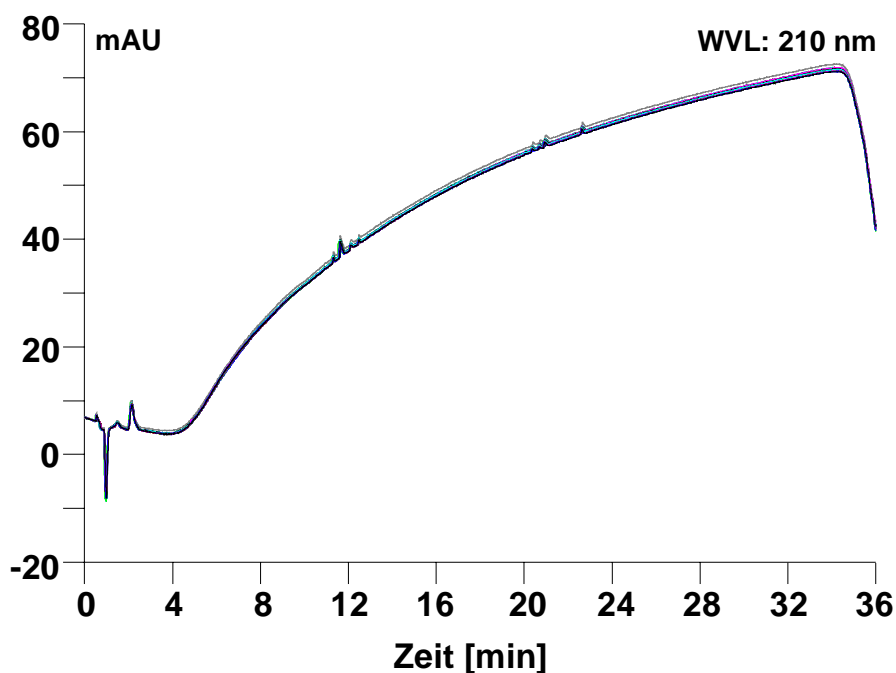
Für das 18mer und 26mer Oligonukleotid sieht man jedoch eine deutliche Verbesserung der Werte von 0.166% auf 0.083%, für das 18mer und von 0.154% auf 0.052%, für das 26mer. Somit wurde für das 18mer eine Verbesserung um Faktor 2 und für das 26mer gar um Faktor 3 erzielt. Vergleicht man die Werte für 50°C jedoch mit denen für 40°C, so erhält man keine einheitliche Tendenz. Ein Überblick über die erhaltenen Messergebnisse für das 14mer und 26mer bei 40°C ist in **Abbildung 3.12** gegeben.



**Abbildung 3.12.** Ergebnisse der Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten für eine Oligonukleotide-Testmischung mit unterschiedlichen ACN-Startgehalten (0%, 0.2% und 1%) auf einem PS/DVB-Monolithen bei T=40°C.

So bewirkt die Reduktion der Temperatur bei einem ACN-Gehalt von 0% eine deutliche Verbesserung der RSD für allen untersuchten Oligonukleotiden. Für das 14mer ergibt sich eine Verbesserung von 0.170% auf 0.167%, für das 18mer von 0.166% auf 0.097% und für das 26mer von 0.154% auf 0.086%. Ein ähnliches Verhalten wird bei einem ACN-Gehalt von 0.2% für das 14mer (50°C: 0.205%, 40°C: 0.149%) und 26mer (50°C: 0.078%, 40°C: 0.069%) beobachtet. Im Gegensatz dazu

erhöht sich die relative Standardabweichung beim  $(dT)_{18}$  von 0.086% bei 50°C auf 0.104% bei 40°C. Eine einheitliche Tendenz ist dagegen wieder bei einem ACN-Gehalt von 1% erkennbar, da hier die Temperaturerhöhung bei allen Oligonukleotiden zu einer merklichen Verschlechterung der RSD führt. Hat man für das 14mer bei 50°C noch eine RSD von 0.156%, so erhöht sich diese bei 40°C auf 0.252 (ca. 61%). Auch für das 18mer (50°C: 0.083%, 40°C: 0.124%) und das 26mer (50°C: 0.052%, 40°C: 0.086%) ergibt sich eine deutliche Verschlechterung der Werte. Im Gegensatz zu 70°C und 50°C führt hier die Erhöhung der ACN-Konzentration also nicht zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit.



**Abbildung 3.13.** Untersuchung des Gradientenprofils mit 10 ppm Formamid bei einer Wellenlänge von 210 nm und einem linearen Gradient von 0-16% Acetonitril in 30 min. Overlay aus 20 Wiederholungsmessungen. Experimentelle Bedingungen wie **Abbildung 3.11**.

Wie bereits bei 70°C wurde auch bei 50°C und 40°C die Wiederholbarkeit des Gradientenprofils mittels Formamid überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind exemplarisch für einen ACN-Gehalt von 0% und einer Temperatur von 50°C in **Abbildung 3.13** dargestellt. Auch hier kann eine Nicht-Linearität festgestellt werden, die jedoch durch die Änderung des Absorptionskoeffizienten erklärt werden kann.

### 3.5.4. Zusammenfassung der Stabilitäts- und Reproduzierbarkeitsstudie für das U 3000 Mikro-HPLC-System

In dieser Studie wurde die Stabilität und Reproduzierbarkeit des neuen Mikro-HPLC-Systems Ultimate 3000 in Kombination mit einem Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen untersucht. Aufgrund der sehr hohen Anforderungen des SVM-Modells an die experimentellen Retentionsdaten ist die Verwendung eines leistungsfähigen Mikro-HPLC-Systems unabdingbar. Daher wurde diese Leistungsfähigkeit des HPLC-Systems mittels einer Oligonukleotid-Mischung unter verschiedenen chromatographischen Parametern (ACN-Startgehalt, Temperatur) untersucht. Neben verschiedenen Trenntemperaturen (40°C, 50°C und 70°C) wurde der Startgehalt an organischem Laufmittel (Acetonitril) variiert. Die Messungen wurden mit 0%, 0.2% und 1% Acetonitril-Anfangskonzentrationen bei allen Temperaturen durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine konstante Gradientensteigung von 0.53% ACN/min gewählt. Zur Überprüfung des Gradientenprofils wurde Laufmittel B mit 10 ppm Formamid versetzt und die Steigung des Gradienten parallel zu den Oligonukleotid-Messungen bei einer Wellenlänge von 210 nm auf dem 2. UV-Kanal aufgenommen. Aus den experimentellen Daten wurden die Standardabweichung  $s$  und die relative Standardabweichung RSD als Maß für die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in **Tabelle 3.3** für  $(dC)_{14}$  und  $(dT)_{26}$  und in **Tabelle 3.4** für  $(dT)_{18}$  zusammengestellt.

**Tabelle 3.3.** Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie für  $(dC)_{14}$  und  $(dT)_{26}$  bei unterschiedlichen Trenntemperaturen und variierenden ACN-Startgehalten.

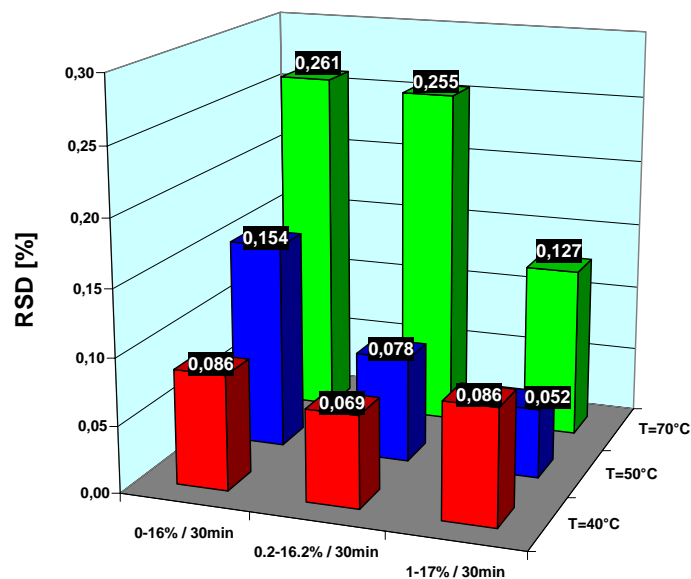
T [°C]	Gradient	$(dC)_{14}$			$(dT)_{26}$		
		$t_r$ (mittel) [min]	$s$ [min]	RSD [%]	$t_r$ (mittel) [min]	$s$ [min]	RSD [%]
70	0-16% / 30 min	8.84	0.039	0.438	20.81	0.054	0.261
	0.2-16.2% / 30 min	8.70	0.042	0.485	20.65	0.053	0.255
	1-17% / 30 min	6.77	0.036	0.527	19.14	0.024	0.127
50	0-16% / 30 min	11.64	0.020	0.170	22.65	0.035	0.154
	0.2-16.2% / 30 min	11.36	0.023	0.205	22.41	0.018	0.078
	1-17% / 30 min	9.72	0.015	0.156	20.83	0.011	0.052
40	0-16% / 30 min	12.79	0.021	0.167	23.10	0.020	0.086
	0.2-16.2% / 30 min	12.45	0.019	0.149	22.71	0.016	0.069
	1-17% / 30 min	10.90	0.027	0.252	21.19	0.018	0.086

**Tabelle 3.4.** Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie für  $(dT)_{18}$  bei unterschiedlichen Trenntemperaturen und variierenden ACN-Startgehalten.

T [°C]	Gradient	$(dT)_{18}$		
		$t_r$ (mittel) [min]	s [min]	RSD [%]
70	0-16% / 30 min	18.74	0.052	0.280
	0.2-16.2% / 30 min	18.57	0.045	0.245
	1-17% / 30 min	17.10	0.023	0.137
50	0-16% / 30 min	20.97	0.035	0.166
	0.2-16.2% / 30 min	20.73	0.018	0.086
	1-17% / 30 min	19.14	0.016	0.083
40	0-16% / 30 min	21.59	0.021	0.097
	0.2-16.2% / 30 min	21.24	0.022	0.104
	1-17% / 30 min	19.72	0.024	0.124

Die experimentellen Daten, wurden über 6 bis 20 Wiederholungsmessungen erhalten. Exemplarisch für die in der Mischung enthaltenen Oligonukleotide sind die Daten für das 26mer in **Abbildung 3.14** grafisch dargestellt.

**Abhängigkeit der RSD von Temperatur und ACN-Startgehalt für  $(dT)_{26}$**



**Abbildung 3.14.** Abhängigkeit der RSD von der Temperatur und dem ACN-Startgehalt für das 26mer Oligonukleotid  $(dT)_{26}$ . Die Daten wurden auf einem PS/DVB-Monolithen mittels Ultimate 3000 System durch 6-20 Wiederholungsmessungen bestimmt.

Wie aus **Tabelle 3.3** und **Tabelle 3.4** sowie **Abbildung 3.14** ersichtlich, wurde für alle Temperaturen und ACN-Gehalte eine sehr hohe Reproduzierbarkeit und Stabilität für die Retentionszeiten erhalten. Das vom Hersteller vorgegebene und mittels Peptiden bestimmte Limit für die RSD von 0.300% wird nur für das 14mer Oligonukleotid bei 70°C merklich überschritten. Unter allen anderen gewählten experimentellen Bedingungen werden die geforderten Grenzwerte deutlich unterschritten. Die gemessenen Daten ergeben zudem, dass, mit Ausnahme bei T=40°C, eine Erhöhung des ACN-Startgehaltes stets zu einer deutlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten führt. Weiterhin ist aus den Daten ersichtlich, dass die Temperatur einen merklichen Einfluss auf die RSD der Retentionszeiten hat, da eine Reduzierung der Temperatur eine große Verbesserung der Reproduzierbarkeiten nach sich zieht. Die Studie hat ebenfalls gezeigt, dass das Gradientenprofil weder von der Temperatur noch vom Acetonitril-Gehalt beeinflusst wird. Unter allen gewählten chromatographischen Bedingungen wurde eine hohe Reproduzierbarkeit im Gradientenprofil erhalten. Kleine Nicht-Linearitäten können durch die Änderung des Absorptionskoeffizienten bei steigendem ACN-Gehalt während des Gradienten erklärt werden.

Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass das neue Ultimate U3000 System in Kombination mit einem Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen bestens für die Entwicklung eines Retentionszeit-Vorhersage-Modells für Oligonukleotide geeignet ist, da es eine hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit der experimentellen Daten gewährleistet.

### **3.6. Verbesserung des Additiven Retentionszeit-Vorhersage-Modells**

#### **3.6.1. Einführung und Problemstellung**

In diesem Teil der Arbeit wurde das bereits in Kapitel 3.2.1 beschriebene Additive Retentionsvorhersagemodell durch Neubestimmung der für die Berechnung

relevanten empirischen Koeffizienten für die Anwendung der Vorhersage des Retentionsverhalten von Oligonukleotiden bei verschiedenen Trenntemperaturen und verschiedenen stationären Phasen erweitert. Zwar wurde dieses Modell, welches das Retentionsverhalten von Oligonukleotiden in Abhängigkeit ihrer Basensequenz, jedoch ohne Berücksichtigung von strukturellen Eigenschaften vorhersagt, bereits von Martin Gilar [13] auf seine Anwendbarkeit bei synthetischen Oligonukleotiden untersucht, jedoch hat Gilar dieses Modell ausschließlich bei erhöhten Temperaturen und auch nur auf einer stationären Phase getestet. Dadurch konnte er die Ausbildung möglicher Sekundärstrukturen unterdrücken und damit den Hauptschwachpunkt dieses Modells, dass es nämlich nur die Sequenz und keine strukturellen Eigenschaften berücksichtigt, umgehen und so ein leistungsfähiges Vorhersagemodell etablieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es nun, das bestehende Vorhersagemodell auch auf seine Anwendbarkeit bei niedrigen Temperaturen zu testen, um so eine qualifizierte Aussage über dessen Leistungsfähigkeit treffen zu können. Ein weiterer Schwachpunkt des Gilar'schen Vorhersagemodells ist, dass er bei der Bestimmung der basenspezifischen Koeffizienten für die Nukleobase Guanin keine reinen Homooligonukleotide ((dG)<sub>x</sub>) anwenden konnte, da diese wegen ihrer starken inter- und intramolekularen Wechselwirkungen nicht getrennt werden konnten. Um dieses Problem zu umgehen, verwendete Gilar anstelle eines reinen Homooligonukleotids, ein (CCG)<sub>x</sub>-mer und korrigierte anschließend diesen Fehler rechnerisch, in dem er empirisch zu den experimentell erhaltenen Daten einen Korrekturfaktor von 0.18 Prozent addierte. Diesen empirischen Wert erhielt Gilar dadurch, dass er zuerst den Unterschied im Retentionsverhalten eines (dC)<sub>30</sub> und eines d(CCG)<sub>30</sub> ermittelte ( $\Delta t = 0.06\% \cdot t_R$ ). Da der Gesamtgehalt an G in dieser Sequenz CCG 1/3 beträgt, wurde der erhaltene Wert anschließend mit dem Faktor 3 multipliziert. Dieser Schwachpunkt des Gilar'schen Ansatzes konnte in dieser Arbeit, unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Arbeiten von Peter Oefner [45], dem es erstmals durch Verwendung eines Wärmetauschers (Prä-Coil) gelungen war reine Homooligomer des Guanosins zu trennen, korrigiert werden. Da die für die Berechnung des Retentionsverhaltens notwendigen Koeffizienten stark von der gewählten Temperatur und der stationären Phase abhängen, mussten diese, um das Additive Modell auch bei niedrigeren Trenntemperaturen anwenden zu können, bei allen zu untersuchenden Temperaturen und auf allen untersuchten stationären



Phasen, neu bestimmt werden. Dabei stellte sich besonders die Bestimmung der Guanosin-Koeffizienten als äußerst kritisch heraus, da es trotz Verwendung eines Wärmetauschers bei niedrigeren Temperaturen nicht möglich war, G-Homooligonukleotide mit mehr als 10 Nukleotiden akzeptabel zu trennen. Dieses Problem konnte jedoch unter Verwendung der Retentionsdaten des  $(dG)_{10}$  Homooligonukleotids bei niedrigeren Temperaturen und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Guanosin-Trennungen bei erhöhten Temperaturen gelöst werden (siehe folgendes Kapitel). Nach der Neubestimmung der empirischen Koeffizienten wurde anschließend die Leistungsfähigkeit des Additiven Retentionszeitvorhersage-Modells auf verschiedenen stationären Phasen (Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolith, Poly-(Styrol/Divinylbenzol)- $C_{18}$  und  $C_{18}$ -Silika) und bei verschiedenen Trenntemperaturen getestet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln dargestellt und diskutiert.

### **3.6.2. Neubestimmung der empirischen Koeffizienten des Additiven Retentionsmodells**

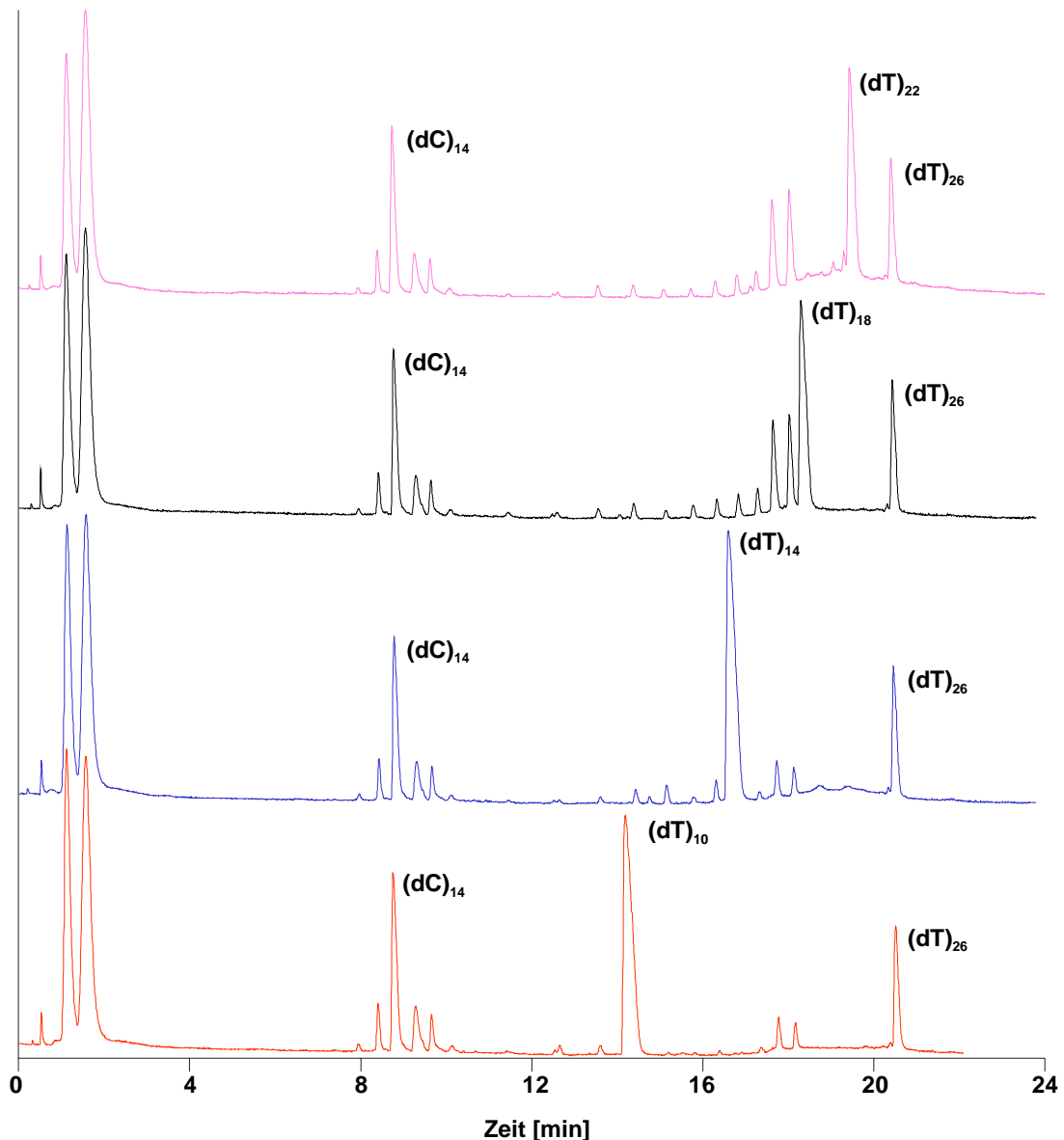
Nachdem die HPLC-Systeme für die Retentionsstudie getestet (Kapitel 3.5) wurden, konnte die Neubestimmung der für das Additive Retentionsmodell notwendigen Koeffizienten durchgeführt werden. Durch Verwendung von Homooligonukleotiden  $((dT)_x$ ,  $(dA)_x$ ,  $(dC)_x$  und  $(dG)_x$ ) mit verschiedenen Längen ( $x=10, 14, 18, 22$  und  $26$ ) konnten diese Koeffizienten bei allen Trenntemperaturen und verwendeten stationären Phasen neu bestimmt und anschließend zur Vorhersage der Retentionszeiten von 72 Oligonukleotiden verwendet werden (vgl. Kapitel 2.2.1). Da es trotz der sehr hohen Leistungsfähigkeit der verwendeten HPLC-Systeme immer noch zu geringfügigen experimentellen Messfehlern kommen kann, wurden den jeweiligen Homooligonukleotiden sowie den in der Retentionsstudie verwendeten 72 Oligonukleotiden zwei interne Referenzstandards  $((dC)_{14}$  und  $(dT)_{26}$ ) zugesetzt. Mit Hilfe dieser internen Referenzstandards konnten die Retentionszeiten der gemessenen Oligonukleotide über folgende Beziehung korrigiert werden:

$$t' = (t - t_C) \cdot \frac{\bar{t}_T - \bar{t}_C}{t_T - t_C} + \bar{t}_C$$

**Gleichung 3.6.** Formel zur Korrektur experimentell auftretender Messfehler der Retentionszeiten von Oligonukleotiden durch die Verwendung von internen Referenzstandards ((dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub>).

In **Gleichung 3.6** steht  $t$  für die experimentelle Retentionszeit des Oligonukleotids,  $t_C$  und  $t_T$  für die Retentionszeit der internen Standards ((dC)<sub>14</sub>, (dT)<sub>26</sub>) und  $\bar{t}_C$  bzw.  $\bar{t}_T$  für die durchschnittlichen Retentionszeiten von (dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub> über alle durchgeführten Experimente bei der jeweiligen Temperatur.

Für den Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen wurden die Koeffizienten bei 30°C, 40°C, 50°C, 60°C und 80°C bestimmt. Um die Retentionszeiten für ein bestimmtes Nukleotid bestimmen zu können, wurde jeweils ein linearer Gradient von 0-16% ACN in 30 min verwendet. Ein Beispiel für die Trennung verschiedener Homooligonukleotide ((dT)<sub>x</sub> mit X=10, 14, 18, 22, 26) auf einem PS/DVB-Monolithen bei T=80°C ist in **Abbildung 3.15** dargestellt. Wie aus **Abbildung 3.15** ersichtlich, konnten alle Homooligonukleotide mit einer hohen Auflösung (Abtrennung des (dT)<sub>x</sub>-mer Zielproduktes von kürzeren Fehlsequenzen z.B. des (dT)<sub>22</sub>) und guten Peakhalbwertsbreiten aufgetrennt werden. So wurde für das 10mer ((dT)<sub>10</sub>) eine Peakhalbwertsbreite ( $W_h$ ) von 0.23 min, für das 14mer eine Peakhalbwertsbreite von 0.22 min, für das 18mer und 22mer ein Wert von 0.17 min und für das längste Homooligonukleotid (26mer) eine Peakhalbwertsbreite von 0.11 min bestimmt. Somit konnte für die Homooligonukleotide des Thymidins eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.18 min (10.8 s) ermittelt werden. Vergleichbare Messungen wurden für die Oligonukleotide des Adenosins, Guanosins und Cytidins durchgeführt, und auch hier wurden sehr gute Werte für die mittleren Peakhalbwertsbreiten erhalten. Für die Homooligonukleotide des Cytidins wurde eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.12 min (7.2 s), für Adenosin von 0.11 min (6.6 s) und für Guanosin von 0.39 min (24 s) erhalten.

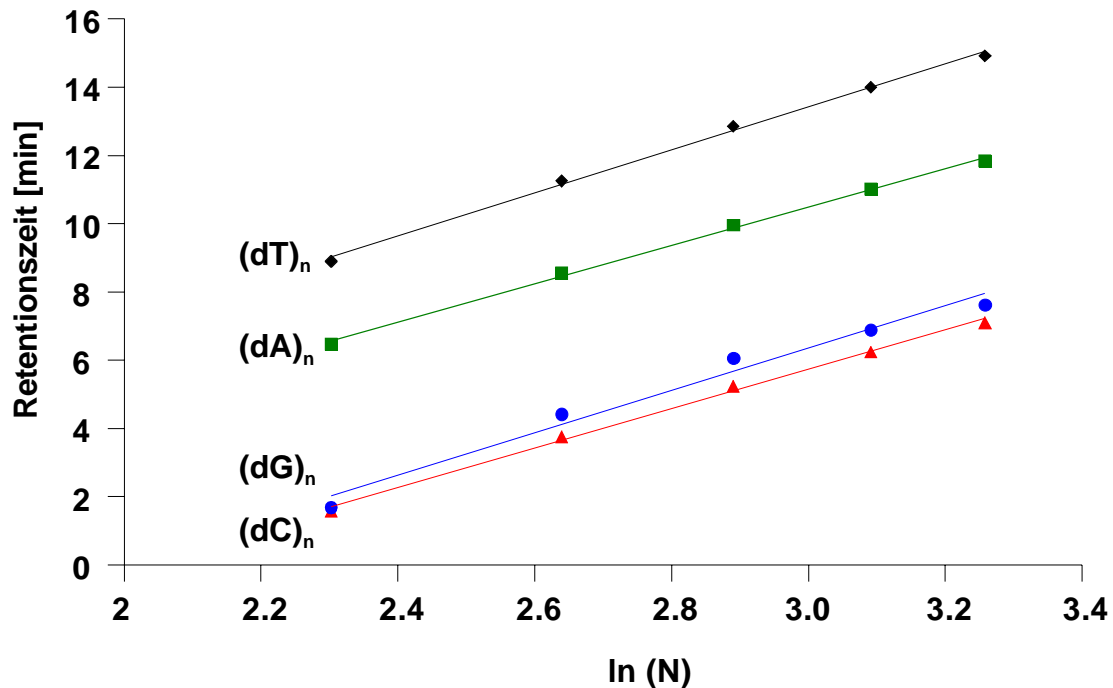


**Abbildung 3.15.** Trennung verschiedener Desoxythymidin Homooligonucleotide (10-26mer) auf einem Poly-(Styrol/Divinylbenzol)- Monolithen bei  $T=80^{\circ}\text{C}$ .

Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 40% ACN; linearer Gradient: 0-16% ACN in 30 min; Fluss: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Temperatur:  $80^{\circ}\text{C}$ ; Probe:  $(\text{dC})_{14}$  (erster Peak),  $(\text{dT})_x$  (zweiter Peak) und  $(\text{dT})_{26}$  (dritter Peak),  $(\text{dC})_{14}$  und  $(\text{dT})_{26}$  1  $\text{ng}/\mu\text{l}$  und Oligonucleotid 2.5  $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

Nach der Korrektur der erhaltenen experimentellen Retentionszeiten durch die internen Referenzstandards, wurden diese gegen den Logarithmus der Länge des jeweiligen Nucleotids aufgetragen (vgl. Kapitel 3.2.1). Mittels linearer Regression konnten anschließend die für die Retentionszeitvorhersage relevanten Koeffizienten

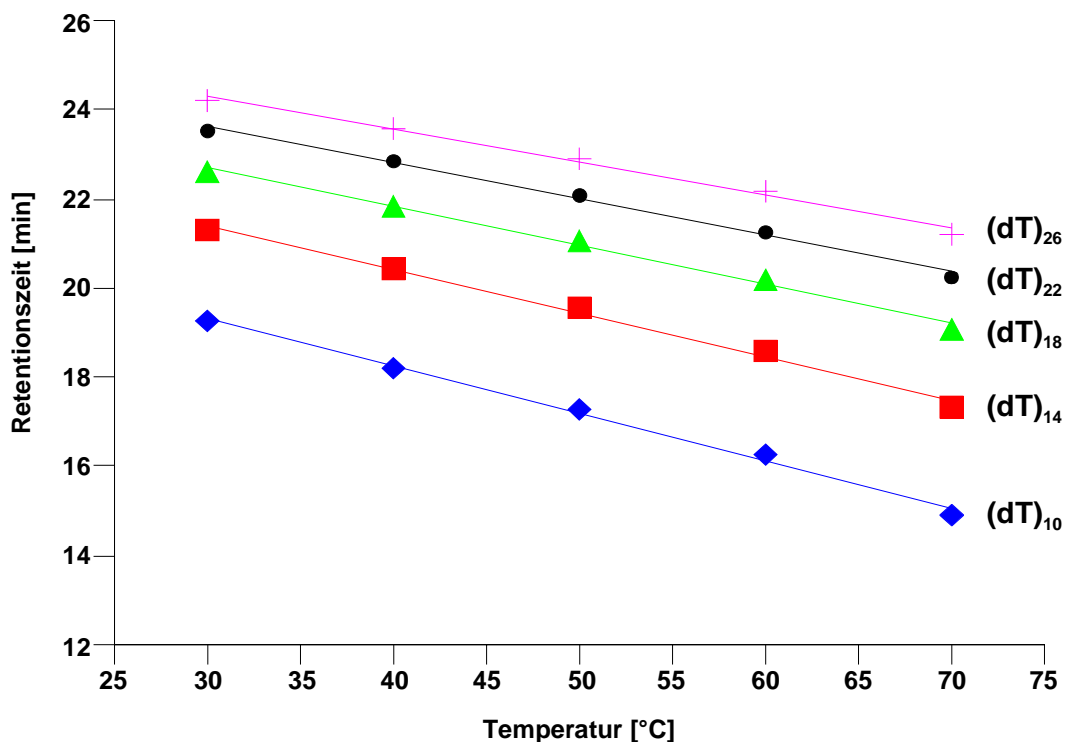
bestimmt werden. Dies ist am Beispiel des PS/DVB-Monolithen für  $T=80^{\circ}\text{C}$  in **Abbildung 3.16** dargestellt. Da diese Koeffizienten sowohl von der stationären Phase als auch von der jeweiligen Temperatur abhängen, müssen sie für alle Nukleotide und alle gewählten experimentellen Bedingungen stets neu bestimmt werden. Eine Übertragung der Koeffizienten von z.B. Temperatur 1 auf Temperatur 2 ist nicht ohne weiteres möglich.



**Abbildung 3.16.** Bestimmung der empirischen Koeffizienten zur Retentionszeitvorhersage mittels Additivem Modell. Auftragung der experimentell bestimmten Retentionszeiten für verschiedene Homooligonukleotide (10-26 Nukleotide) gegen die Sequenzlänge. Daten gemessen auf einem PS/DVB-Monolithen bei  $T=80^{\circ}\text{C}$ . (Experimentelle Bedingungen siehe **Abbildung 3.15**).

Während die Retentionszeiten der Homooligonukleotide des Thymidins, Adenosins und des Cytidins problemlos bei allen Temperaturen bestimmt werden konnten, ergab sich bei den Homooligonukleotiden des Guanosins aufgrund der starken inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Nucleobasen das Problem, dass diese nur bei einer Temperatur von  $T=70^{\circ}\text{C}$  für den Monolithen getrennt werden konnten. Nur bei diesen erhöhten Temperaturen konnten die störenden Wechselwirkungen unterdrückt und die Oligonukleotide effektiv getrennt werden. Bei niedrigeren Temperaturen wurden ausschließlich extrem flache und

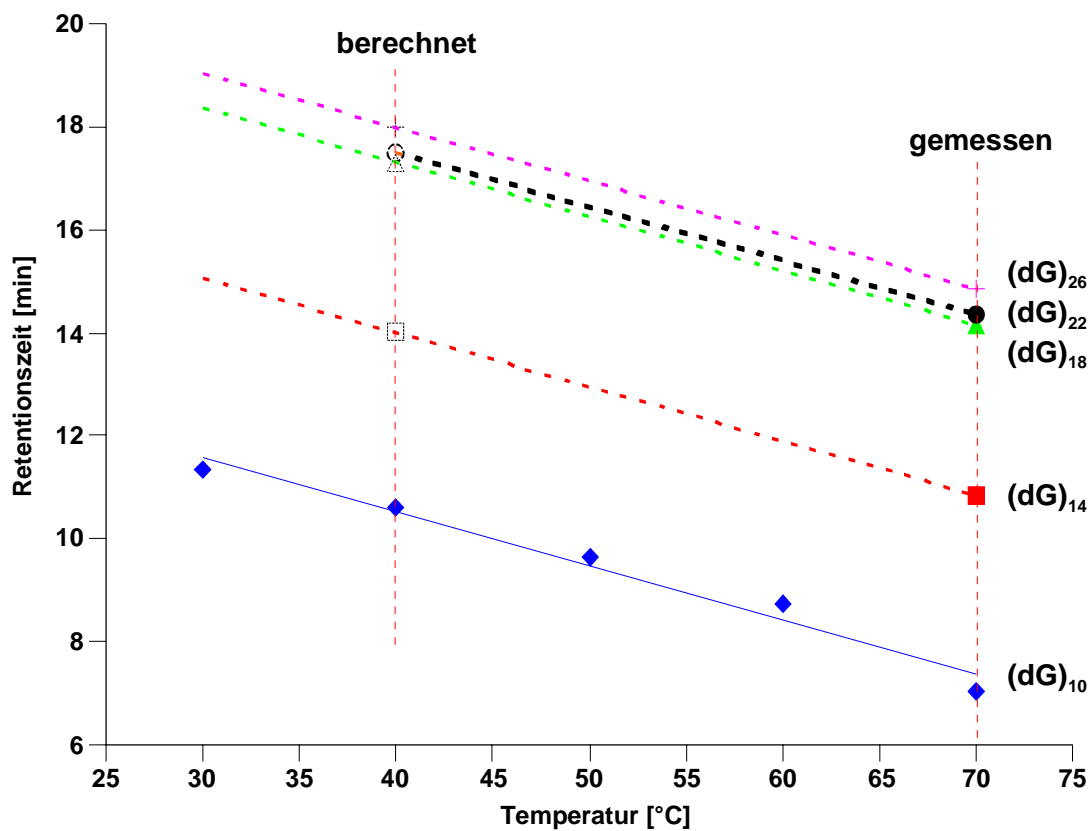
breite Peaks beobachtet, wie sie auch z.B. bei der PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule ohne Wärmetauscher aufgetreten waren (vgl. **Abbildung 3.39**). Lediglich die Homooligonukleotide des kürzesten Standards ((dG)<sub>10</sub>) konnten bei niedrigeren Temperaturen (60°C, 50°C, 40°C und 30°C) sinnvoll chromatographiert werden. Um aus den vorliegenden experimentellen Daten trotzdem noch die fehlenden Koeffizienten der längeren Oligonukleotide bestimmen zu können, wurde zunächst die Temperaturabhängigkeit der Retentionszeiten der bestimmbareren Homooligonukleotide des Thymidins, Adenosins und Cytidins untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese Retentionszeiten unabhängig von der Länge des Homooligonukleotids mit steigender Temperatur fast linear abnehmen. Dies ist am Beispiel des Thymidins für verschiedene Temperaturen in **Abbildung 3.17** exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 3.17.** Temperaturabhängigkeit der Retentionszeiten gezeigt am Beispiel verschiedener Thymidin-Homooligonukleotide ((dT)<sub>x</sub>, X=10-26) gemessen auf einem PS/DVB-Monolithen.

Weiterhin ist aus **Abbildung 3.17** ersichtlich, dass alle Homooligonukleotide, unabhängig von ihrer Länge, eine vergleichbare Abhängigkeit der Retentionszeit von der Temperatur zeigen, d.h. die Retentionszeiten aller Oligonukleotide haben

annähernd die gleiche Steigung. Aufgrund dieser Tatsache können nun aus den vorhandenen experimentellen Daten die fehlenden Koeffizienten des Oligo-Guanosins berechnet werden. Aus den experimentell bestimmten y-Achsenabschnitten (Retentionszeiten der Homooligonukleotide bei  $T=70^{\circ}\text{C}$ ) sowie der anhand des 10mer Homooligonukleotid experimentell bestimmten Steigung können nun die fehlenden Koeffizienten der längeren Oligonukleotide für die jeweiligen Temperaturen berechnet werden. Dies ist in der nachfolgenden Abbildung für den Monolithen dargestellt.



**Abbildung 3.18.** Bestimmung der Koeffizienten des Oligoguanosins bei verschiedenen Temperaturen. Nur die Retentionszeiten des  $(dG)_{10}$  konnten bei allen Temperaturen experimentell gemessen werden. Für die längeren Oligonukleotide konnten lediglich Werte bei  $T=70^{\circ}\text{C}$  gemessen werden, während die restlichen berechnet werden mussten.

Mit diesen Daten konnten die Koeffizienten für alle Basen bei allen Temperaturen bestimmt werden. Diese sind in **Tabelle 3.5** exemplarisch für den Monolithen zusammengestellt.

**Tabelle 3.5.** Experimentell bestimmte Koeffizienten für eine PS/DVB-Monolithen für unterschiedliche Temperaturen. Die Koeffizienten dienen zur Berechnung der Retentionszeiten synthetischer Oligonukleotide für das Additive Retentionsmodell gemäß **Gleichung 3.7**.

		PS/DVB-Monolith				
Homooligonukleotid	Bez.	<i>T</i> =80°C	<i>T</i> =60°C	<i>T</i> =50°C Wert	<i>T</i> =40°C	<i>T</i> =30°C
(dT) <sub>n</sub>	t	6.9251	6.2212	5.8633	5.6084	5.1643
(dA) <sub>n</sub>	a	5.9489	5.3457	4.4104	4.4268	4.2978
(dC) <sub>n</sub>	c	5.6349	5.4520	5.3333	5.1622	5.8577
(dG) <sub>n</sub>	g	8.1220	7.8423	7.9574	7.9873	8.3434
(dT) <sub>n</sub>	f	-1.8411	2.0484	3.9524	5.4722	7.5351
(dA) <sub>n</sub>	e	-2.4272	0.1643	2.6571	3.0160	3.0862
(dC) <sub>n</sub>	h	-6.5247	-3.6397	-2.1907	-0.6473	-1.1708
(dG) <sub>n</sub>	i	-11.751	-8.8021	-8.1052	-7.1748	-7.1863

Mit den in **Tabelle 3.5** aufgeführten Koeffizienten können nun die Retentionszeiten der in **Tabelle 3.1** aufgeführten Oligonukleotide mittels **Gleichung 3.7** (Herleitung der Gleichung Kapitel 3.2.1) berechnet werden. Die Ergebnisse werden in Kapitel 3.6.3 diskutiert.

$$y = \left( \frac{n_a \cdot a + n_t \cdot t + n_c \cdot c + n_g \cdot g}{N} \right) \cdot \ln N + \left( \frac{n_a \cdot e + n_t \cdot f + n_c \cdot h + n_g \cdot i}{N} \right)$$

**Gleichung 3.7.** Gleichung zur Berechnung des Retentionsverhaltens von Heterooligonukleotiden basierend auf der Sequenz und der Gesamtlänge ohne Berücksichtigung struktureller Besonderheiten.

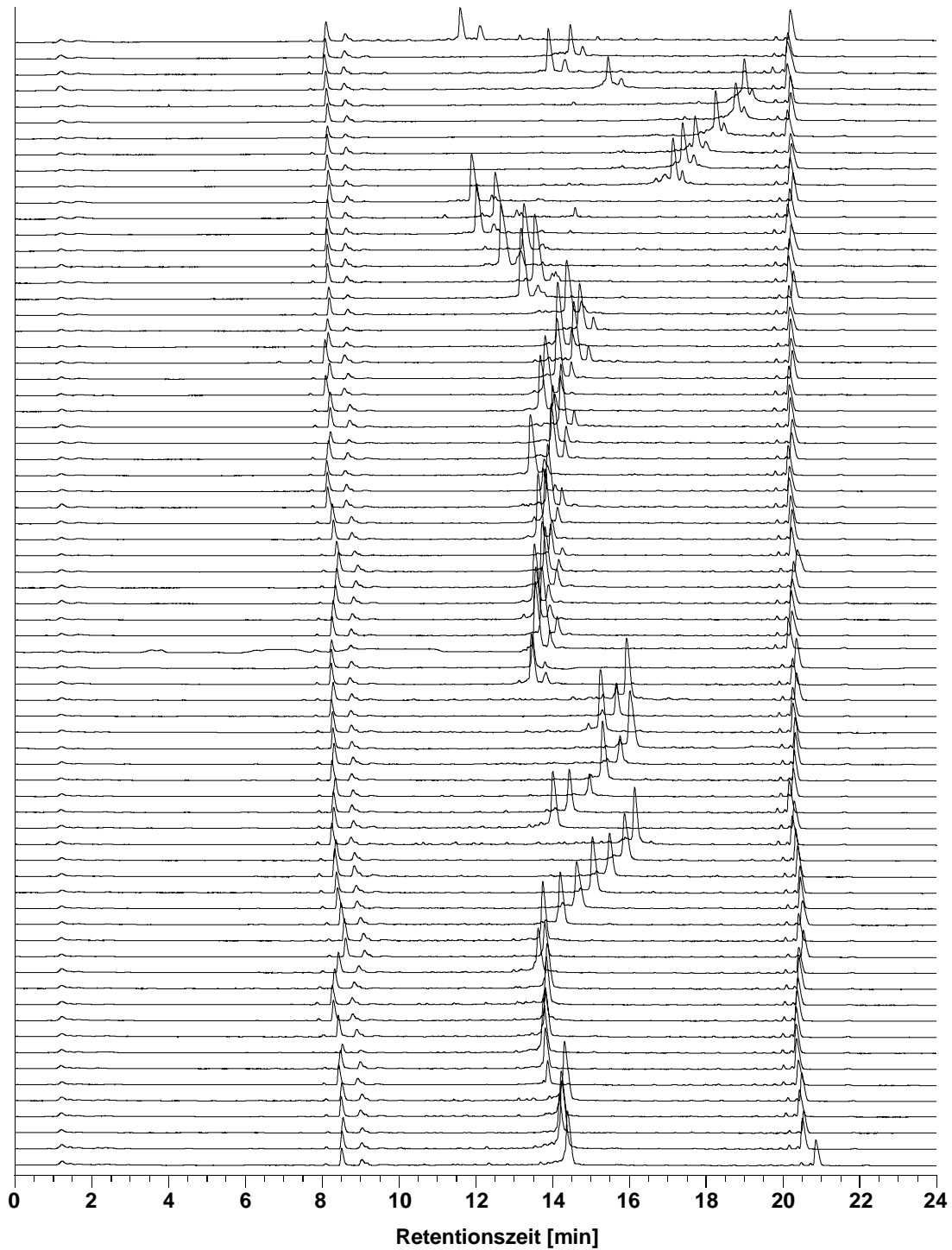
### 3.6.3. Diskussion und Auswertung

Um die Leistungsfähigkeit des Additiven Vorhersagemodells mit den neu bestimmten Koeffizienten zu testen, wurden 72 verschiedene Oligonukleotide (**Tabelle 3.1**) bei 5 verschiedenen Temperaturen auf einem PS/DVB Monolith (5), einer PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule (4) und einer Vydac Everest C<sub>18</sub> (2)) getrennt. Die Ergebnisse der Untersuchung der PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule und der Vydac Everest C<sub>18</sub> Säule sind in Kapitel 3.8 aufgeführt. Um den Einfluss der Sequenzen auf das Retentionsverhalten zu erfassen, wurden die Oligonukleotide so ausgewählt, dass sie sich sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Sequenz unterscheiden.

Ein Overlay von 72 verschiedenen Messungen auf einem PS/DVB-Monolithen bei 80°C ist in **Abbildung 3.19** dargestellt. Je nach Sequenz lagen die gemessenen Retentionszeiten zwischen 11.7 und 19 min. Für die beiden internen Standards wurde bei 80°C eine Standardabweichung von 0.14 min für (dC)<sub>14</sub> und von 0.13 min für (dT)<sub>26</sub> bestimmt. Vergleichbar gute Standardabweichungen wurden auch bei 60°C ((dC)<sub>14</sub>: 0.14 min, (dT)<sub>26</sub>: 0.29 min), 50°C ((dC)<sub>14</sub>: 0.08 min, (dT)<sub>26</sub>: 0.22 min) und 40°C ((dC)<sub>14</sub>: 0.17 min, (dT)<sub>26</sub>: 0.34 min) und 30°C ((dC)<sub>14</sub>: 0.44 min, (dT)<sub>26</sub>: 0.60 min) erhalten.

Um die Leistungsfähigkeit des Additiven Retentionsvorhersage-Modells (A.M.) untersuchen zu können, wurden die experimentell bestimmten Retentionszeiten mit den berechneten Retentionszeiten verglichen. Die Daten für den PS/DVB-Monolithen sind in **Tabelle 3.16** (Anhang: Kapitel 3.10) aufgeführt. Die Tabelle enthält zusätzlich die Retentionszeiten, die mittels SVM-Modell berechnet wurden. Dieses Modell wird im nächsten Kapitel näher erläutert und diskutiert.

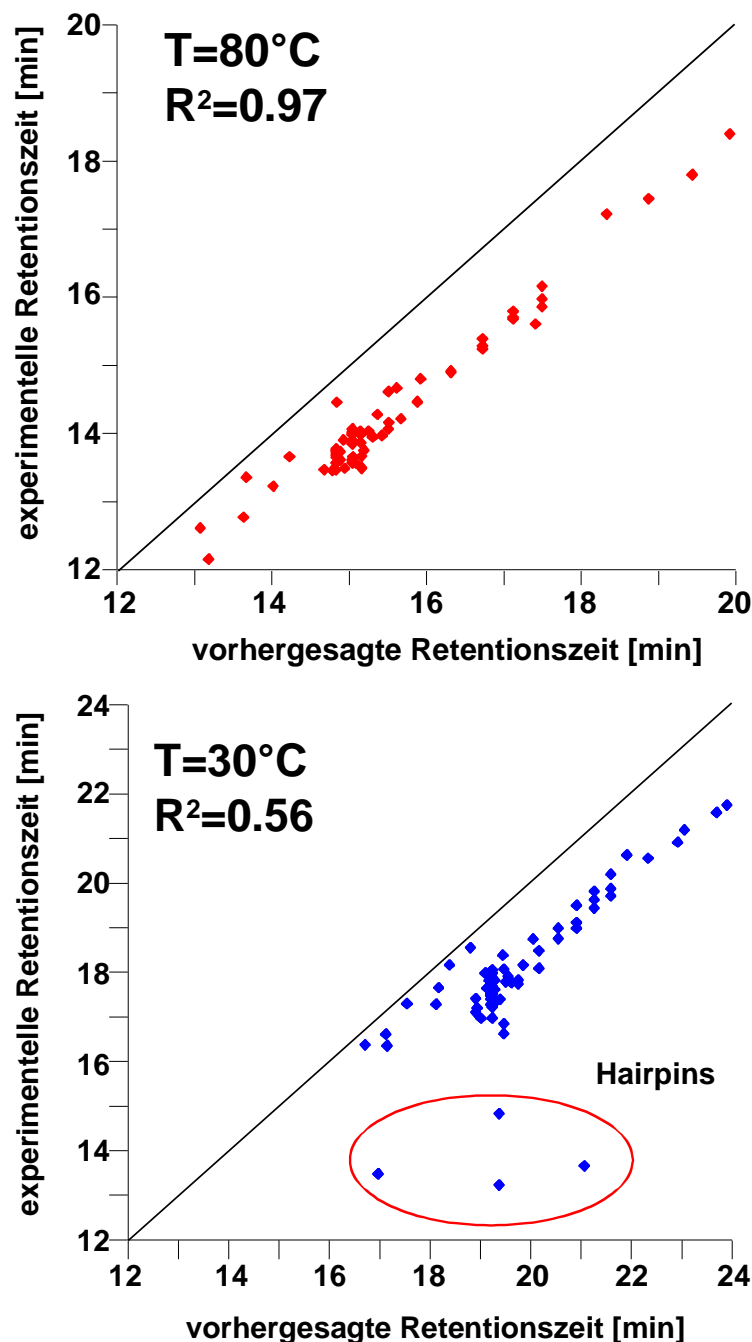




**Abbildung 3.19.** Overlay der Trennung von 72 verschiedenen Oligonukleotiden auf einer PS/DVB-Monolithen Säule bei  $T=80^{\circ}\text{C}$ .

Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 40% ACN; linearer Gradient: 0-16% ACN in 30 min; Fluss: 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; Temperatur:  $80^{\circ}\text{C}$ ; Probe: Standards  $(\text{dC})_{14}$  (erster Peak) und  $(\text{dT})_{26}$  (dritter Peak), Oligonukleotid (zweiter Peak),  $(\text{dC})_{14}$  und  $(\text{dT})_{26}$  1 ng und Oligonukleotid 2.5 ng.

**Abbildung 3.20** zeigt die Ergebnisse für die Korrelation der experimentellen und berechneten Retentionszeiten für 30 und 80°C. Dabei zeigt sich für 80°C mit einem  $R^2$  von 0.97 eine sehr gute Korrelation der gemessenen und vorhergesagten Werte, während für 30°C, mit einem Wert von 0.56, eine sehr unbefriedigende Übereinstimmung erhalten wurde.



**Abbildung 3.20.** Ergebnisse der Retentionszeitvorhersage auf einem PS/DVB-Monolithen bei 30 und 80°C. Die  $R^2$ -Werte entsprechen der quadrierten Korrelation zwischen den experimentellen und berechneten Reaktionszeiten.

Eine besonders signifikante Abweichung wurde dabei für die Hairpinstrukturen erhalten (rot markierte Werte bei T=30°C). Weiterhin ist aus diesen Abbildungen ersichtlich, dass die Korrelation der experimentellen und berechneten Werte untereinander korrekt wiedergegeben wird, die berechneten Retentionszeiten jedoch systematisch zu höheren Retentionszeiten hin verschoben sind. Diese Verschiebung der Werte wird in den Abbildungen dadurch deutlich, dass sich die einzelnen Datenpunkte deutlich unterhalb der „idealen Kurve“ (schwarz markierte Linie in Abbildungen) befinden. Würden die berechneten Werte exakt mit den experimentellen Werten übereinstimmen, so würden alle Datenpunkte genau auf dieser „idealen“ Kurve mit der Steigung von 1 und einem Achsenabschnitt von 0 liegen. Dass diese erhöhten berechneten Werte jedoch nicht das Ergebnis eines fehlerhaften Vorhersagemodells sind, kann dadurch bewiesen werden, dass die relative Korrelation der experimentellen und berechneten Werte durch das Modell korrekt wiedergegeben wird, d.h. die Werte sind korrekt berechnet, jedoch einfach um einen bestimmten Faktor verschoben. Da für die Praxisanwendung die exakten Retentionszeiten wichtiger sind als die relativen Retentionszeiten, wurden die berechneten Daten durch empirische Faktoren so korrigiert, dass das Verhältnis zwischen berechneter und experimenteller Retentionszeit erhalten blieb, jedoch die Verschiebung der berechneten Werte ausgeglichen wurde. Dies wurde durch die Einführung von zwei Korrekturfaktoren  $c_1$  und  $c_2$  erreicht, wobei mit  $c_1$  die Werte der Steigung und mit  $c_2$  die Werte des Achsenabschnittes korrigiert wurden. Dies ist in folgender **Gleichung 3.8** dargestellt:

$$y = c_1 \cdot \left( \frac{n_a \cdot a + n_t \cdot t + n_c \cdot c + n_g \cdot g}{N} \right) \cdot \ln N + \left( \frac{n_a \cdot (e + c_2) + n_t \cdot (f + c_2) + n_c \cdot (h + c_2) + n_g \cdot (i + c_2)}{N} \right)$$

**Gleichung 3.8.** Gleichung zur Berechnung des Retentionsverhaltens von Heterooligonukleotiden, basierend auf der Sequenz und der Gesamtlänge ohne Berücksichtigung struktureller Besonderheiten inklusive der empirischen Korrekturfaktoren  $c_1$  und  $c_2$ .

Die Faktoren  $c_1$  und  $c_2$  wurden dabei so gewählt, dass sich die Regressionsgerade durch die Datenpunkte der „idealen“ Gerade (Steigung 1, Achsenabschnitt 0)

annähert. In nachfolgender **Tabelle 3.6** sind die jeweiligen Werte der Korrekturfaktoren für den PS/DVB-Monolithen bei verschiedenen Temperaturen aufgeführt.

**Tabelle 3.6.** Korrekturfaktoren zur Angleichung der berechneten Retentionszeiten an die experimentell bestimmten Retentionszeiten.

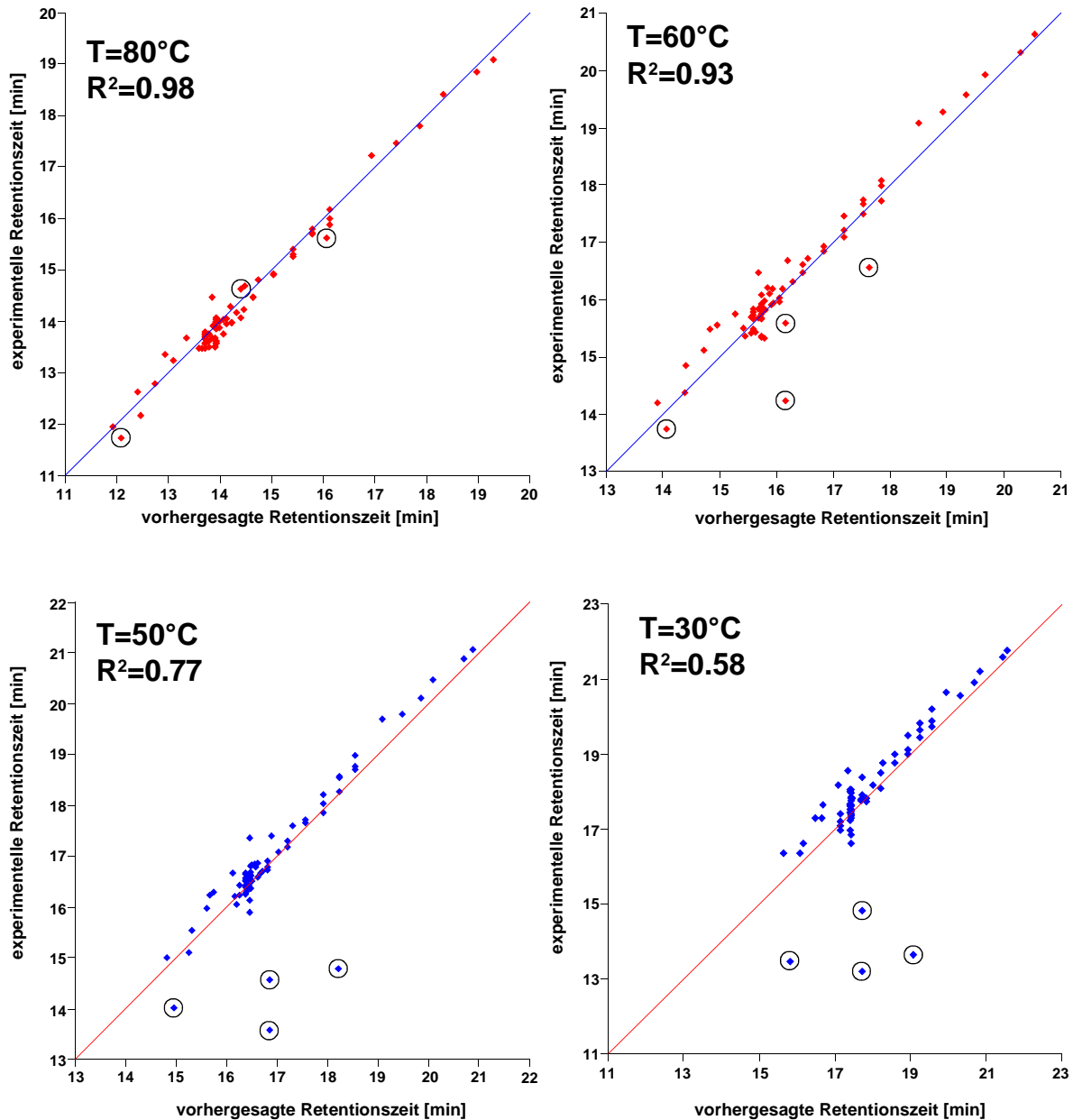
Temperatur [°C]	Korrekturfaktor	
	Steigung ( $c_1$ )	Achsenabschnitt ( $c_2$ )
80	0.86	1.85
60	0.83	2.31
50	0.80	2.80
40	0.80	2.50
30	0.79	2.30

Wie aus **Tabelle 3.6** ersichtlich, wurden für nahezu alle Temperaturen ähnliche Werte für die jeweiligen Korrekturfaktoren erhalten. Für die Korrektur der Steigung schwankten diese Werte zwischen 0.79 (30°C) bis 0.86 (80°C) und für die Korrektur des Achsenabschnittes zwischen 1.85 (80°C) und 2.80 (50°C). Die mittels dieser Korrekturfaktoren korrigierten berechneten Retentionszeiten sind in nachfolgender **Abbildung 3.21** dargestellt. Weiterhin ist hieraus ersichtlich, dass nur die totalen Retentionszeiten korrigiert wurden, nicht jedoch die relative Abweichung zwischen den experimentellen und berechneten Daten. Dies ist ein Indiz dafür, dass die durchgeführte Wertekorrektur korrekt und erlaubt war. Vergleicht man die korrigierten berechneten Retentionszeiten mit den unkorrigierten Werten (**Tabelle 3.7**), so sieht man, dass durch die Einführung der Korrekturfaktoren eine deutliche Verbesserung der Vorhersage erreicht werden konnte.

**Tabelle 3.7.** Parameter für die Bewertung der Qualität der Retentionszeitvorhersage.

T [°C]	$R^2$	PS/DVB-Monolith	
		rel. Fehler [%] (korrigiert)	rel. Fehler [%] (unkorrigiert)
80	0.98	1.18	8.70
60	0.93	1.48	6.10
50	0.77	2.13	6.50
40	0.61	2.64	8.51
30	0.58	3.27	10.23

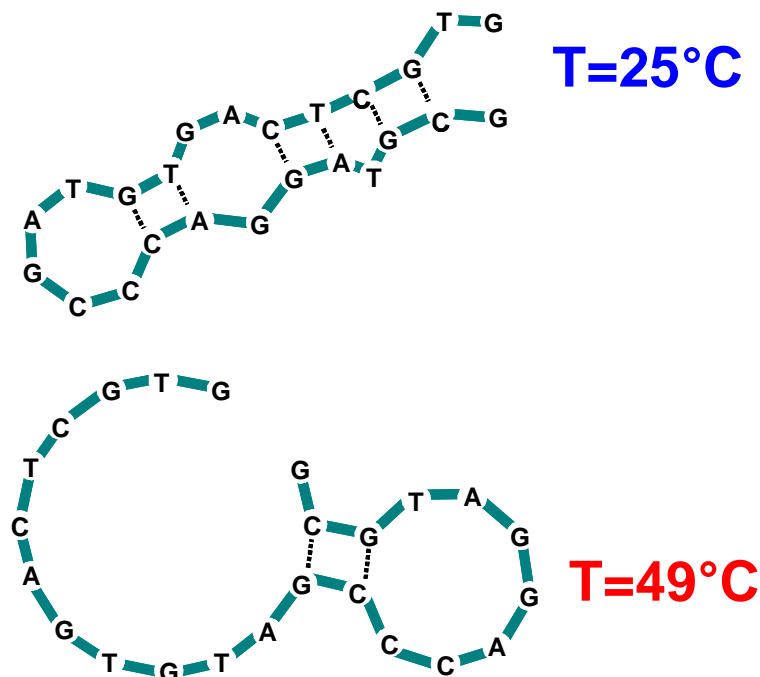
Dies zeigt sich darin, dass die durchschnittlichen relativen Abweichungen zwischen den experimentellen und berechneten Werten deutlich verbessert wurden. Für 80°C wurde eine Verbesserung um Faktor 7.4, für 60°C um Faktor 4.1, für 50°C um Faktor 3.1, für 40°C um Faktor 3.2 und für 30°C um Faktor 3.1 erreicht.



**Abbildung 3.21.** Ergebnisse der korrigierten Retentionszeitvorhersage auf einem PS/DVB-Monolithen bei 30-80°C. Die R<sup>2</sup>-Werte entsprechen der quadrierten Korrelation zwischen den experimentellen und berechneten Reaktionszeiten. Die Hairpinstrukturen wurden durch einen Kreis markiert.

Weiterhin bestätigen die in dieser Studie erhaltenen Ergebnisse die vorherigen Annahmen über die Schwachstellen des Additiven Retentionsvorhersage-Modells. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, liegt der größte Nachteil dieses Modells darin, dass es zur Vorhersage der Retentionszeiten lediglich die Basensequenz (Gesamtladung, Gesamthydrophobie), jedoch keine strukturellen Eigenschaften berücksichtigt. Da bei hohen Temperaturen diese strukturellen Eigenschaften jedoch weitgehend unterdrückt werden können, ermöglicht das Modell unter diesen Bedingungen sehr gute Retentionsvorhersagen (**Abbildung 3.21** – 80°C). Reduziert man jedoch die Temperatur, so vergrößert sich der Einfluss der Struktur auf das Retentionsverhalten signifikant, was zu einer deutlichen Verschlechterung der Vorhersage führt. Die strukturelle Veränderung von Oligonukleotiden bei unterschiedlichen Temperaturen ist exemplarisch für Sequenz 38 (**Tabelle 3.1**) in **Abbildung 3.22** dargestellt.

**Nr. 38: GTG CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCG**

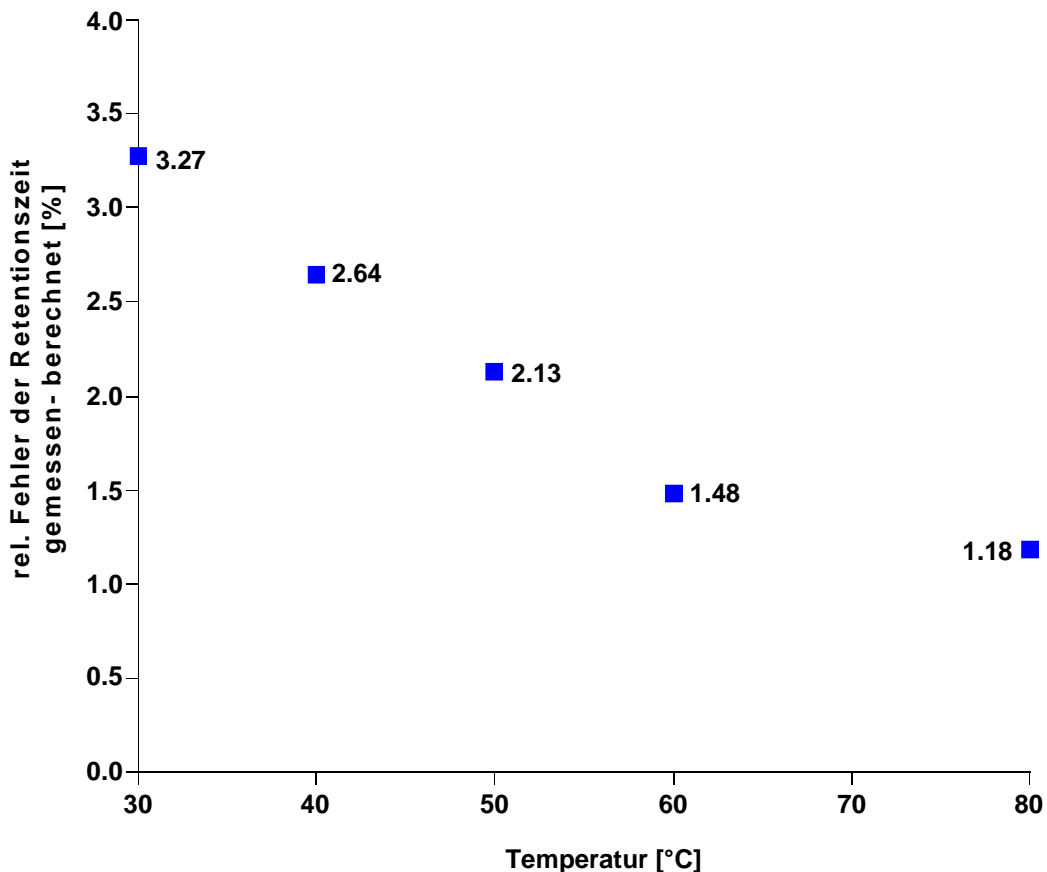


**Abbildung 3.22.** Berechnung der Struktur eines 24mer Heterooligonukleotids (Nr. 38) bei 25 und 49°C. Berechnungen wurden mit der Software von I. Hofacker (Vienna RNA Package, RNA Secondary Structure Prediction and Comparison, <http://www.tbi.univie.ac.at>) durchgeführt.

Während es bei 25°C noch zur Ausbildung von 6 Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleobasen kommt (G(3)↔C(23), C(4)↔G(22), T(5)↔A(20), C(6)↔G(19), T(9)↔A(17), G(10)↔C(16)), sind bei 49°C nur noch 2 Nukleobasen (Basen rot und blau in Abbildung markiert, G(13) ↔C(23), C(14) ↔G(22)) miteinander verknüpft, was eine starke Entfaltung des Moleküls bewirkt. Dadurch können mehr Nukleobasen (Hydrophobie) und Phosphatgruppen (Ladung) mit der stationären Phase wechselwirken, was einen deutlichen Einfluss auf das Retentionsverhalten des Analyten hat. Ein ähnlicher Einfluss der Temperatur auf die Struktur und damit auf das Retentionsverhalten des Analyten wurde bereits von Berti *et. al.* für das Retentionsverhalten doppelsträngiger DNA festgestellt und untersucht [88].

Besonders stark ausgeprägt ist dieser Einfluss bei Hairpinstrukturen, da ihre Struktur stark von der Temperatur beeinflusst wird (vgl. **Abbildung 3.36**). Wie aus **Abbildung 3.21** ersichtlich, führt eine schrittweise Absenkung der Temperatur von 80°C auf 30°C dazu, dass die Vorhersage der Retentionszeiten für die Hairpinstrukturen (**Abbildung 3.21** durch Kreise markiert) zunehmend schlechter wird. Während bei 80°C noch eine gute Vorhersage mittels Additivem Retentionszeitvorhersage-Modell möglich ist, wird für 30°C nur noch eine sehr schlechte Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Werten erhalten. Dies wird auch durch die Abnahme des Korrelationskoeffizienten von 0.98 (80°C) auf 0.58 (30°C) bzw. durch die Verschlechterung der Werte für den relativen Vorhersagefehler (**Tabelle 3.7**, **Abbildung 3.21**) deutlich.

Besonders deutlich wird dieses Verhalten auch, wenn man die durchschnittlichen relativen Vorhersagefehler bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (**Abbildung 3.23**).



**Abbildung 3.23.** Durchschnittlicher relative Fehler der experimentell bestimmten und berechneten Retentionszeiten für 72 Oligonukleotide bei verschiedenen Trenntemperaturen (PS/DVB-Monolith).

Hat man für einen PS/DVB-Monolithen bei 80°C einen mittleren relativen Fehler der Vorhersage von 1.18%, so verdoppelt sich dieser Fehler nahezu (2.64%), wenn man die Temperatur auf 40°C reduziert. Besonders deutlich kann die Vergrößerung dieses Vorhersagefehlers auch anhand der Hairpinstrukturen demonstriert werden. Hat man für Sequenz 72 bei 80°C auf dem Monolithen einen relativen Vorhersagefehler von ca. 3% (exp. 11.74 min, vorh. 12.08 min), so erhöht sich dieser bei einer Verringerung der Temperatur auf 30°C auf 17% (exp. 13.47 min, vorh. 15.82 min). Ein vergleichbares Ergebnis wird auch für Sequenz 71 mit einem Fehler von 1.5% bei 80°C (exp. 14.63 min, vorh. 14.41 min) und 19.5% bei 30°C (exp. 14.83 min, vorh. 17.72 min) erhalten.

Prinzipiell ist für den PS/DVB-Monolithen die Tendenz erkennbar, dass sich der Fehler der Vorhersage signifikant mit der Verringerung der Temperatur erhöht. Für



nahezu alle Systeme führt eine Halbierung der Temperatur zu einer Verdopplung des Vorhersagefehlers.

### 3.6.4. Zusammenfassung

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass das im Rahmen dieser Studie erweiterte und verbesserte Additive Retentionsvorhersage-Modell von M. Gilar nur zur Vorhersage von Retentionszeiten bei hohen Trenntemperaturen verwendet werden kann. Dies kann dadurch begründet werden, dass bei hohen Temperaturen mögliche Sekundärstrukturen wie Hairpins oder partielle Doppelstränge weitestgehend unterdrückt werden können, während bei niedrigen Temperaturen der Einfluss von Sekundärstrukturen auf das Retentionsverhalten deutlich ansteigt. Daher werden für niedrige Temperaturen signifikant schlechtere Übereinstimmungen zwischen experimentellen und vorhergesagten Retentionszeiten erhalten. Ein weiterer Nachteil dieses Modells ist die komplizierte und zeitaufwändige Bestimmung der für die Vorhersage notwendigen Koeffizienten. Da diese charakteristisch für ein HPLC-System sind, ist eine problemlose Übertragung dieser Koeffizienten von Temperatur 1 auf 2 bzw. von stationärer Phase A auf B nicht möglich. Wie diese Studie weiterhin gezeigt hat, ist insbesondere die Bestimmung der spezifischen Parameter für die Nukleotide des Guanosins problematisch, da die für die Bestimmung eingesetzten Homooligonukleotid-Standards nur bei hohen Temperaturen chromatographiert werden können. Dadurch müssen diese Koeffizienten für niedrigere Temperaturen berechnet werden, was wiederum zu einer Verschlechterung der Vorhersage führt.

## 3.7. Retentionszeit-Vorhersage-Modell für Oligonukleotide basierend auf der Support-Vektor-Regression

### 3.7.1. Einführung und Problemstellung

Besonders im Bereich der Chromatographie, welche auf molekularen Wechselwirkungen zwischen den zu trennenden Molekülen einerseits und einem aus zwei Phasen bestehenden Trennsystem (stationäre und mobile Phase) andererseits beruht, wurden in den letzten Jahren erhebliche Anstrengungen unternommen, das Retentionsverhalten der Analyten mittels theoretischer Modelle exakt vorauszuberechnen [1]. Die exakte Vorhersage des Retentionsverhaltens vor allem biologischer Proben ist hilfreich für die oft schwierige Optimierung chromatographischer Trennungen [19,89] oder die einfache und zuverlässige Identifizierung einzelner Analyten (Zielanalyten, Verunreinigungen, Nebenprodukte) in komplexen Mischungen [90].

Untersuchung und Verbesserung des Additiven Retentionsvorhersage-Modells (Kapitel 3.6) haben deutlich die Grenzen und Schwachpunkte dieses Vorhersagemodells aufgezeigt, da zuverlässige Vorhersagen nur für hohe Trenntemperaturen, bei denen strukturelle Eigenschaften der Analyten unterdrückt werden können, möglich sind. Ziel dieser Arbeit war es nun, ein Modell zu entwickeln, das unter Einbeziehung struktureller Eigenschaften der Analyten eine zuverlässige Vorhersage des Retentionsverhaltens von Oligonukleotiden unabhängig von den gewählten chromatographischen Bedingungen (Temperatur, mobile und stationäre Phase, HPLC-Apparatur) erlaubt. Dieses neue Vorhersagemodell, das in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Bioinformatik der Universität Tübingen entwickelt wurde, basiert auf der von Schölkopf *et. al.* vorgeschlagenen  $\nu$ -Supportvektorregression (SVR) [91]. Diese Methode des maschinellen Lernens basiert darauf, dass für einen gegebenen Datensatz ein Modell entwickelt wird, das gleichzeitig den Fehler und die Komplexität des vorliegenden Modells minimiert. Aufgrund dieses Prinzips ist das Modell bestens für die Entwicklung eines Vorhersagemodells in der Chromatographie geeignet.

Um die Leistungsfähigkeit des neuen Modells mit etablierten Vorhersagemodellen (Additives Retentionsmodell) vergleichen zu können, wurde das neue Retentionsmodell ebenfalls auf drei verschiedenen stationären Phasen (PS/DVB-Monolith, PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule, Vydac Everest C<sub>18</sub>) mit 72 Oligonukleotiden (**Tabelle 3.1**) bei verschiedenen Trenntemperaturen (30-80°C) getestet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen des Additiven Retentionsvorhersage-Modells verglichen, wobei besonders die Qualität der Vorhersagen bei niedrigen Temperaturen untersucht wurde.

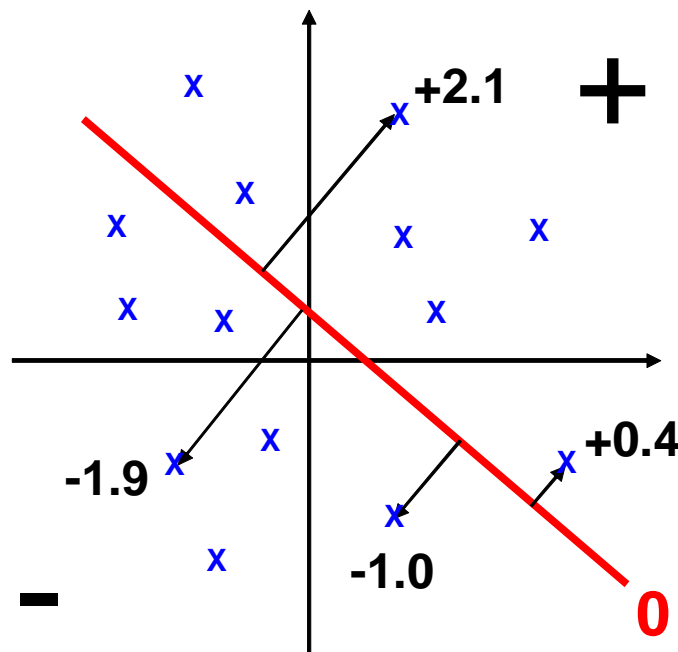
### 3.7.2. Grundprinzip von Support-Vektor-Maschinen

Die Grundlage des neuen Vorhersage-Modells, das auf dem Verfahren des maschinellen Lernens beruht, bilden Support-Vektor-Maschinen. Support-Vektor-Maschinen (SVMs), die bereits heute erfolgreich in den Bereichen der Gesichtsfeldererkennung, Teilchenerkennung, Texterkennung oder in komplexen Datenbanken eingesetzt werden, sind Klassifikatoren, die Objekte so in zwei Klassen teilen, dass die Klassengrenze möglichst weit von allen Objekten entfernt liegt. Um die entsprechende Klassengrenze herum entsteht so ein leerer Rand, dessen Breite solange minimiert wird, bis sein Wert maximal ist. Die SVM ist somit ein Lernalgorithmus zur Klassifizierung von Objekten, der anhand einer bestimmten Menge von Trainingsbeispielen  $((x_1, y_1), \dots, (x_n, y_m))$  mit  $x_i \in X, y_i \in \{-N, +N\}$  eine Hyperebene bestimmt, die die beiden Klassen so voneinander trennt, dass der kleinste Abstand zur Hyperebene (margin) für die Beispiele beider Klassen maximiert wird (**Abbildung 3.24**). Die Idee der Trennung von Objekten durch Hyperebenen geht dabei auf Arbeiten Frank Rosenblatt aus dem Jahre 1958 zurück [92], während das eigentliche Verfahren der Support-Vektor-Maschinen von Vladimir Vapnik eingeführt wurde [93]. Dabei wird die Hyperebene nach dem so genannten Trainingsverfahren, d.h. der Berechnung der Hyperebene zwischen den jeweiligen Trainingsbeispielen (für Retentionszeitmodell Daten der 72 synthetischen Oligonukleotiden), als Entscheidungsfunktion genutzt. Eine Hyperebene ist prinzipiell die Verallgemeinerung einer normalen Ebene (2-dimensional) im 3-dimensionalen Vektorraum auf ein mathematisches Objekt im n-dimensionalen Vektorraum. Ebenso

wie eine 2-dimensionale Ebene dabei ein fester Bestandteil eines 3-dimensionalen Vektorraums ist, ist eine 3-dimensionale Hyperebene Teil eines 4-dimensionalen Raums, wobei die 3-dimensionale Hyperebene selbst ein 3-dimensionaler Teilraum ist. Die Hyperebene wird dabei durch einen Normalenvektor  $w$  und einen so genannten Bias  $b$  definiert, wobei einem Beispiel  $x$  dabei das Vorzeichen der Entscheidungsfunktion als Label zugeordnet wird.

$$y = \text{sgn}(\langle w, x \rangle + b)$$

**Gleichung 3.9.** Definition einer Hyperebene durch einen Normalenvektor  $w$  und eine Bias  $b$ .



**Abbildung 3.24.** Trennung von Objekten mittels Hyperebene in zwei Bereiche. Support-Vektor-Maschinen versuchen dabei die beiden Klassen so zu teilen, dass der Abstand zur Hyperebene für beide Klassen maximiert wird.

Dabei unterscheidet man aufgrund der Datensätze zwischen:

- Linear separierbaren Daten
- Nicht-linear separierbaren Daten

### Linear separierbare Daten

Das einfachste Separierungsproblem liegt dann vor, wenn der zu klassifizierende Datensatz so aufgebaut ist, dass der Lernalgorithmus eine lineare Funktion in Form einer Hyperfunktion verwenden kann. Sind nun zwei Klassen von Daten linear durch eine Hyperebene voneinander trennbar, so gibt es jedoch in der Regel unendlich viele Hyperebenen, die den vorliegenden Datensatz exakt linear separieren. Die Support-Vektor-Maschinen unterscheiden sich nun von anderen Lernalgorithmen dadurch, dass sie versuchen von allen theoretisch möglichen Hyperebenen diejenige zu finden, für die die quadratische Norm  $\|w\|_2^2$  minimal ist. Gleichzeitig muss für alle Trainingsbeispiele  $x_i$  gelten, dass  $y_i(\langle w, x \rangle + b) \geq 1$ , was der Minimierung des kleinsten Abstandes zur Hyperebene entspricht. Die Voraussetzung, dass Daten linear separierbar sind, stellt jedoch meistens die Ausnahme dar.

### Nicht linear separierbare Daten

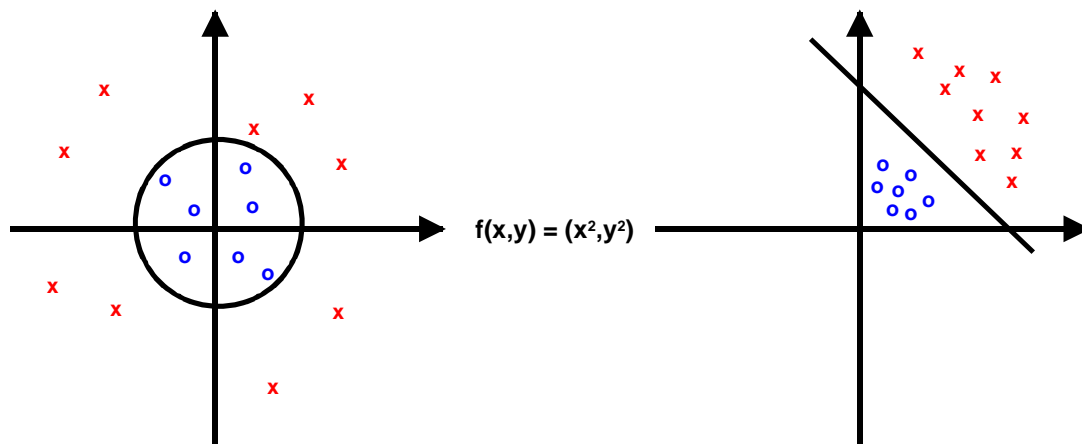
In der Regel sind die Trainingsdatensätze so komplex aufgebaut, dass die darin enthaltenen Daten nicht streng linear separierbar sind. Eine mögliche Ursache dafür können z.B. experimentelle Messfehler sein. Um diese Daten trotzdem verarbeiten zu können, wird das Optimierungsproblem derart verändert, dass Verletzungen bestimmter Nebenbedingungen möglich sind, wobei diese Verletzungen jedoch möglichst minimiert werden sollen. Zu diesem Zweck werden bestimmte Hilfsvariablen eingeführt.

### Support-Vektor-Maschinen

Wie bereits in diesem Kapitel beschrieben, unterscheidet man bei Klassifizierungen prinzipiell zwischen linear- und nicht-linear separierbaren Daten. Während linear separierbare Daten relativ leicht behandelt und klassifiziert werden können, gestaltet sich dieses Problem bei nicht-linear separierbaren Daten deutlich schwieriger. Da die meisten relevanten Datensätze aus nicht-linear separierbaren Daten bestehen, die gängigsten Algorithmen hingegen Daten mittels linearen Funktionen klassifizieren, kann dieses Problem dadurch gelöst werden, dass die nicht-linear separierbaren

Daten einfach in einen Vektorraum höherer Dimension abgebildet werden (**Abbildung 3.25**). Anschließend kann nun eine lineare Regression im höherdimensionalen Raum durchgeführt werden. Die Funktion, die die Transformation der Daten vom N- in den M-dimensionalen Vektorraum durchführt, wird als Kernel-Funktion bezeichnet ( $f: \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^m$ ). Man unterscheidet bei Kernel-Funktionen zwischen:

- linearen Kernel:  $k(x, y) = \langle x, y \rangle$  mit  $x, y \in \mathbb{R}^n$
- polynomielle Kernel:  $k(x, y) = \langle x, y \rangle^d$  mit  $x, y \in \mathbb{R}^n$
- RBF-Kernel:  $k(x, y) = \exp\left(-\frac{\|x-y\|^2}{2\sigma^2}\right)$  mit  $x, y \in \mathbb{R}^n$



**Abbildung 3.25.** Schematische Darstellung der Transformation nicht linear separierbarer Daten aus einem 2-dimensionalen Vektorraum in einen 2-dimensionalen Vektorraum mittels einer einfachen Kernel-Funktion.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen einer linearen Regression im 2-dimensionalen Raum ( $y=m \cdot x+n$ ) kann die Regressionsfunktion im N-dimensionalen Raum jedoch wesentlich komplexer sein. Um dieses Problem zu lösen, gehen die Support-Vektor-Maschinen nun so vor, dass diese die Regressionsfunktion erst im Laufe des Lernvorgangs eigenständig ermitteln, d.h. die eigentliche Regressionsfunktion ist vor Beginn des Lernvorganges nicht bekannt, sondern wird erst im Laufe des Selbigen selbständig vom System entwickelt. Die so erhaltene Funktion kann je nach Komplexität des behandelten Problems sehr umfangreich sein und stellt ihrerseits die Basis des Vorhersagemodells der Oligonukleotide dar.

Der Trainingsdatensatz kann jedoch so komplex sein, dass die darin enthaltenen Daten auch nach der Transformation nicht einfach linear separierbar sind. Eine mögliche Ursache können z.B. experimentelle Messfehler sein. Um diese Daten trotzdem verarbeiten zu können, wird das Optimierungsproblem derart verändert, dass Fehlklassifikationen beim Lernen möglich sind, wobei diese Fehler jedoch möglichst minimiert werden.

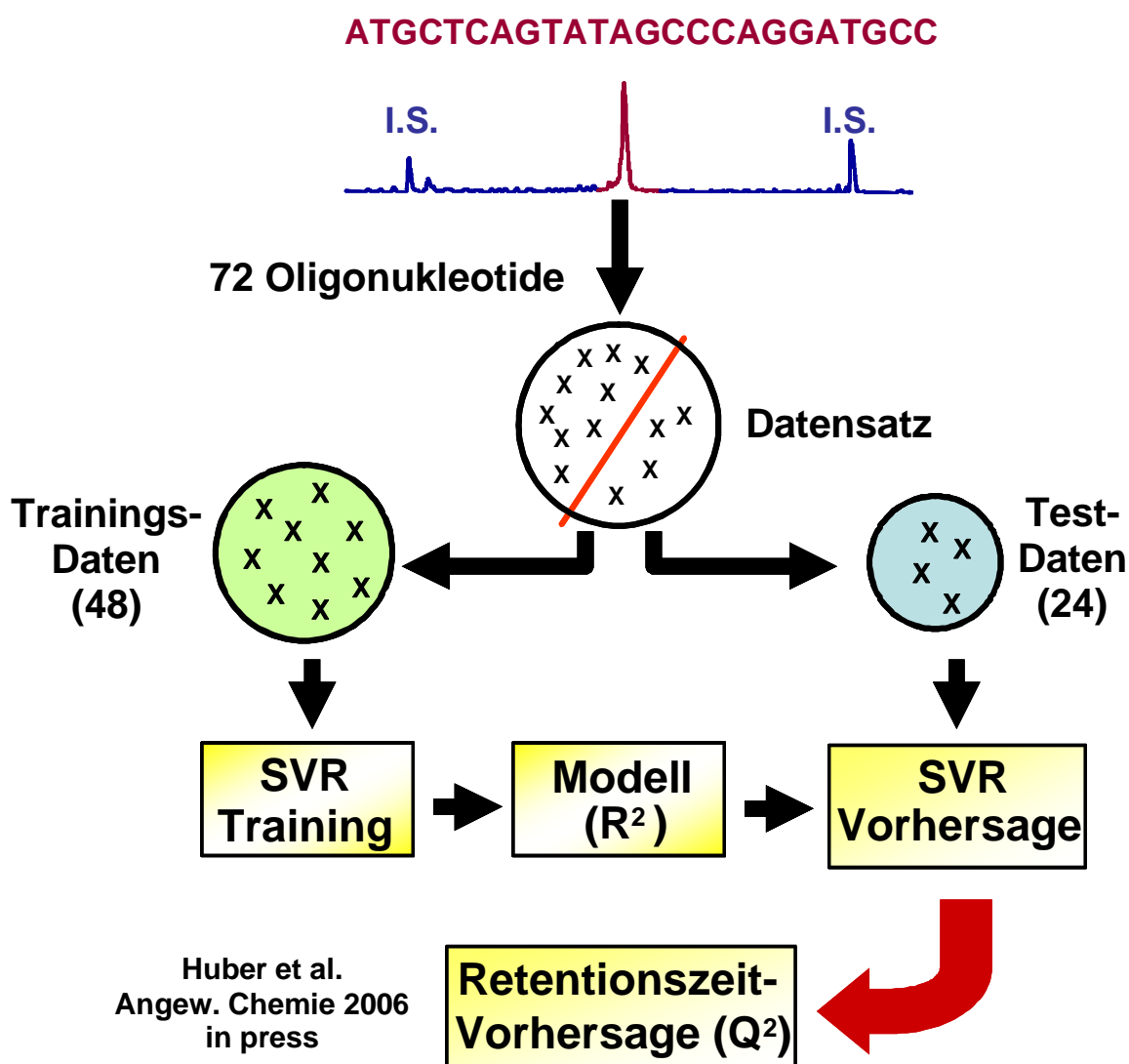
Nach den theoretischen Grundlagen der Support-Vektor-Maschinen wird nun im nächsten Kapitel genauer erläutert wie diese konkret für die Entwicklung des Retentionszeitvorhersage-Modells eingesetzt wurden.

### **3.7.3. Anwendung von Support-Vektor-Maschinen für die Retentionszeitvorhersage von Oligonukleotiden in der IP-RP-HPLC**

Wie bereits in Kapitel 3.7.2 beschrieben, beruht das neue Retentionsvorhersage-Modell auf dem von Schölkopf eingeführten Verfahren der  $\nu$ -Supportvektorregression (SVR) [91]. Diese Methode entwickelt für einen gegebenen Datensatz (z.B. Retentionszeiten von Oligonukleotiden) ein Modell, das gleichzeitig den Modellfehler und die Komplexität des Modells minimiert. Um dieses Modell zu entwickeln, benötigt das System eine ausreichend große Anzahl von Trainingsdaten, wobei die Qualität des entwickelten Modells sehr stark von der Qualität der vorliegenden Datensätze (z.B. der Präzision der gemessenen Retentionszeiten der Oligonukleotide) abhängt (vgl. Test Ultimate 3000 System, Kapitel 3.5). Aus diesen Daten wird in einem ersten Schritt ein Trainingsmodell entwickelt, dessen Qualität anhand des  $R^2$ -Wertes abgeschätzt werden kann. In dieses Trainingssystem fließen neben experimentellen Daten wie z.B. Retentionszeiten auch strukturelle Eigenschaften der Analyten ein. Dieses Trainingssystem kann anschließend dazu benutzt werden, präzise Vorhersagen über unbekannte, nicht im Trainingsmodell enthaltener Systeme durchzuführen. Die Qualität dieser Vorhersagen wird durch den so genannten  $Q^2$ -Wert angegeben. Im nachfolgenden Kapitel werden die einzelnen notwendigen Schritte zur Entwicklung eines Retentionsvorhersage-Modells via Support-Vektor-Maschinen (SVMs) näher erläutert. Eine schematische Darstellung

der Vorgehensweise bei der Modellentwicklung ist dabei in **Abbildung 3.26** abgebildet.

In der ersten Stufe der Entwicklung des Vorhersagemodells wurde ein Testdatensatz durch eine sehr genaue Messung der Retentionszeiten von 72 verschiedenen Oligonukleotiden (**Tabelle 3.1**) erstellt. Wie bereits in Kapitel 3.6.3 beschrieben, wurden dazu 39 Oligonukleotide mit einer Länge von 24 Nukleotiden, 21 Oligonukleotide mit einer Länge zwischen 25-48 Nukleotiden, 8 kürzere Sequenzen im Bereich zwischen 15-21 Nukleotiden und 4 Hairpin-Strukturen verwendet. Die Hairpinstrukturen wurden dabei speziell so ausgewählt, dass diese auch bei höheren Temperaturen (80°C) eine stabile Haarnadelstruktur ausbilden.



**Abbildung 3.26.** Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Entwicklung des Retentionsvorhersage-Modells mittels Support-Vektor-Maschinen.



Zur Entwicklung des SVM-Modells wurden die experimentellen Daten verwendet, die bereits zur Verbesserung des Additiven Retentionsvorhersage-Modells verwendet wurden (vgl. Generierung der experimentellen Retentionszeiten Kapitel 3.6.2). Wie bereits in Kapitel 3.7.2 beschrieben, liegt der große Vorteil der Retentionszeitvorhersage via SVMs darin, dass neben den experimentell bestimmten Retentionszeiten auch strukturelle Eigenschaften in das Vorhersagemodell einfließen können. Diese gehen in Form von Merkmalsvektoren in die Modellentwicklung ein (Kapitel 3.7.2). In unserem Modell besteht der Merkmalsvektor aus elf verschiedenen Werten, die sich neben der Sequenz vor allem aus der Sekundärstruktur des Analyten ableiten. Der prinzipielle Aufbau eines solchen Merkmalsvektors ist in **Abbildung 3.27** schematisch dargestellt. Der Vektor  $x_1, \dots, x_n$  wird dabei als Feature-Vektor bezeichnet und beinhaltet bestimmte strukturelle Eigenschaften. Der Aufbau des Feature-Vektors wird im nachfolgenden näher erläutert. Die Variable  $y$  beinhaltet die quantitative Response des untersuchten Systems, d.h. im Falle unseres Vorhersage-Modells die experimentell bestimmten Retentionszeiten der Oligonukleotide unter den verschiedenen chromatographischen Bedingungen (Temperatur, stationäre Phase, HPLC-System).

$$\left( \begin{array}{c} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ \dots \\ x_n \end{array} \right), y_m \text{ mit } m \in \{1, \dots, 72\}$$

**Abbildung 3.27.** Schematischer Aufbau eines Merkmalsvektors, mittels dessen strukturelle Eigenschaften der Analyten für die Retentionsvorhersage berücksichtigt werden können.

Einen kurzen Überblick über die in dieser Studie verwendeten Feature-Vektoren ist in **Tabelle 3.8** gegeben. In dieser Tabelle sind neben den sequenziellen Einflüssen auch Einflussparameter der Struktur, der Temperatur sowie energetische Einflüsse aufgeführt. Anhand eines konkreten Beispiels soll nun kurz erläutert werden, wie einige dieser einzelnen Parameter der Feature-Vektoren aus einer gegebenen

Oligonukleotid-Sequenz ermittelt werden können. Dazu wird das in **Abbildung 3.22** dargestellte Oligonukleotid bei T=25°C verwendet.

Für dieses Oligonukleotid mit der Sequenz GTGCTCAGTGTAGCCCAGGATGCG ergeben sich für die in **Tabelle 3.8** aufgeführten Feature-Vektoren folgende Werte:

COUNT:	#G=9	#C=6	#T=5	#A=4
CONTACT:	#GT=3	#CT=1	#TT=0	#AT=1
	#GA=1	#CA=2	#TA=1	#AA=0
	#GC=3	#CC=2	#TC=1	#AC=0
	#GG=1	#CG=1	#TG=3	#AG=3
PAIRED:	#G=4	#C=4	#T=2	#A=2
UNPAIRED:	#G=5	#C=2	#T=3	#A=2
SESUM:	10.51 + 6.57 + ... + 9.69 = 199.75 (Daten aus: [94])			

**Tabelle 3.8.** In SVM Modell verwendete Feature-Vektoren zur Berücksichtigung struktureller und energetischer Einflüsse auf das Retentionsverhalten der Analyten.

Bezeichnung	Features	Beschreibung
<b>Sequenzielle Einflüsse</b>		
COUNT	4	Basenzahl (C, G, A, T)
CONTACT	16	Zahl aller Basen 2-Tupel (CG, CA, CT, CC, ...)
SCONTACT	10	Zahl aller Basen 2-Tupel unabh. von der Richtung (CG+CG, CA+AC, CC, ...)
<b>Strukturelle Einflüsse mit Temperaturinformationen</b>		
PAIRED	4	Anteil von C, G, A, T innerhalb einer Stapelung
UNPAIRED	4	Anteil von C, G, A, T außerhalb einer Stapelung
STRUCTURE	12	Anteil von C, G, A, T in Stapelungen, in loops und ungebundene Basen
<b>Temperatureinflüsse</b>		
MULTISTRUCT	6	Anteil der Basen in Stapelungen
MULTITWO	12	Anteil der Basen in Stapelungen, ungebundenen Basen oder Basen in loops
MULTITHREE	18	Anteil der Basen in Stapelungen, loops und ungebunden
MULTIDetail	24	Anteil der Basen in Stapelungen und loops. Anzahl der ungebundenen C, G, A und T.
<b>Energieeinflüsse</b>		
SESUM	1	Anzahl der Stacking Energien der angrenzenden Basen
STACKING	2	Summe der thermodynamischen Parameter $\Delta H$ und $T \cdot \Delta S$

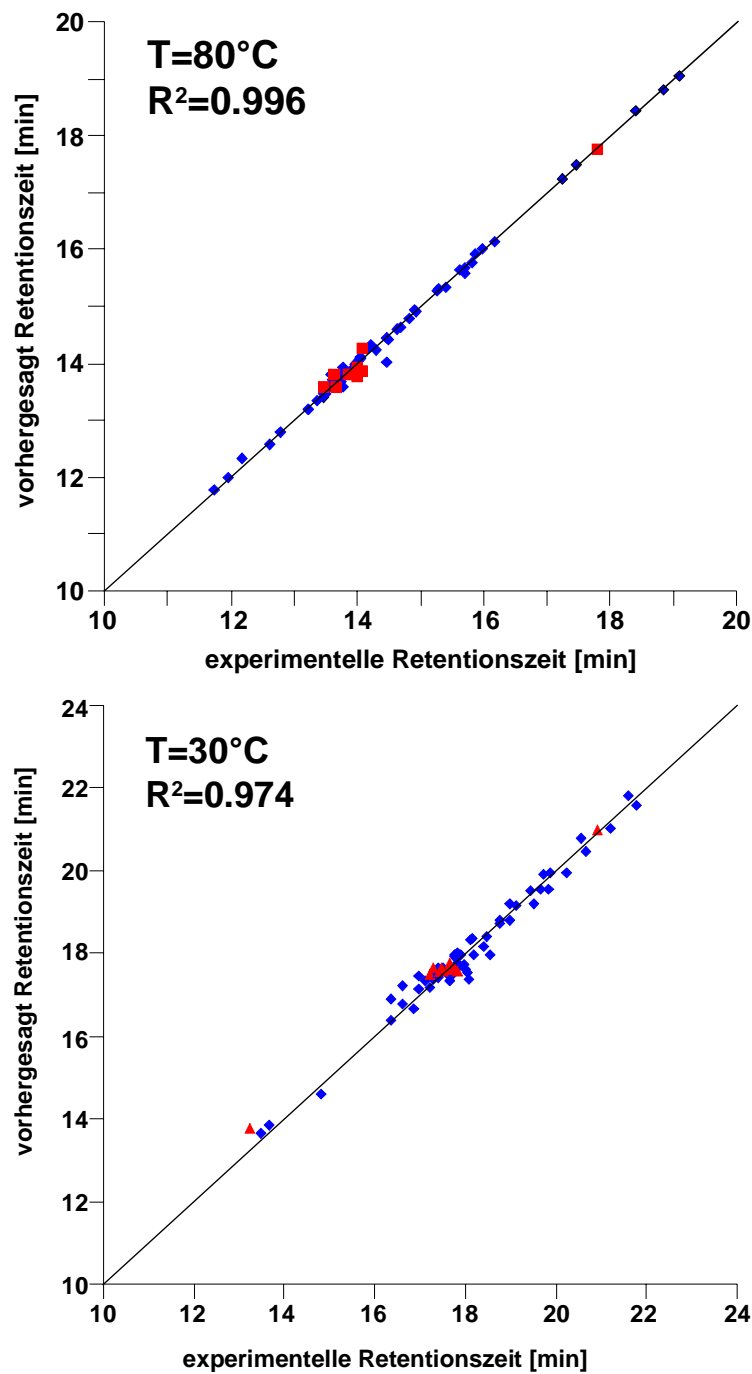
Da einige dieser Feature-Vektoren (z.B. PAIRED, UNPAIRED, ...) stark von den jeweiligen experimentellen Parametern wie z.B. der Temperatur abhängen, müssen diese für alle untersuchten Trainingsmodelle stets neu ermittelt werden. Dabei gehen in die Vektoren Paired, Unpaired und Structure nur die jeweiligen Struktureinflüsse von der Temperatur ein, bei der die experimentellen Daten bestimmt wurden (einfache strukturelle Einflüsse), während in die Vektoren Multistruct, Multitwo, Mulitthree und Multidetail (Strukturelle Einflüsse mit Temperaturinformationen) auch noch die jeweiligen Schmelzkurven der Analyten (30-80°C) eingehen. Die Simulation der jeweiligen Sekundärstrukturen der Oligonukleotide wurde mit dem „Vienna RNA Package Version 1.4“ [95] durchgeführt. Untersuchungen der verschiedenen Feature-Vektoren im Rahmen dieser Arbeit haben dabei gezeigt, dass neben der Gesamtlänge und dem Anteil der verschiedenen Basen an der Gesamtlänge vor allem der Anteil der gepaarten Basen dominierend für das Retentionsverhalten der Oligonukleotide ist. Andere Merkmalsvektoren, die z.B. die Basenabfolge, Basenstapelung oder andere Kodierungen der Sekundär-Informationen enthalten, zeigen dagegen keinen entscheidenden Einfluss auf das Retentionsverhalten der Analyten.

Um das SVM-Modell zu trainieren, wird der Datensatz der 72 Oligonukleotide in drei gleiche Teile à 24 Datenpunkte aufgeteilt (vgl. **Abbildung 3.26**). Anschließend werden zwei Drittel der Testdaten zum Trainieren des Modells verwendet, während das restliche Drittel zur Validierung der Vorhersage benutzt wird. Die drei Teildatensätze werden anschließend solange variiert, bis jeder Teildatensatz mindestens zweimal zum Trainieren des Systems und einmal zur Validierung verwendet wurde. Dieses Verfahren wird als dreifache Kreuzvalidierung bezeichnet. Entscheidend für die Qualität des Trainings- bzw. Vorhersagemodells sind dabei die  $R^2$  – bzw.  $Q^2$ -Werte. Diese Werte geben dabei jeweils die Korrelation des SVR-Modells auf dem Trainingsdatensatz bzw. die Korrelation der vorhergesagten mit den experimentell bestimmten Retentionszeiten an. Das SVR-Modell in dieser Arbeit wurde mit dem Softwarepaket libSVM Version 2.8 [96] erstellt.

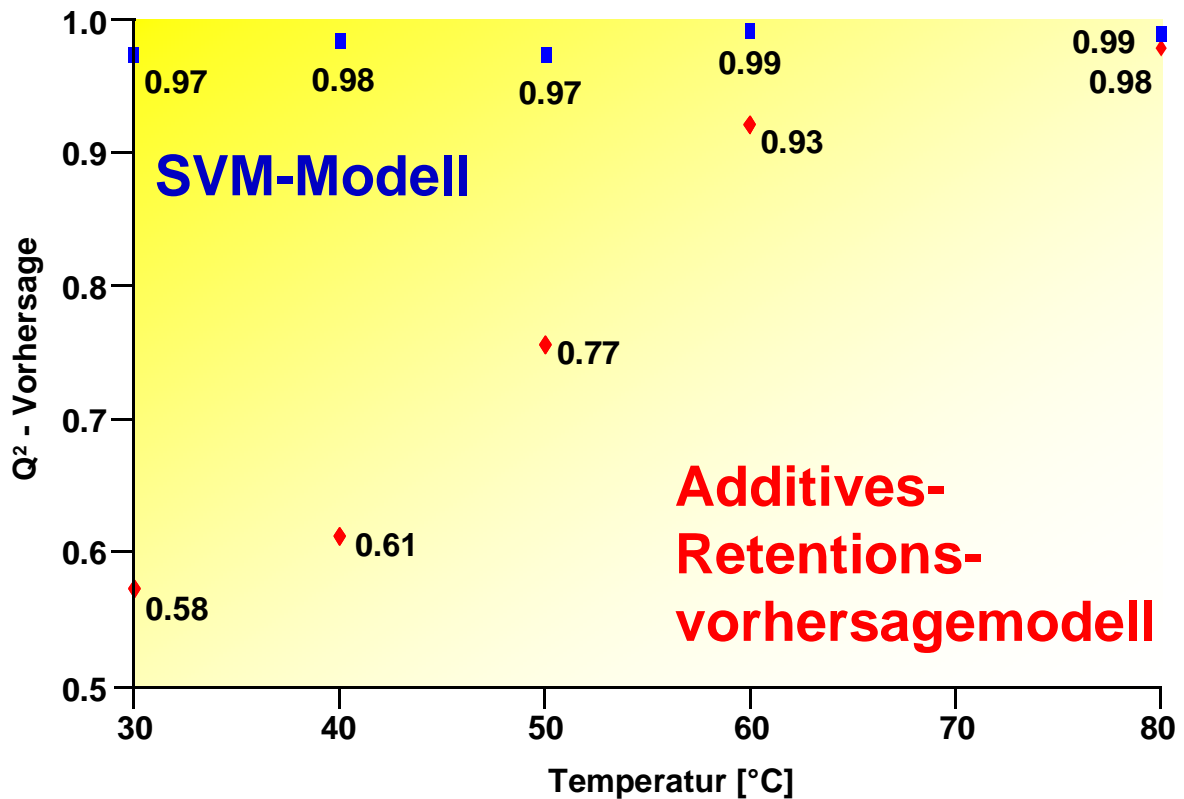
### 3.7.4. Vorhersage der Retentionszeiten synthetischer Oligonukleotide mittels SVM-Modell

Wie bereits für das Additive Modell, wurde auch hier die Leistungsfähigkeit des neuen SVM-Modells durch Vergleich der experimentell bestimmten und vorhergesagten Retentionszeiten bei unterschiedlichen Temperaturen und stationären Phasen durchgeführt. Die Ergebnisse der Vorhersage mittels SVM-Modell sind für den PS/DVB-Monolithen in **Tabelle 3.16** im Anhang (Kapitel 3.10) aufgeführt. Exemplarisch für die verschiedenen Temperaturen und Säulen sind in **Abbildung 3.28** die Ergebnisse für 30 und 80°C (PS/DVB-Monolith) dargestellt. Dabei symbolisieren die blauen Quadrate die  $R^2$ -Werte des Trainingsmodells, d.h. die Übereinstimmung zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten für den Trainingsdatensatz (61 Oligonukleotide), während die roten Dreiecke die Korrelation für den Testdatensatz (11 Oligonukleotide) ( $Q^2$ ) darstellen. Um eine möglichst unabhängige und neutrale Bewertung der Qualität der Vorhersage gewährleisten zu können, wurden dabei die Oligonukleotide des Testdatensatzes vorher nicht zum Trainieren des Modells verwendet.

**Abbildung 3.28** zeigt deutlich die Leistungsfähigkeit des neuen Vorhersagemodells, da sowohl für hohe Temperaturen (80°C) als auch für niedrige Temperaturen (30°C) eine hervorragende Übereinstimmung zwischen experimentellen und vorhergesagten Retentionszeiten erhalten wurde. So wurde für 80°C für den Monolithen ein Korrelationskoeffizient von 0.996 und für 30°C ein Wert von 0.974 bestimmt. Vergleichbar gute Werte wurden auch für 60°C (0.99), 50°C (0.97) und 40°C (0.99) erhalten. Vergleicht man diese Werte mit den Ergebnissen für das Additive Modell (**Tabelle 3.7**), so erhält man bei hohen Temperaturen (80°C) für beide Modelle vergleichbar gute Werte (A.M.: 0.97, SVM: 0.99) während sich die Qualität der Vorhersage bei niedrigen Temperaturen (30°C) für das Additive Modell deutlich verschlechtert (A.M.: 0.56, SVM: 0.97). Ein Vergleich der Korrelationskoeffizienten für verschiedene Temperaturen ist für beide Modelle in **Abbildung 3.29** dargestellt. Signifikant ist dabei die massive Verschlechterung der Vorhersagequalität beim Additiven Modell, wenn eine Temperatur von 60°C unterschritten wird. Im Vergleich dazu liefert das neue SVM-Modell bei allen untersuchten Temperaturen eine vergleichbar hohe Qualität der Vorhersage.



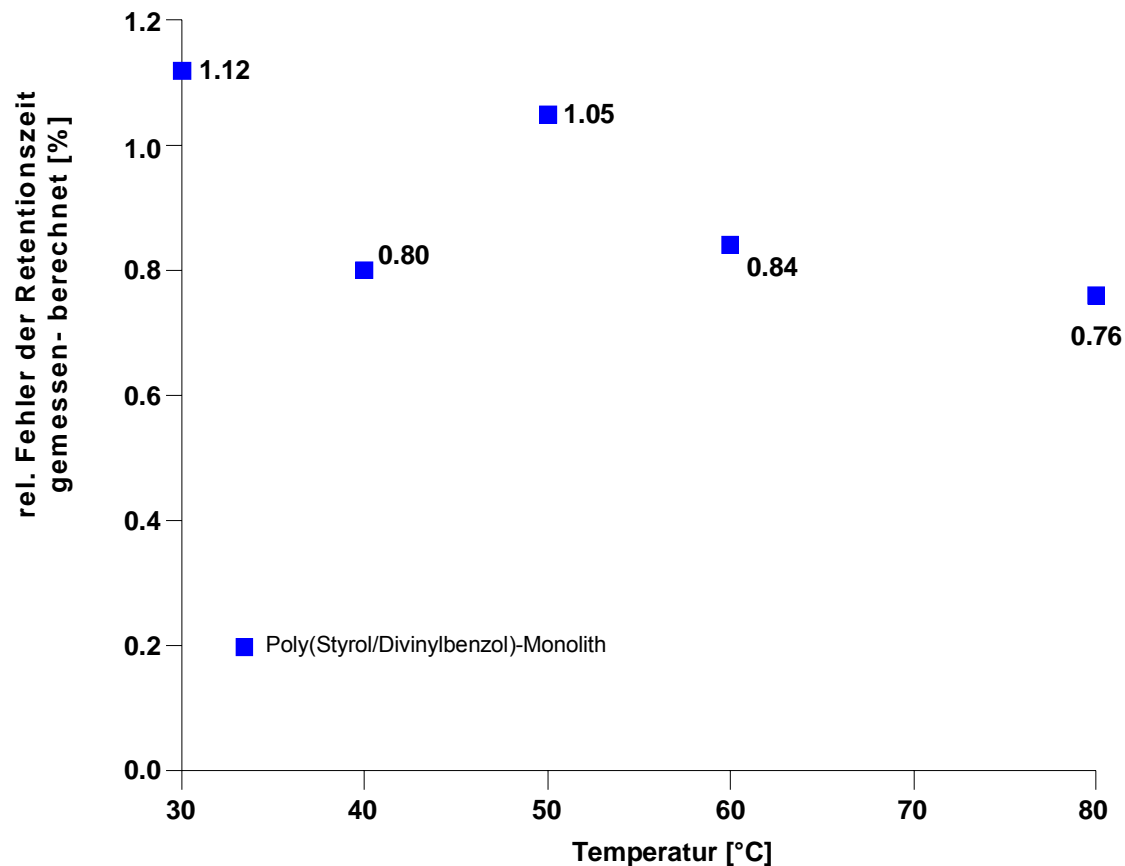
**Abbildung 3.28.** Ergebnisse der Retentionszeitvorhersage auf einem PS/DVB-Monolithen bei 30 und 80°C. Die R<sup>2</sup>-Werte entsprechen der quadrierten Korrelation zwischen den experimentellen und berechneten Reaktionszeiten. Für diese Korrelation wurde der Vorhersagedatensatz (rote Dreiecke) nicht zum Trainieren des Modells (blaue Quadrate) verwendet.



**Abbildung 3.29.** Vergleich der Korrelationskoeffizienten der experimentellen und vorhergesagten Retentionszeiten bei verschiedenen Temperaturen für das SVM- und Additive Vorhersagemodell (Daten für PS/DVB-Monolithen).

Ein weiteres Indiz für die Qualität des neuen Modells ist die geringe Streuung der Datenpunkte sowie das Fehlen von signifikanten Ausreißern, wie es z.B. für das Additive Modell bei niedrigen Temperaturen bei Hairpinstrukturen beobachtet wurde (vgl. **Abbildung 3.21**,  $T=30^{\circ}\text{C}$ ). Die Vorhersage der Retentionszeiten von Hairpinstrukturen mittels SVM-Modell und den sich dabei ergebenden Problemen werden im späteren Verlauf dieses Kapitels näher behandelt.

Neben den Korrelationskoeffizienten ist für die Anwendung eines Vorhersagemodells in der Laborpraxis vor allem der relative Fehler einer Retentionsvorhersage, d.h. wie stark die berechnete von der experimentellen Retentionszeit abweichen, von besonderem Interesse. Daher wurde analog zum Additiven Modell (**Abbildung 3.23**) auch für das SVM-Modell der durchschnittliche relative Fehler für verschiedene Temperaturen und stationäre Phasen berechnet. Dieser ist in **Abbildung 3.30** dargestellt.



**Abbildung 3.30.** Durchschnittlicher relative Fehler der experimentell bestimmten und berechneten Retentionszeiten auf verschiedenen stationären Phasen und Trenntemperaturen.

Wie aus **Abbildung 3.30** ersichtlich, erhält man für alle stationären Phasen und untersuchten Temperaturen einen durchschnittlichen relativen Fehler kleiner 2%. So beträgt z.B. der Fehler der Vorhersage für den Monolithen bei 80°C 0.76%, bei 60°C 0.84% und bei 30°C 1.12%. Vergleicht man diese Werte mit den korrigierten Ergebnissen des Additiven Modells (**Abbildung 3.23**), so erhält man dort für den Monolithen bei 80°C einen Fehler in der Vorhersage von 1.18%, bei 60°C einen Fehler von 1.48% und für 30°C sogar einen Fehler von 3.27%. Damit ergibt sich für das Additive Modell im Durchschnitt ein etwa 2 Mal höherer durchschnittlicher Fehler der Vorhersage als dies mit dem SVM-Modell der Fall ist (Faktor 1.5 bei 80°C, Faktor 1.8 bei 60°C und Faktor 3 bei 30°C). So ergibt sich z.B. für Sequenz 18 bei 80°C eine Retentionszeit von 14.47 min und bei 30°C eine Retentionszeit von 18.49 min. Vergleicht man diese experimentell bestimmten Retentionszeiten mit den berechneten Werten, so erhält man mittels Additivem Modell (korrigierte Werte) für

80°C 14.65 min (1.2% Fehler) und für 30°C 18.23 min (1.4%), während das SVM-Modell für 80°C einen Wert von 14.48 min (0.69%) und für 30°C einen Wert von 18.39 min (0.55%) vorhersagt.

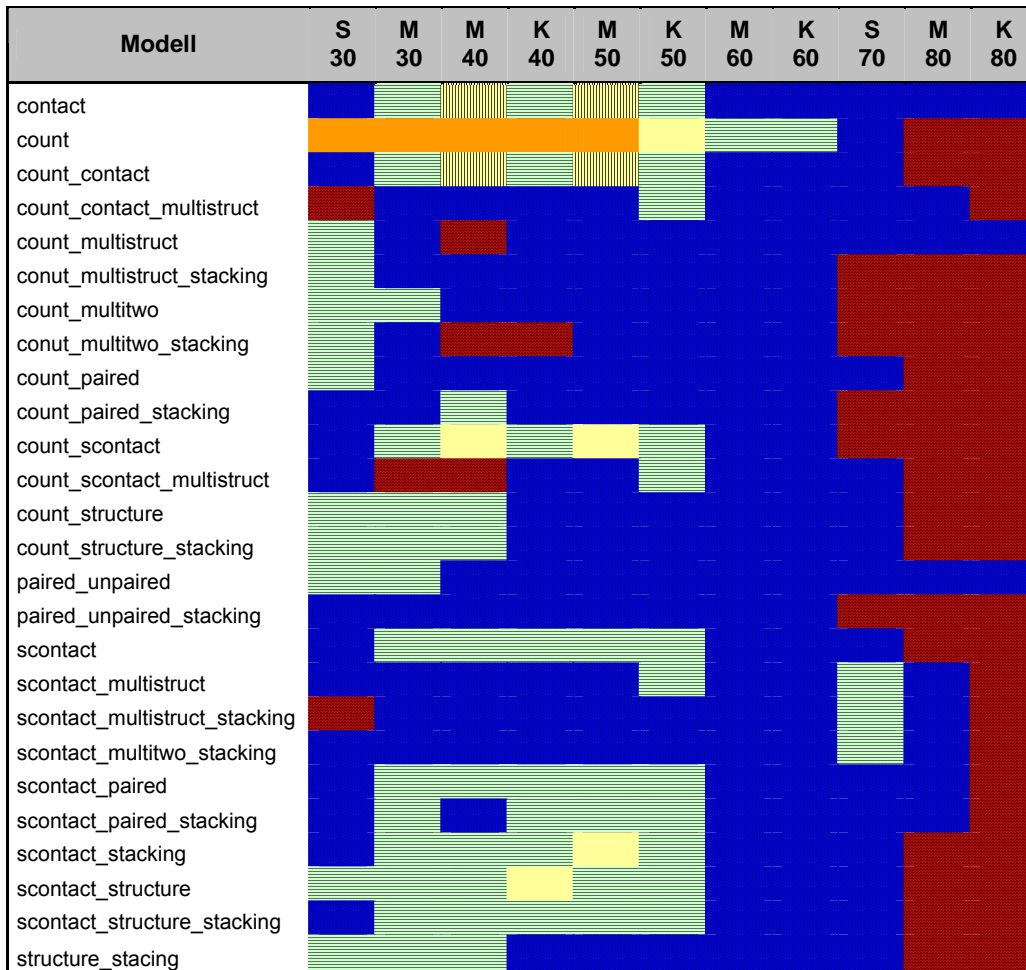
Die Ergebnisse der Vorhersage der Retentionszeiten für den PS/DVB-Monolithen via SVM Modell sind für die verschiedenen Temperaturen in **Tabelle 3.9** zusammengefasst.

**Tabelle 3.9.** Parameter für die Bewertung der Qualität der Retentionszeitvorhersage.

T [°C]	PS/DVB-Monolith		
	R <sup>2</sup>	s <sub>y</sub> [min]	rel. Fehler [%]
80	0.99	0.14	0.76
70			
60	0.99	0.12	0.84
50	0.97	0.21	1.05
40	0.99	0.19	0.80
30	0.97	0.25	1.12

Wie bereits in Kapitel 3.7.3 näher erläutert, gibt es eine Vielzahl verschiedener Parameter, die für die Vorhersage der Retentionszeiten mittels Support-Vektor-Maschinen verwendet werden können. Neben der Gesamtlänge, der Anzahl einzelner Basen in der Sequenz können auch die Basenstapelungen oder energetische Einflüsse für die Erstellung (Training) des SVM-Modells einbezogen werden. Je nachdem welche Feature-Vektoren dabei berücksichtigt werden (vgl. **Tabelle 3.8**), ergeben sich daher auch unterschiedlich gute Vorhersagemodelle. Die Ergebnisse für die verschiedenen Modelle wurden im Anhang dieses Kapitels in **Tabelle 3.18** zusammengestellt. In diesen Tabellen sind auch die Werte für zwei weitere Säulen (PS/DVB-C<sub>18</sub> und Vydac Everest-C<sub>18</sub>) aufgeführt. Diese Säulen werden in Kapitel 3.8 näher erläutert. Um aus der Vielzahl der Daten die Qualität der jeweiligen Modelle leichter abschätzen zu können, wurden die Ergebnisse in der nachfolgenden Abbildung farblich codiert. Dabei sind Modelle mit einem  $Q^2 \geq 0.98$  rot markiert, während Modelle mit  $Q^2 \geq 0.95$  blau, Modelle mit  $Q^2 \geq 0.90$  grün, Modelle mit  $Q^2 < 0.90$  gelb und Modelle mit einem  $Q^2 < 0.80$  orange markiert sind.





**Abbildung 3.31.** Qualität der Vorhersage mittels SVM-Modell unter der Verwendung unterschiedlicher Feature-Vektoren. (rot (gepunktet)  $Q^2 \geq 0.98$ , blau (schraffiert)  $\geq 0.95$ , grün (quergestreift)  $\geq 0.90$ , gelb (längsgestreift)  $< 0.90$  und orange  $< 0.80$ ). Säulen: S=Vydac Everest C<sub>18</sub>, M=PS/DVB-Monolith, K=PS/DVB-C<sub>18</sub>.

Besonders deutlich wird der Einfluss des verwendeten Feature Vektors, wenn man z.B. die Vorhersagequalität des „contact“ und des „count“ Features bei verschiedenen Temperaturen miteinander vergleicht. So erhält man bei der Verwendung des „count“-Feature, der mit dem Additiven-Modell relativ vergleichbar ist, da dieser für die Vorhersage lediglich die Anzahl der einzelnen Basen in der Gesamtsequenz berücksichtigt, auf dem Monolithen bei T=80°C einen Korrelationskoeffizienten von 0.97, während man bei 30°C lediglich einen Wert von 0.58 erreicht. Diese deutliche Verschlechterung der Vorhersage kann dadurch erklärt werden, dass dieses Feature keinerlei strukturelle Eigenschaften der Analyten berücksichtigt und somit für die Vorhersage der Retentionszeiten bei niedrigen

Temperaturen (vergleichbar mit dem Additiven Modell) ungeeignet ist. Im Vergleich dazu erhält man mit dem „contact“-Feature, der u.a. die Basen 2-Tupel berücksichtigt (vgl. **Tabelle 3.8**), sowohl bei 80°C ( $Q^2=0.99$ ) als auch bei 30°C ( $Q^2=0.93$ ) hervorragende Übereinstimmungen zwischen experimentellen und berechneten Retentionszeiten. Wie aus **Abbildung 3.31** deutlich ersichtlich, liefern bei hohen Temperaturen nahezu alle Modelle gute ( $\geq 0.95$ ) bis sehr gute ( $\geq 0.98$ ) Korrelationen zwischen experimentellen und berechneten Retentionszeiten. Dies bestätigt die Annahme, dass sekundärstrukturelle Eigenschaften der Analyten unter diesen Trennbedingungen weitgehend unterdrückt werden und daher auch Modelle, die diese Eigenschaften weniger stark berücksichtigen, zu guten Ergebnissen kommen. Im Vergleich dazu müssen bei niedrigeren Temperaturen die Modelle so ausgewählt werden, dass strukturelle Eigenschaften stärker berücksichtigt werden. Modelle, die bei niedrigeren Temperaturen weniger gut für die Retentionsvorhersage geeignet sind, können aus **Abbildung 3.31** anhand ihrer Farbcodierung entnommen werden. Als beste Modelle, d.h. Modelle, die für möglichst viele Temperaturen und stationäre Phasen gute bis sehr gute Vorhersageergebnisse liefern, konnten dabei das „count multistructure stacking“ und das „count paired stacking“ Modell mit jeweils drei sehr guten, sieben guten und einer befriedigenden Übereinstimmung sowie das „paired unpaired stacking“ Modell mit acht guten und drei sehr guten Ergebnissen bestimmt werden. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Qualität des Vorhersagemodells signifikant von den gewählten Parametern (Feature-Vektoren) abhängt. Um das optimale Modell zu entwickeln, müssen daher möglichst viele Feature-Vektoren untersucht werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Erstellung des Trainingsmodells von Support-Vektor-Maschinen ist die Unterscheidung zwischen Eintemperatur- und Multitemperatur-Modellen (kombinierte Temperaturmodelle). Beide Modellvarianten unterscheiden sich prinzipiell darin, ob die Datensätze, die für die Erstellung des Trainingsmodells verwendet wurden, aus dem gleichen Temperaturbereich (z.B. Trainings- und Testdaten auf dem Monolithen bei  $T=80^\circ\text{C}$ ) wie der Testdatensatz entnommen wurden, oder ob das Trainingsmodell mit Datensätzen aus unterschiedlichen Temperaturbereichen aufgestellt wurde. Verwendet man also ein Eintemperatur-Modell für die Vorhersage der Retentionszeiten bei  $T=80^\circ\text{C}$ , so wurden zum Trainieren des Modells ebenfalls ausschließlich Retentionszeiten von

Oligonukleotiden verwendet, die bei 80°C gemessen wurden. Im Gegensatz dazu kann ein Multitemperatur-Modell mit Daten trainiert werden, die sowohl bei 80°C als auch bei 60, 50, 40 oder 30°C gemessen wurden.

Modell	PS/DVB-M.	Silikasäule	PS-PS/DVB-C <sub>18</sub>
contact	grün	blau	blau
count	gelb	blau	grün
count_contact	grün	rot	grün
count_contact_multistruct	blau	rot	blau
count_multistruct	blau	rot	blau
count_multistruct_stacking	blau	rot	blau
count_multitwo	grün	blau	blau
count_multitwo_stacking	grün	blau	blau
count_paired	grün	blau	blau
count_paired_stacking	grün	rot	blau
count_scontact	grün	rot	blau
count_scontact_multistruct	blau	rot	blau
count_structure	grün	blau	blau
count_structure_stacking	grün	blau	blau
paired_unpaired	grün	blau	blau
paired_unpaired_stacking	grün	rot	blau
scontact	grün	rot	blau
scontact_multistruct	blau	rot	blau
scontact_multistruct_stacking	blau	rot	blau
scontact_multitwo_stacking	grün	rot	blau
scontact_paired	grün	blau	blau
scontact_paired_stacking	grün	rot	blau
scontact_stacking	grün	rot	blau
scontact_structure	grün	blau	blau
scontact_structure_stacking	grün	blau	blau
structure_stacking	grün	blau	blau

**Abbildung 3.32.** Qualität der Vorhersage des kombinierten SVM-Temperatur -Modell unter der Verwendung unterschiedlicher Feature-Vektoren. (rot (gepunktet)  $Q^2 \geq 0.98$ , blau (schraffiert)  $\geq 0.95$ , grün (quergestreift)  $\geq 0.90$ , gelb  $< 0.90$  und orange  $< 0.80$ ). Säulen: S=Vydac Everest C<sub>18</sub>, M=PS/DVB-Monolith, K=PS/DVB-C<sub>18</sub>.

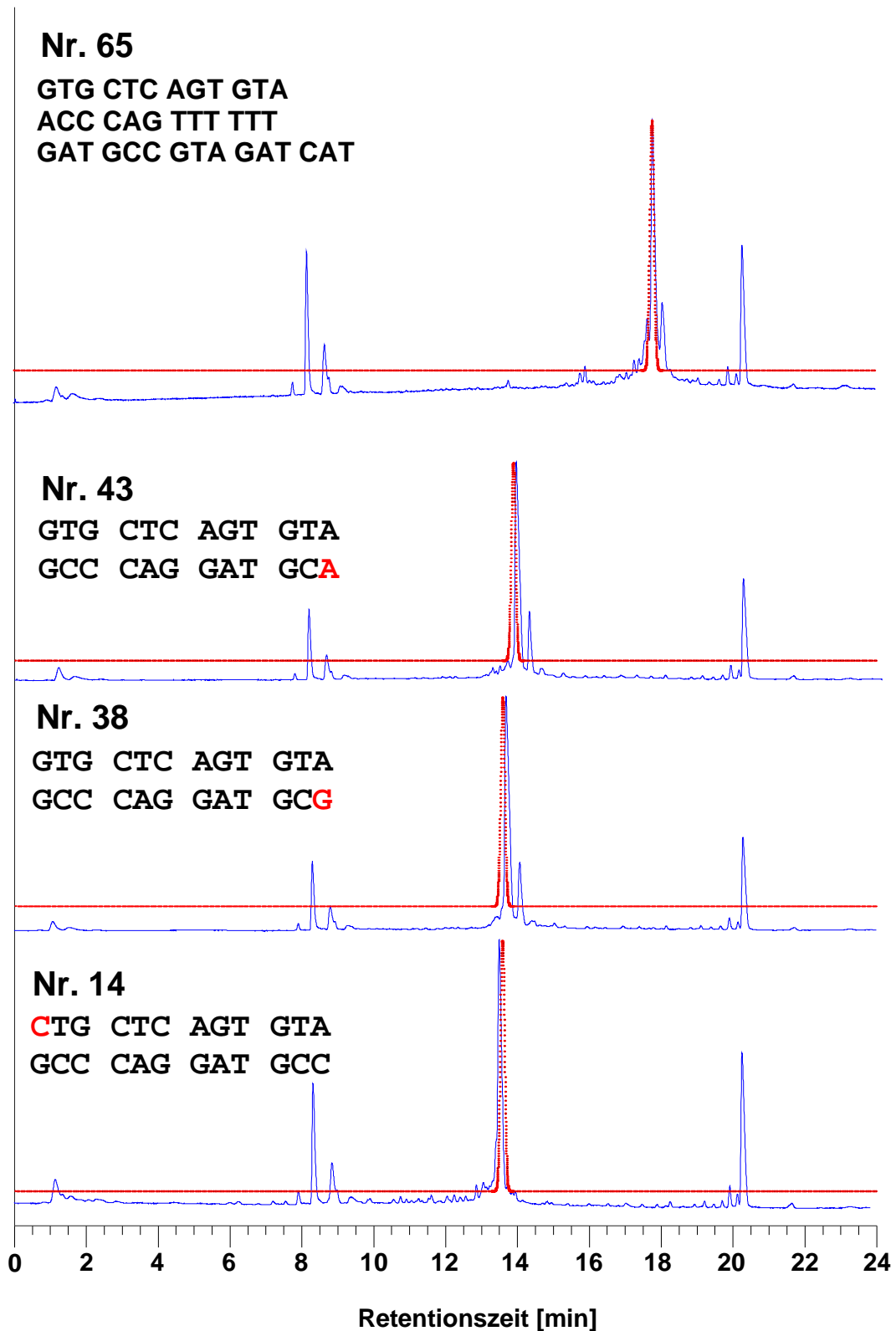
In **Abbildung 3.32** bzw. **Tabelle 3.19** sind die Ergebnisse verschiedener kombinierter Multitemperatur-Modelle aufgeführt. Wie bereits in **Abbildung 3.31**, wurden auch in **Abbildung 3.32** die verschiedene Modelle, je nach Qualität der Vorhersage, farbig so codiert, dass eine schnelle Beurteilung der verschiedenen Modelle möglich ist. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, führt ein Großteil der untersuchten Modelle zu guten bis sehr guten Übereinstimmungen zwischen

experimentellen Retentionszeiten. Lediglich das „count“-Modell ergibt für den Monolithen eine unzureichende Qualität der Vorhersage. Wie bereits beim Einzeltemperatur-Modell beobachtet, ist auch hier das „count multistructure stacking“ Modell mit zwei guten und einer sehr guten Bewertung besonders gut für die Vorhersage der Retentionszeiten auf den unterschiedlichen stationären Phasen geeignet. Damit hatte sich dieses Modell, da es sowohl für das Einzeltemperatur-Modell als auch für das kombinierte Modell zu hervorragenden Vorhersagen führte, als Modell der Wahl für alle Vorhersageberechnungen empfohlen.

Um die Leistungsfähigkeit des neuen Modells anhand chromatographischer Trennungen zu demonstrieren, sind in **Abbildung 3.33** experimentelle sowie via SVM-Modell simulierte Chromatogramme dargestellt. Die Chromatogramme wurden auf einem PS/DVB-Monolithen bei  $T=80^{\circ}\text{C}$  gemessen und anschließend mit den berechneten Daten verglichen. Um die Chromatogramme grafisch zu simulieren, wurden die via SVM berechneten Retentionszeiten in die Formel für einer idealen Gaußverteilung eingesetzt und anschließend mittels Microsoft Excel 2003 geplottet.

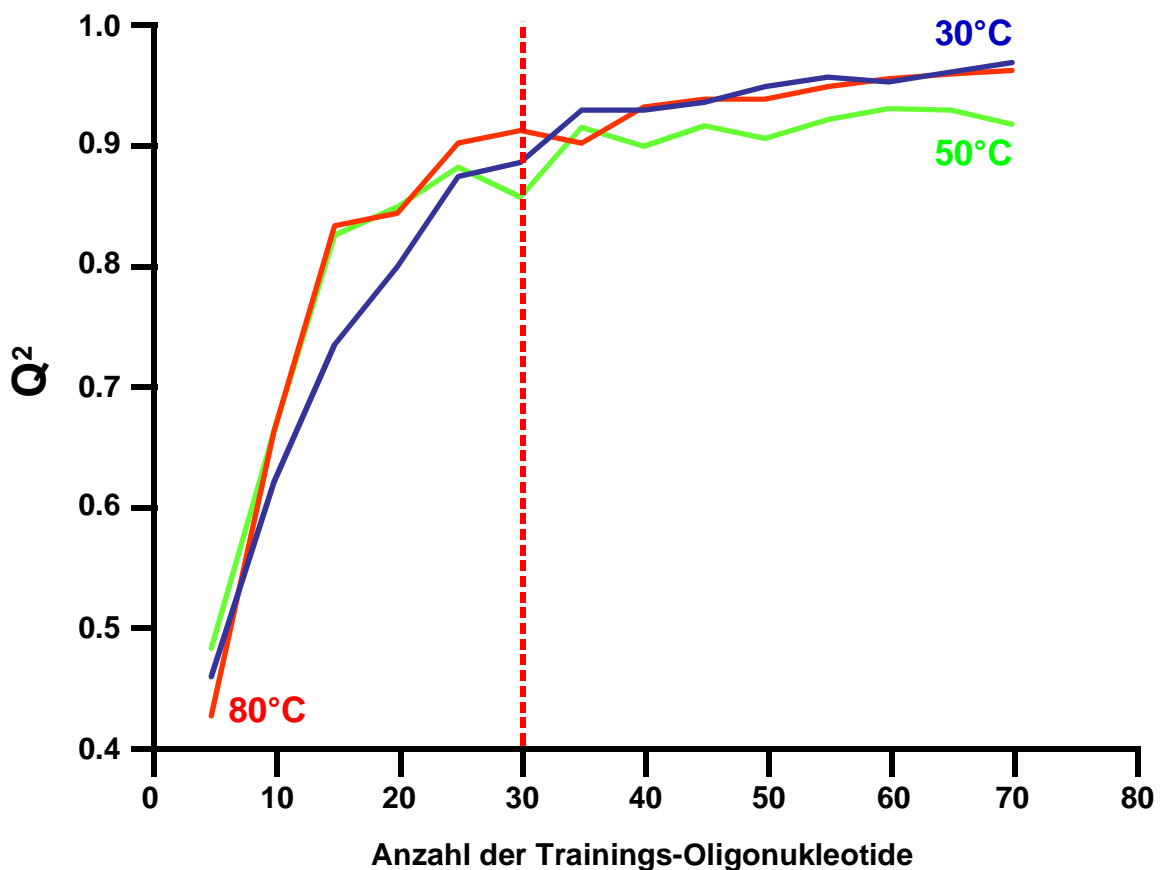
Für die Erstellung der Peakprofile in der Simulation wurde dabei die experimentell bestimmte, mittlere Peak-Standardabweichung von 0.06 min verwendet. Als Testoligonukleotide wurden dabei drei 24mere mit der Variation einer einzelnen Base in ihrer Sequenz (Nr. 14(C), Nr. 38 (G) und Nr. 43 (A)) und ein 39mer verwendet.

Wie aus **Abbildung 3.33** ersichtlich, wurde für alle 4 Oligonukleotide eine sehr gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und simulierten Chromatogrammen erhalten. Besonders interessant ist dabei die Tatsache, dass selbst für das relativ lange 39mer Oligonukleotid eine sehr gute Übereinstimmung gefunden wurde, obwohl es für diesen Längenbereich nur wenige Trainingsdatenpunkte gab.



**Abbildung 3.33.** Vergleich der gemessenen (blau) und simulierten (rot, gepunktet) Chromatogramme von vier Testoligonukleotiden auf einem PS/DVB-Monolithen bei T=80°C. Für die Peakprofile in den Simulationen wurde die experimentell bestimmte, mittlere Peak-Standardabweichung von 0.06 min einer Gaußfunktion verwendet.

Neben dem Einfluss verschiedener Parameter wie die Wahl der besten Feature-Vektoren oder der Unterscheidung zwischen Einzel- und kombiniertem Temperatur-Modell auf die Qualität des SVM-Modells, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Mindestanzahl an Trainingsdatenpunkten untersucht, die zur Aufstellung eines guten Trainingsmodells benötigt werden. Dazu wurde das SVM-Modell jeweils mit einer unterschiedlichen Anzahl von Datenpunkten (Retentionszeiten) trainiert und die Qualität des Modells anschließend anhand des  $Q^2$ -Wertes der Vorhersage des Testdatensatzes überprüft. Um gleichzeitig den Einfluss der Temperatur untersuchen zu können, wurde diese Studie bei 30, 50 und 80°C durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abbildung 3.34** dargestellt.



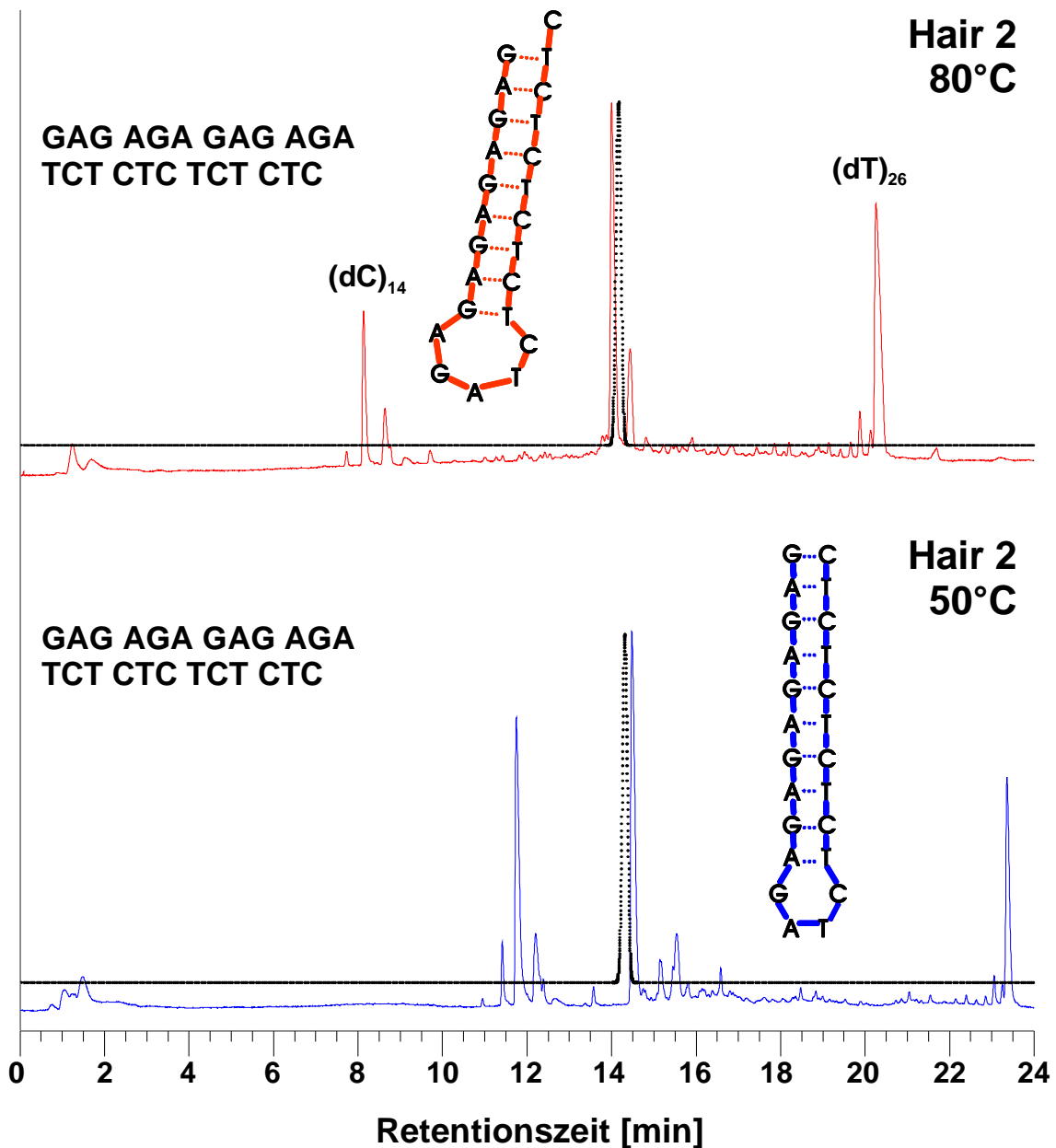
**Abbildung 3.34.** Bestimmung der Mindestanzahl an Trainingsdatenpunkten, die zur Erstellung eines guten Trainingsmodells bei unterschiedlichen Temperaturen notwendig sind. Als Kriterium zur Bestimmung der Anzahl der Datenpunkte diente dabei der  $Q^2$ -Wert der Vorhersage der Testdaten.

Wie aus **Abbildung 3.34** ersichtlich, wird ab einer Datensatzgröße von ca. 30 Datenpunkten, unabhängig von der gewählten Temperatur, eine gute Vorhersagequalität des Modells erreicht. Als gut wird dabei ein Modell eingestuft, dessen  $Q^2$ -Wert  $\geq 0.90$  ist. Weiterhin kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass es eine „maximale“ Anzahl an Trainingsdatenpunkten gibt. Darunter ist die Datensatzgröße zu verstehen, bei der eine weitere Vergrößerung der Trainingsdaten zu einer nur mehr sehr moderaten Verbesserung des Vorhersagemodells führt. Aus **Abbildung 3.34** kann diese „maximale“ Datensatzgröße für das SVM-Modell auf ca. 50 Datenpunkten festgelegt werden.

### 3.7.5. Vorhersage der Retentionszeiten von Hairpinstrukturen mittels Support-Vektor-Maschinen

Wie bereits in Kapitel 3.6.3 anhand des Additiven Retentionsvorhersage-Modells erläutert, stellt vor allem die Vorhersage des Retentionsverhaltens von Hairpinstrukturen besonders hohe Anforderung an das jeweilige Modell (**Abbildung 3.21**). Dies wird besonders deutlich, wenn man den relativen Vorhersagefehler für eine Hairpinstruktur (Sequenz 72) mittels Additiven Retentionsvorhersage-Modell, d.h. eines Modells, das strukturelle Besonderheiten der Analyten (**Abbildung 3.36**) nicht berücksichtigt, bei 30 und 80°C miteinander vergleicht. Ergibt sich für die Vorhersage der Retentionszeit bei 80°C noch ein relativer Fehler von 2.9%, so steigt dieser bei der Reduzierung der Temperatur auf 30°C auf 17% an. Anhand dieses Beispiels können die Grenzen des Additiven Modells bzw. die extremen Anforderungen an das SVM-Modell deutlich aufgezeigt werden. Nur wenn das neue Modell auch die Retentionszeiten dieser Haarnadelstrukturen, unabhängig von der jeweiligen Trenntemperatur, exakt vorhersagen kann, ist es für die hohen Anforderungen der modernen Bioanalytik geeignet.

In **Abbildung 3.35** ist die Trennung und die Simulation (gepunktete Linie) via SVM-Modell einer Hairpinstruktur (Sequenz 70) bei 50 und 80°C dargestellt. Wie man dieser Abbildung entnehmen kann, hat man bei beiden untersuchten Temperaturen eine hervorragende Übereinstimmung zwischen den experimentellen und berechneten Retentionszeiten.



**Abbildung 3.35.** Vergleich einer experimentellen und simulierten Trennung einer Hairpinstruktur auf einem PS/DVB-Monolithen bei 50 und 80°C.

Säule: PS/DVB-Monolith, 60 x 0.2 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 40% ACN; linearer Gradient: 0-16% ACN in 30 min; Fluss: 2 µl/min; Temperatur: 80°C (rot), 50°C (blau); Probe: (dC)<sub>14</sub> (erster Peak), Hair 2 (Sequenz 70) (zweiter Peak) und (dT)<sub>26</sub> (dritter Peak), (dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub> 1 ng/µl und Oligonukleotid 2.5 ng/µl.

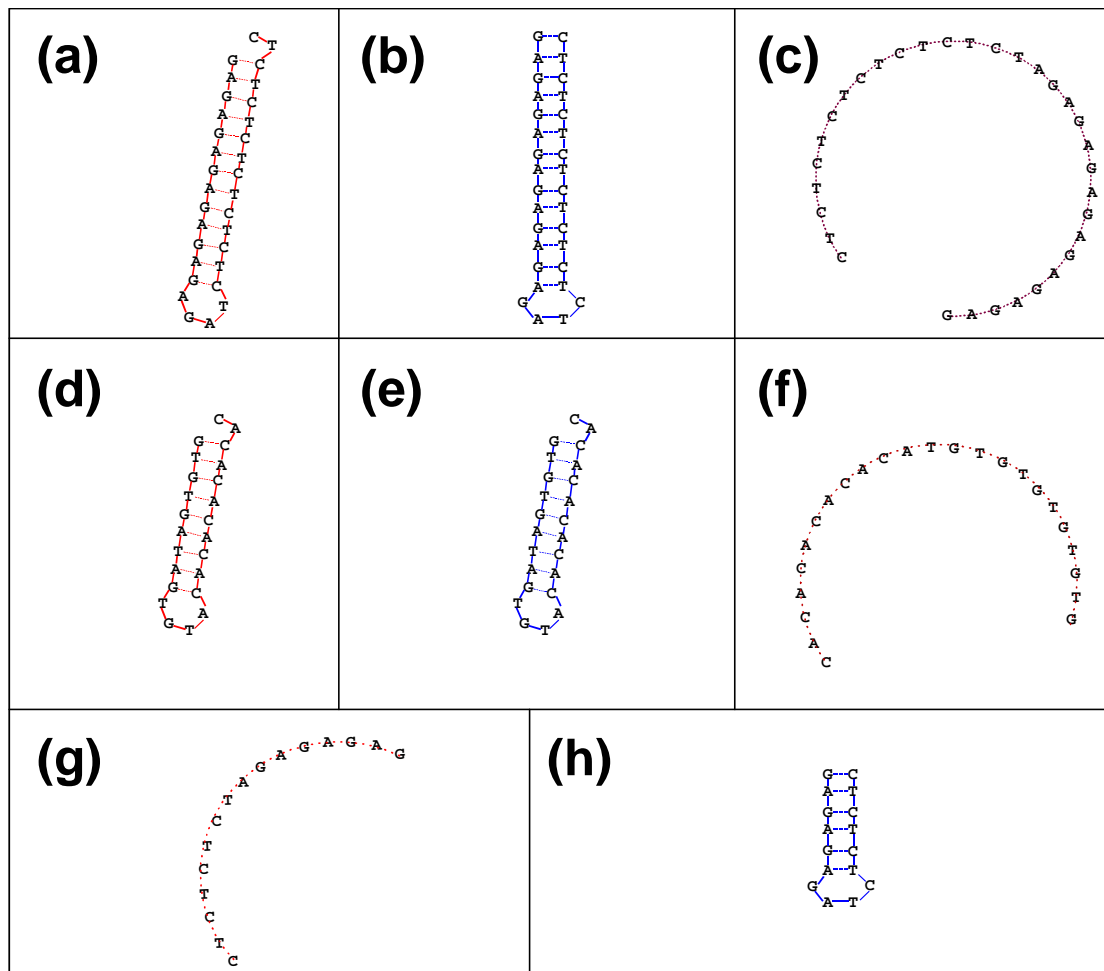


Besonders deutlich wird die Leistungsfähigkeit des SVM-Modells, wenn man die Ergebnisse dieses Modells anhand der Hairpinstruktur mit den Vorhersagen des Additiven Retentionsvorhersage-Modells vergleicht. Für Hair 2 (Sequenz 70) wurde bei 80°C eine Retentionszeit von 14.08 min, bei 50°C eine Zeit von 14.57 min und bei 30°C eine Zeit von 13.22 min gemessen. Versucht man, das Retentionsverhalten mittels Additivem Retentionsvorhersage-Modell vorherzusagen, so erhält man für 80°C eine Retentionszeit von 14.41 min, für 50°C 16.86 min und für 30°C 17.72 min. Dies entspricht einem relativen Fehler der Vorhersage von 2.3% bei 80°C, 16% bei 50°C und 34% bei 30°C. Somit steigt der Fehler der Vorhersage rapide mit der Reduzierung der Temperatur an. Dies wurde auch für dieses Modell so erwartet, da beim Additiven Retentionsvorhersage-Modell keine strukturellen Eigenschaften der Analyten berücksichtigt wurden, die jedoch bei Hairpinstrukturen, und im speziellen bei niedrigen Trenntemperaturen, einen dominierenden Einfluss auf das Retentionsverhalten haben.

Die Besonderheit dieser Haarnadelstruktur (Hair 2) liegt im Vergleich zu den meisten anderen untersuchten Oligonukleotiden darin (vgl. **Abbildung 3.35** und **Abbildung 3.36**), dass diese sowohl bei hohen Temperaturen (80°C) als auch bei niedrigen Temperaturen (50°C) annähernd die gleiche Struktur aufweist und nicht entfaltet sind. Mit Ausnahme von Sequenz 72, die bereits bei einer Temperatur von 75°C vollständig entfaltet ist, sind alle anderen untersuchten Hairpinstrukturen bei einer Trenntemperatur von 80°C weitgehend gefaltet. So tritt eine vollständige Entfaltung bei Sequenz 70 erst bei 91°C, bei Sequenz 69 bei 97°C und bei Sequenz 70 bei 92°C ein. Dadurch erhält man bei nahezu allen Trenntemperaturen vergleichbare Retentionszeiten, was dazu führt, dass ein Modell, das nur die Sequenz eines Analyten berücksichtigt, keine verlässliche Vorhersage des Retentionsverhaltens ermöglicht. Vergleicht man nun die experimentellen Retentionszeiten mit denen, die mittels SVM-Modell berechnet wurden, so erhält man für alle Temperaturen eine hervorragende Korrelation der Retentionszeiten.

Für eine Temperatur von 80°C wurde für Sequenz 70 eine Retentionszeit von 14.16 min (Fehler 0.5%), für 50°C eine Zeit von 14.31 min (1.8%) und für 30°C eine Zeit von 13.37 min (1.1%) berechnet. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass das Modell die Eigenheit dieser Hairpinstruktur (Reduzierung der Retentionszeit beim Absenken der Temperatur von 50 auf 30°C) erkennen und für die Vorhersage nutzen

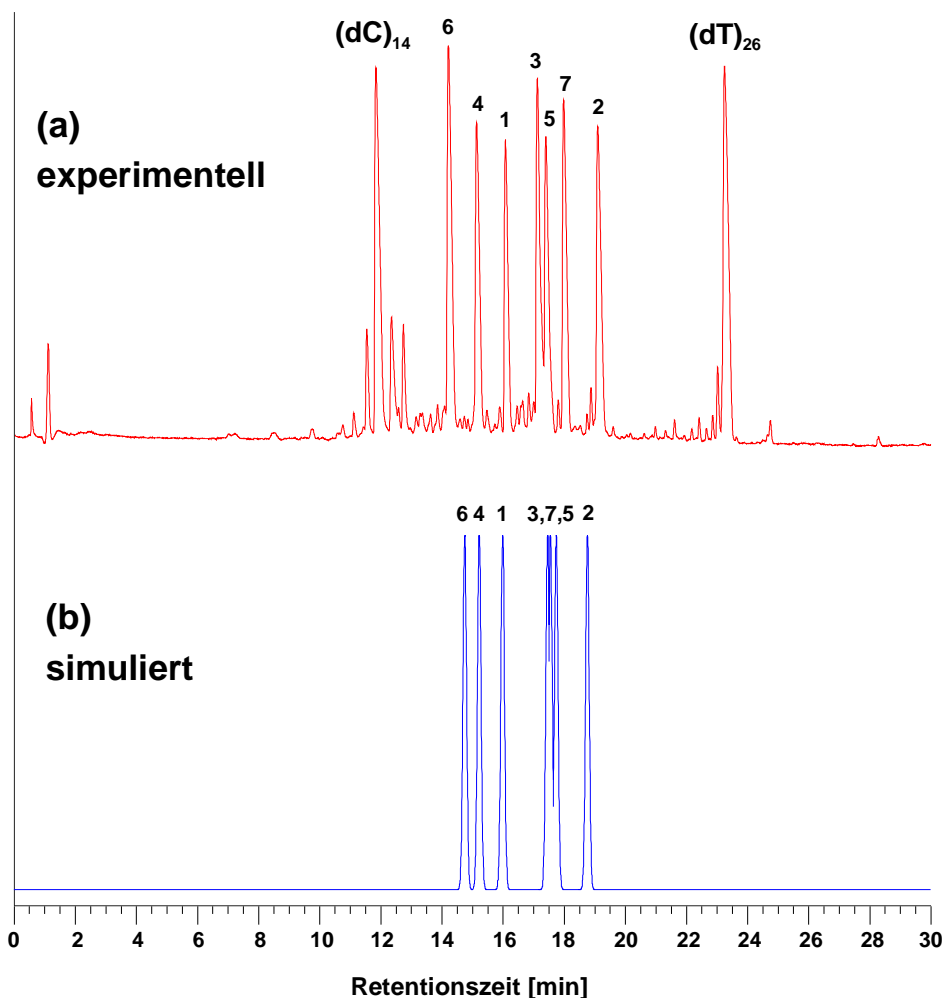
kann. Vergleichbar gute Werte wurden für die Vorhersagen auch für die anderen Hairpinstrukturen erhalten. So wurde z.B. für Sequenz 72 bei 80°C ein relativer Fehler von 0.8% und bei 30°C ein Fehler von 1.2% bei der Vorhersage gemacht.



**Abbildung 3.36.** Simulation verschiedener Hairpinstrukturen bei verschiedenen Temperaturen: Sequenz 69 bei 80°C (a), 50°C (b) und 97°C (c), Sequenz 71 bei 80°C (d), 50°C (e) und 92°C (f) und Sequenz 72 bei 80°C (g) und 50°C (h). Simulation via [95] (vollständig denaturierte Strukturen sind aus Platzgründen kreisförmig dargestellt).

### 3.7.6. Untersuchung der Leistungsfähigkeit des SVM-Vorhersagemodells anhand einer PCR-Primer Mischung

Um die Leistungsfähigkeit des SVM-Modells anhand einer Realprobe demonstrieren zu können, wurde eine komplexe Mischung von Oligonukleotid-Primern, die für eine multiplexe Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden, unter verschiedenen chromatographischen Bedingungen (40, 50 und 70°C) auf einem PS/DVB-Monolithen getrennt und anschließend die Retentionszeiten vorhergesagt. Die experimentellen und berechneten Ergebnisse sind in **Abbildung 3.37** dargestellt.



**Abbildung 3.37.** Vorhersage einer Trennung von sieben Oligonukleotid-Primern mit Längen von 14-18 Nukleotiden bei 50°C. Die Sequenzen der Primer sind in **Tabelle 3.2** aufgeführt.

Wie aus **Abbildung 3.37** ersichtlich, wurde für 50°C eine sehr gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Retentionszeiten erhalten. Die besondere Stärke dieses Modells zeigt sich darin, dass nicht nur die Retentionszeiten der relativ ungewöhnlichen, (A,T)-reichen Sequenzen, sondern auch die Retentionsreihenfolge der kurzen Oligonukleotide mit Ausnahme einer Inversion der Reihenfolge der Oligonukleotide 5 und 7 korrekt und mit einer durchschnittlichen bzw. maximalen Abweichung von 0.6% bzw. 3.2% vorhergesagt werden konnten. Vergleichbar gute Ergebnisse wurden auch für 70°C (0.14% - 5.31%) und 40°C (0.41 % - 3.93%) erhalten. Eine Zusammenstellung der gemessenen und berechneten Retentionszeiten ist in **Tabelle 3.10** aufgeführt.

**Tabelle 3.10.** Ergebnisse für die Trennung der komplexen PCR-Primer-Mischung auf einem PS/DVB-Monolithen bei 40, 50 und 70°C.

Probe	PCR-Multiplexprimer								
	70°C			50°C			40°C		
	Exp. [min]	SVM [min]	rel. Fehler [%]	Exp. [min]	SVM [min]	rel. Fehler [%]	Exp. [min]	SVM [min]	rel. Fehler [%]
1	14.25	14.27	0.14	16.28	16.01	1.68	17.07	16.65	2.44
2	17.14	17.00	0.81	19.13	18.76	1.94	19.89	19.41	2.41
3	15.63	16.21	3.71	17.31	17.47	0.94	17.84	18.27	2.46
4	13.35	13.55	1.51	15.34	15.25	0.61	16.01	15.88	0.82
5	15.82	16.21	2.42	17.60	17.75	0.81	18.20	18.27	0.41
6	12.46	13.12	5.31	14.46	14.78	2.22	15.15	15.40	1.64
7	16.04	15.80	1.55	18.14	17.56	3.24	18.95	18.20	3.93

Die gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment, die anhand der Realprobe festgestellt wurde, ist ein weiteres Indiz dafür, dass die im Modell integrierten Strukturparameter die Wechselwirkungen zwischen Oligonukleotid und stationärer Phase in der IP-RP-Chromatographie sehr gut beschreiben.

### 3.7.7. Zusammenfassung

Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.7 zeigen, wurde mit dem neuen SVM-Modell erstmals ein Modell zur Vorhersage der Retentionszeiten komplexer Biomoleküle (Oligonukleotide) in der Ionenpaar-Umkehrphasen Chromatographie mit einer hohen Genauigkeit von besser als 3% ausgearbeitet. Dieses Verfahren, das auf dem

Prinzip des maschinellen Lernens via Support-Vektor-Maschinen beruht, zeichnet sich dadurch aus, dass es im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Modellen, wie z.B. das Additive Modell von Gilar, über einen sehr großen Temperaturbereich (30-80°C) eine sehr gute Vorhersage des Retentionsverhaltens der Oligonukleotide ermöglicht. So betrug z.B. der durchschnittliche relative Fehler der Retentionsvorhersage des SVM-Modells auf einem PS/DVB-Monolithen bei 80°C 0.76%, bei 50°C 1.05% und bei 30°C 1.12%. Vergleicht man diese Werte mit den Ergebnissen des verbesserten Additiven Modells (korrigierte Werte) (Kapitel 3.6) (1.18% bei 80°C, 2.13% bei 50°C und 3.27% bei 30°C) so sieht man, dass das SVM-Modell diesem deutlich überlegen ist. Das SVM-Modell ermöglicht somit bei allen untersuchten Temperaturen eine deutlich bessere Vorhersage des Retentionsverhaltens der Oligonukleotide, wobei der Unterschied bei niedrigen Trenntemperaturen besonders signifikant war. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das neue Modell, im Gegensatz zu den meisten in der Literatur beschriebenen Modellen, auch energetische und strukturelle Eigenschaften der Analyten für die Retentionsvorhersage eingebunden hat. Erst durch die Einbeziehung dieser Eigenschaften in die Vorhersage konnte ein gutes und vor allem temperaturunabhängiges Vorhersagemodell entwickelt werden.

Um dieses Modell zu entwickeln, wurde in der ersten Stufe ein Testdatensatz aus 72 verschiedenen synthetischen Oligonukleotiden (**Tabelle 3.1**) mit einer Länge von 15-48 Nukleotiden bei 30-80°C untersucht. Dabei wurde der Testdatensatz so zusammengestellt, dass strukturelle Einflüsse der Analyten auf das Retentionsverhalten möglichst gut abgedeckt werden. Zusätzlich wurden dabei für die Berücksichtigung möglicher Sekundärstrukturen vier Sequenzen so ausgewählt, dass diese auch bei höheren Temperaturen stabile Haarnadelstrukturen ausbilden.

Ein weiterer großer Vorteil des Verfahrens liegt darin, dass es, im Vergleich zu vielen in der Literatur beschriebenen Modellen, einen relativ geringen experimentellen Aufwand zur Etablierung des Modells hat. Wie Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt haben (vgl. Kapitel 3.7.4), reicht bereits ein Datensatz aus 30 verschiedenen Oligonukleotiden aus, um ein Vorhersagemodell mit hoher Genauigkeit zu etablieren (Messzeit für 30 Oligonukleotide ca. 19 Stunden).

Zusätzlich zur Untersuchung der 72 Oligonukleotide des Testdatensatzes wurde die Leistungsfähigkeit des neuen Modells auch anhand einer Realprobe untersucht.

Dazu wurde eine Oligonukleotid-Mischung, bestehend aus 7 biologisch relevanten Oligonukleotid-Primern für eine multiplexe Amplifikation mittels Polymerase Kettenreaktion, auf einem PS/DVB-Monolithen bei 40, 50 und 70°C chromatographiert. Wie bereits für die Oligonukleotide des Testdatensatzes, wurde auch für diese komplexe Mischung bei allen untersuchten Temperaturen eine hervorragende Übereinstimmung zwischen experimentellen und vorhergesagten Retentionszeiten erhalten.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass das neue Vorhersagemodell eine deutliche Verbesserung der zur Zeit in der Literatur für Oligonukleotide beschriebenen Modellen darstellt. Dabei liegt die größte Stärke des SVM-Modells vor allem darin, dass es durch die Berücksichtigung struktureller Eigenschaften der Analyten auch bei niedrigen Trenntemperaturen zu einer sehr guten Retentionsvorhersage kommt. In Verbindung mit dem geringen experimentellen Aufwand zur Etablierung des Modells stellt das SVM-Modell ein robustes und in der Praxis gut einsetzbares Modell dar.

### **3.8. Untersuchung der Leistungsfähigkeit der Vorhersage-Modelle auf unterschiedlichen stationären Phasen**

#### **3.8.1. Einführung**

Nach der Untersuchung der Leistungsfähigkeit des verbesserten Additiven Retentionsvorhersage-Modells und des SVM-Modells auf einem PS/DVB-Monolithen als stationärer Phase wurde zusätzlich die Anwendbarkeit dieser Modelle auf anderen stationären Phasen untersucht. Als stationäre Phasen wurden dazu eine PS/DVB-C<sub>18</sub> und eine C<sub>18</sub>-Silikaphase untersucht. Bei der PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule handelte es sich um eine HPLC Säule mit konventionellen Säulendimensionen (50 x 4.6 mm I.D.), während die C<sub>18</sub>-Silika-Säule ebenfalls für Micro-HPLC-Systeme konzipiert wurde (Vydac Everest-C<sub>18</sub> mit 150 x 0.25 mm I.D.). Dadurch wurde neben

der stationären Phase auch noch ein Vergleich zwischen „konventionellen“ HPLC-Systemen (PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule) und Micro-HPLC-Systemen (PS/DVB-Monolith, Vydac Everest-C<sub>18</sub>) ermöglicht. Wie bereits beim Monolithen wurden auch diese stationären Phasen bei unterschiedlichen Trenntemperaturen untersucht. So wurde für die PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule experimentelle Daten bei 80°C, 60°C, 50°C und 40°C bestimmt, während für die Vydac Everest-C<sub>18</sub> Kieselgelsäule Messungen bei 70°C und 30°C durchgeführt wurden.

### **3.8.2. Bestimmung der Koeffizienten für das Additive Retentionsvorhersage-Modell**

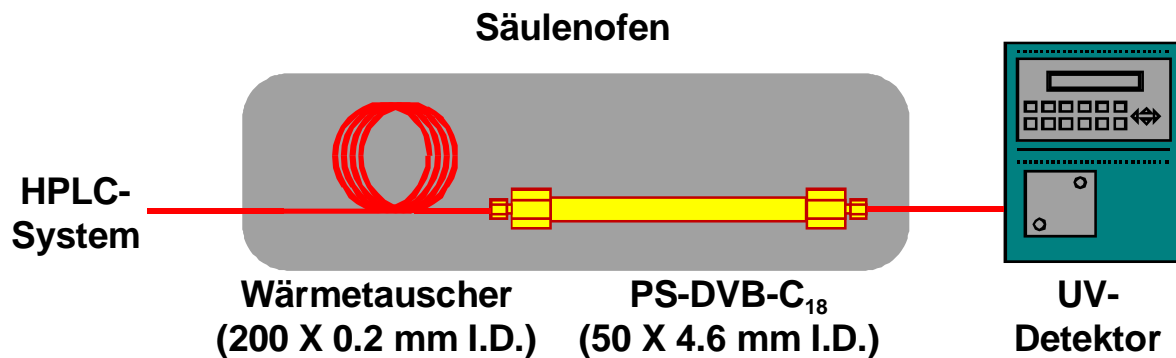
#### **1. Optimierung des HPLC-Systems für die Neubestimmung der Koeffizienten**

##### **I. Einfluss des Wärmetauschers auf die Trenneffizienz der Säule**

Wie bereits in Kapitel 3.6.1 dargestellt, ist vor allem die Chromatographie Guanosinreicher Homooligonukleotide sehr problematisch [45-47] und stellt hohe Anforderungen an das chromatographische System. Dies ist vor allem auf die starken inter- und intramolekularen Wechselwirkungen dieser Sequenzen zurückzuführen. Dieser Effekt zeigte sich besonders stark bei der Verwendung der PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule als stationärer Phase. Im Gegensatz zur Bestimmung der Koeffizienten für den Monolithen ergaben sich für die PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule zusätzliche experimentelle Anforderungen, da mittels dieser Säule, im Gegensatz zum Monolithen, die Trennung der Homooligonukleotide des Guanosins nicht ohne weiteres möglich war.

Die schwierige chromatographische Trennung längerer Homooligonukleotide wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen untersucht, jedoch zum ersten Mal durch die Arbeiten von Peter Oefner [45] bewerkstelligt. Vor Oefners Arbeiten war es nicht möglich gewesen, Homooligonukleotide des Guanosins einer bestimmten Länge effizient chromatographisch zu trennen. Oefner löste dieses Problem dadurch, dass er vor die eigentliche Trennsäule einen Wärmetauscher (Prä-Coil) in das HPLC-

System integrierte. Der schematische Aufbau einer solchen, in dieser Arbeit verwendeten Anlage, ist in der nachfolgenden **Abbildung 3.38** dargestellt.



**Abbildung 3.38.** Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems mit eingebautem Wärmetauscher vor der eigentlichen analytischen Trennsäule. Sowohl Wärmetauscher als auch Trennsäule werden durch einen Säulenofen auf die jeweilige Trenntemperatur temperiert.

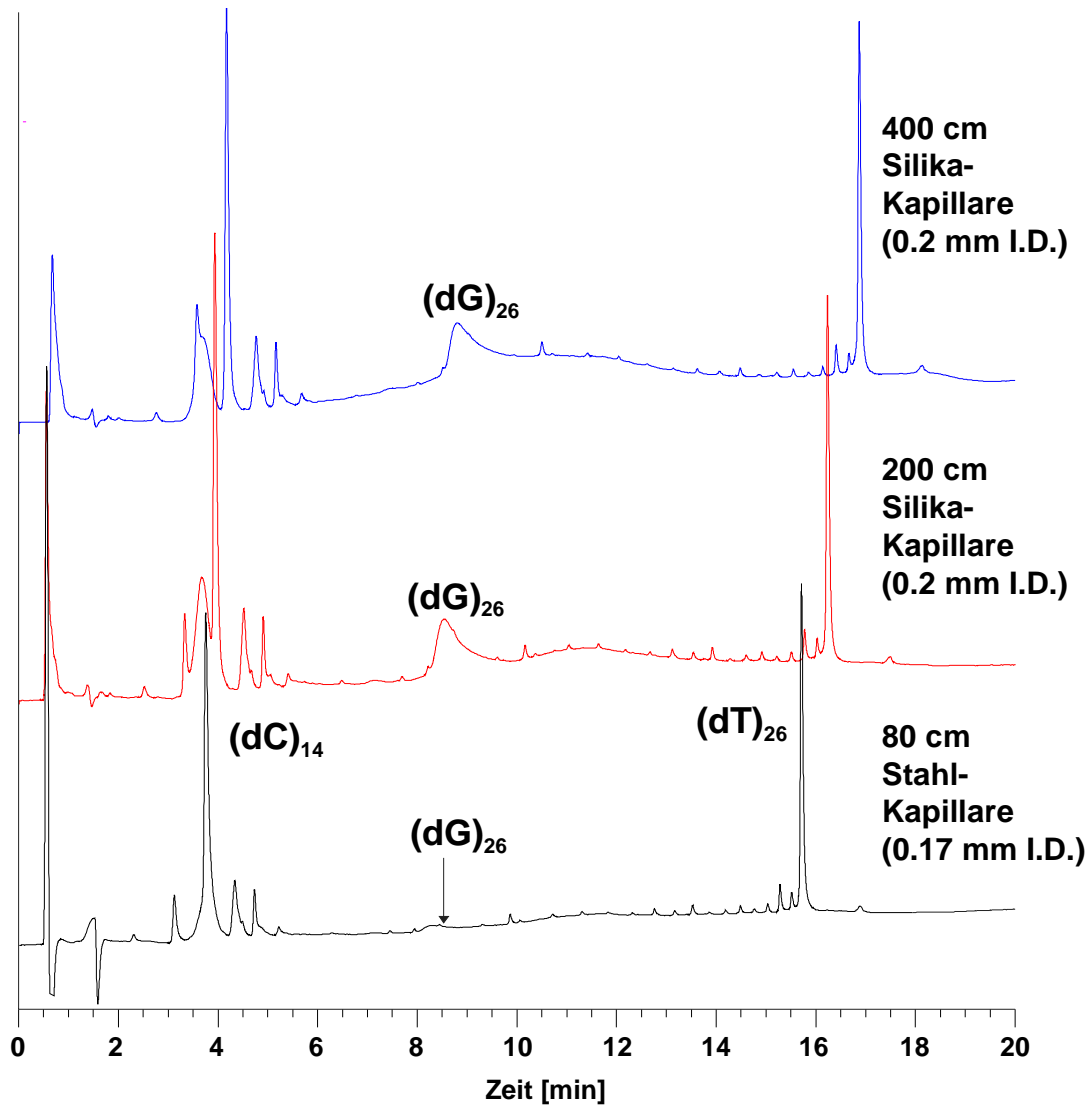
Wie aus **Abbildung 3.38** ersichtlich, befinden sich sowohl der Wärmetauscher als auch die eigentliche Trennsäule innerhalb eines Säulenofens, so dass dadurch beide auf die gewünschte Temperatur eingestellt werden können. Der eigentliche Sinn dieses Wärmetauschers liegt darin, die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Nucleobasen aufzubrechen, um so eine vollständige Entfaltung und Streckung der Oligonucleotide zu erreichen. Dadurch werden die strukturellen Eigenheiten der Analyten verringert und chromatographische Trennungen erleichtert. Durch die Verwendung eines Wärmetauschers und Temperierung dieses auf eine bestimmte, erhöhte Temperatur, wird die Flussstrecke zwischen Injektor und Säule verlängert und so die Entfaltung der Oligonucleotide begünstigt. Neben dem positiven Einfluss des Wärmetauschers auf die Denaturierung der Analyten hat eine solche Verlängerung der Flussstrecke jedoch erheblichen Einfluss auf das Totvolumen des HPLC-Systems. Durch den Einbau dieser zusätzlichen Kapillare wird das Totvolumen der Anlage erhöht, was zu einer Peakverbreiterung und damit zu einer Verschlechterung der Trenneffizienz führen kann. Daher ist es für die Leistungsfähigkeit des HPLC-Systems sehr wichtig, experimentell die optimale Länge und das optimale Material des Wärmetauschers zu bestimmen.



Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kapillar-Materialien und Kapillar-Längen untersucht. Dabei wurde zunächst das analytische System mit der 50 x 4.6 mm I.D. Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-C<sub>18</sub> Säule untersucht und optimiert. Als Analyten wurde eine Testmischung, bestehend aus einem 26mer Guanosin-Homooligonukleotid ((dG)<sub>26</sub>), einem 14mer Cytidin-Homooligonukleotid ((dC)<sub>14</sub>) und einem 26mer Thymidin-Homooligonukleotid ((dT)<sub>26</sub>) verwendet. Die experimentellen Ergebnisse für die PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule sind in **Abbildung 3.39** dargestellt.

Wie aus **Abbildung 3.39** ersichtlich, konnten die besten Ergebnisse für die Trennung des (dG)<sub>26</sub> mit dem 200 und 400 cm Silka-Wärmetauscher erreicht werden. Im Gegensatz dazu wurde mit der 80 cm Stahl-Kapillare (0.17 mm I.D.) keine ausreichende Entfaltung des Oligonukleotids erreicht. Daher eluiert der Analyt unter diesen Bedingungen als extrem breiter Peak. Vergleicht man die Ergebnisse der 200 cm Kapillare (0.2 mm I.D.) mit denen der 400 cm Kapillare (0.2 mm I.D.), so sieht man, dass hier keinerlei Unterschiede in der Trenneffizienz bestehen. Beide Systeme erlauben eine akzeptable Trennung des 26mer Oligonukleotids und daher wurde, um das Totvolumen zu minimieren, für die Studie eine 200 cm Silikakapillare als Wärmetauscher verwendet.

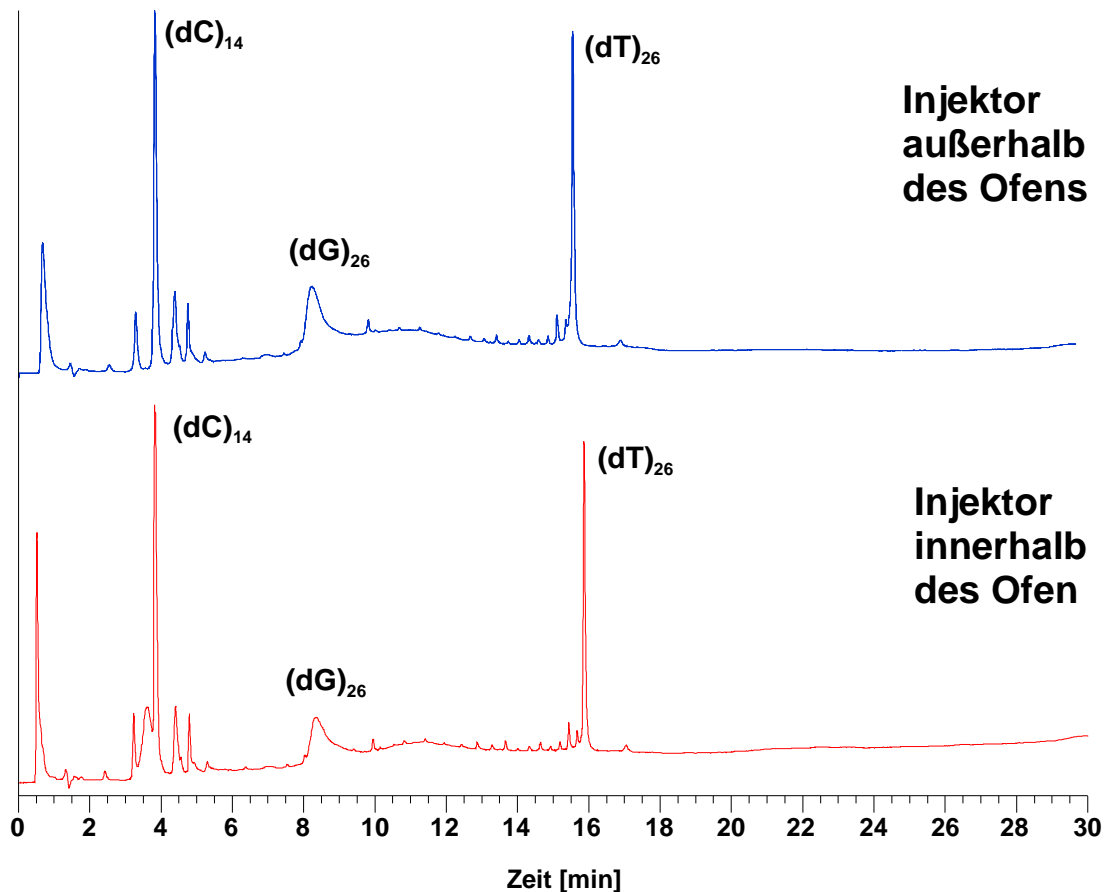
Im Gegensatz zur PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule musste für das Mikro-HPLC-System, bestehend aus einem 60 x 0.2 mm I.D. Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-Monolithen, kein Wärmetauscher verwendet werden, da hier eine akzeptable Trennung auch ohne Zusatzkapillare erreicht werden konnte. Erklärt werden kann dieses Phänomen dadurch, dass beim Mikro-HPLC-System, im Gegensatz zum analytischen System, ein günstigeres Fluss-Längen-Oberflächenverhältnis besteht und so die „normalen“ Zuleitungskapillare bereits als Wärmetauscher fungieren. Dadurch werden auch ohne Zusatzkapillaren eine gute Entfaltung der Analyten und eine effiziente Trennung ermöglicht (vgl. **Abbildung 3.4**, S. 202).



**Abbildung 3.39.** Untersuchung des Einflusses verschiedener Wärmetauscher-Materialien (Silika- und Stahlkapillare) und Kapillarlängen (80-400 cm) auf die Trennung eines 26mer Desoxyguanosin-Homooligonukleotids ((dG)<sub>26</sub>).

Säule: PS/DVB-C<sub>18</sub>, 50 x 4.6 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 40% ACN; linearer Gradient: 2-18% ACN in 30 min; Fluss: 567 µl/min; Temperatur: 80°C; Probe: (dC)<sub>14</sub> (erster Peak), (dG)<sub>26</sub> (zweiter Peak) und (dT)<sub>26</sub> (dritter Peak) mit 20 ng für (dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub> und 50 ng für (dG)<sub>26</sub>.

Neben der Optimierung des HPLC-Systems durch einen vorgeschalteten Wärmetauscher wurde auch der Einfluss der Position des Injektionssystems untersucht.



**Abbildung 3.40.** Untersuchung der optimalen Position des Injektionssystems (innerhalb oder außerhalb des Säulenofens) mit einer Oligonukleotid-Testmischung und einem HP 1050 System.

Säule: PS/DVB-C<sub>18</sub>, 50 x 4.6 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 40% ACN; linearer Gradient: 2-18% ACN in 30 min; Fluss: 567 µl/min; Temperatur: 80°C; Probe: (dC)<sub>14</sub> (erster Peak), (dG)<sub>26</sub> (zweiter Peak) und (dT)<sub>26</sub> (dritter Peak) mit 20 ng für (dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub> und 50 ng für (dG)<sub>26</sub>.

Wie aus früheren Arbeiten von Huber *et. al.* [97] bekannt ist, kann eine deutliche Verbesserung der Trenneffizienz des HPLC-Systems dadurch erreicht werden, indem das Injektionssystem ebenfalls temperiert wird. Um diese Temperierung des Injektionssystems zu erreichen haben Huber *et. al.* dieses innerhalb des Säulenofens platziert. Um den Einfluss der Position des Injektionssystems auf die Trenneffizienz zu untersuchen, wurde eine Testmischung ((dC)<sub>14</sub>, (dG)<sub>26</sub> und (dT)<sub>26</sub>) unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Injektor innerhalb und außerhalb des

Säulenofens) chromatographiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Abbildung 3.40** dargestellt.

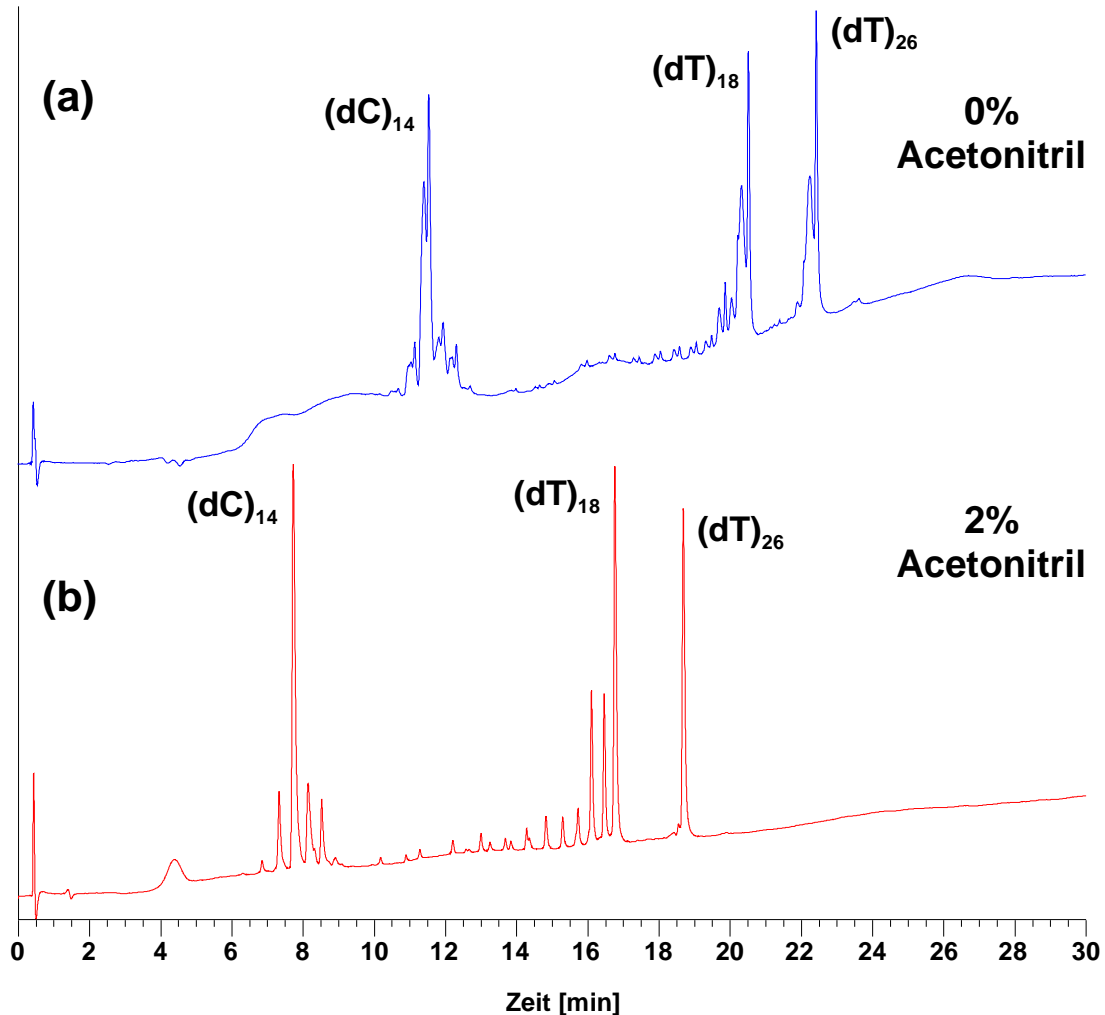
Wie aus **Abbildung 3.40** deutlich ersichtlich, spielt es keine Rolle, ob das Injektionssystem innerhalb oder außerhalb des Säulenofens platziert wird, da unter beiden Bedingungen eine vergleichbare Trenneffizienz erreicht wird. Daher war es nicht notwendig, das Analytische und das Mikro-HPLC-System für die Versuchsreihe entsprechend umzurüsten.

### **II. Einfluss des Acetonitril-Startgehaltes auf die Trenneffizienz der Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-C<sub>18</sub> Säule**

Ziel dieser Studie war es, die optimalen Gradient-Bedingungen für die Trennung der Oligonukleotide auf einer PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule zu ermitteln. Ausschlaggebend für diese Versuchsreihe war die Tatsache, dass es nicht möglich war, den für die Monolithen ausgearbeiteten linearen Gradienten von 0-16% Acetonitril in 30 min, problemlos auf die PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule zu übertragen. Während dieser Gradient auf einer monolithischen Trennsäule eine sehr gute Trennung der enthaltenen Oligonukleotide erlaubt (vgl. **Abbildung 3.4**), führt die Trennung der Oligonukleotid-Testmischung unter diesen Bedingungen auf einer PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule umgehend zum deutlichen Verlust von Auflösung und Trenneffizienz der Säule und zum Auftreten von Doppelpeaks (**Abbildung 3.41 (a)**). Daher wurde der Einfluss des ACN-Gehaltes auf die Trennleistung der PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule näher untersucht (**Abbildung 3.41**).

Während es bei einem linearen Gradienten mit einem Acetonitril-Startgehalt von 0% (**Abbildung 3.41 (a)**) zu einem starken Verlust an Trenneffizienz kommt, erreicht man mit einem Startgehalt von 2% Acetonitril eine hervorragende Auflösung aller im Testgemisch enthaltenen Oligonukleotide (**Abbildung 3.41 (b)**). Die Trenneffizienz der verwendeten Säule ist unter diesen experimentellen Bedingungen so hoch, dass auch während des Syntheseschrittes entstandene Fehlsequenzen (vgl. Kapitel 3.5.2) von den jeweiligen Ziel-Sequenzen (14mer, 18mer und 26mer) aufgelöst werden können. Im Gegensatz dazu kommt es mit einem ACN-Gehalt von 0% zu einem vollständigen Verlust der Trennleistung der Säule und zur Ausbildung von Doppelpeaks. Dieses Phänomen, das normalerweise ein Indiz dafür ist, dass

Schäden an der Packungsstruktur der Säule aufgetreten sind, zeigt sich sehr deutlich, wenn man z.B. die Trennungen des 26mer Oligonukleotids in (a) und (b) miteinander vergleicht.



**Abbildung 3.41.** Einfluss des ACN-Startgehaltes auf die Auflösung einer PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule. Untersucht wurde ein Testgemisch aus drei Oligonukleotiden ((dC)<sub>14</sub>, (dT)<sub>18</sub> und (dT)<sub>26</sub>) bei T=80°C.

Säule: PS/DVB-C<sub>18</sub>, 50 x 4.6 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+ 40% ACN; linearer Gradient: (a) 0-16% ACN in 30 min, (b) 2-18% ACN in 30 min; Fluss: 567 µl/min; Temperatur: 80°C; Probe: (dC)<sub>14</sub> (erster Peak), (dG)<sub>18</sub> (zweiter Peak) und (dT)<sub>26</sub> (dritter Peak) mit 20 ng für (dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub> und 50 ng für (dG)<sub>26</sub>.

Während in (b) das 26mer als scharfer Peak aufgelöst ist, tritt in (a), neben dem eigentlichen Substanzpeak, noch ein zweiter Peak im Frontbereich des

Substanzpeaks auf. Da dieser zusätzliche Peak weder bei der Trennung mit dem Monolithen, noch bei einer Trennung auf der C<sub>18</sub>-Säule mit einem ACN-Gehalt von 2% auftritt, kann auch ohne massenspektrometrische Untersuchung ausgeschlossen werden, dass es um einen zweiten Substanzpeak (z.B. eine 25mer Fehlsequenz) handelt. Da vergleichbare Effekte auch beim (dT)<sub>18</sub> und dessen Fehlsequenzen sowie beim (dC)<sub>14</sub> auftraten, kann daraus geschlossen werden, dass ein Startgehalt von 0% ACN zu einer Veränderung der stationären Phase führt.

Um festzustellen, ob es sich dabei um eine irreversible Schädigung der stationären Phase handelt, wurde der ACN-Gehalt anschließend wieder auf 2% erhöht. Bereits nach einigen Messungen waren die zuvor aufgetretenen Doppelpeaks wieder verschwunden, und die optimale Trennleistung der Säule war wieder hergestellt. Aufgrund der experimentell erhaltenen Ergebnisse wurde der für den Monolithen entwickelte Gradient von 0-16% ACN in 30 min, für die PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule auf 2-18% in 30 min angepasst.

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der beobachteten Doppelpeaks bei der Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-C<sub>18</sub> Säule wäre, dass die Octadecylketten in reinem Wasser kollabieren und dadurch die Trennleistung der Säule rapide reduziert wird. Dieser Effekt, der bei RP-Phasen dann auftritt, wenn die stark hydrophobe Oberfläche der stationären Phase mit einem sehr hydrophilen Eluenten (Wasser) in Berührung kommt, ist bereits seit Anfang der 70er Jahre bekannt und in der Literatur beschrieben [98-103]. Um das Zusammenklappen der Alkylketten zu verhindern, können entweder polare Gruppen in die Seitenketten eingebaut werden, oder es werden so genannte „Spacer“ verwendet, die als Stabilisatoren zwischen den Seitenketten fungieren und so das Kollabieren verhindern. Die einfachste Möglichkeit, den Kollaps der Alkylketten zu verhindern, ist, die Zusammensetzung der mobilen Phase so zu wählen, dass eine gewisse Mindestmenge an organischen Eluenten enthalten ist.

Ein weiterer Grund für das Auftreten der Doppelpeaks könnte darin zu sehen sein, dass durch den hohen Gehalt an Wasser in der mobilen Phase die, zur Synthese verwendeten Partikel der PS/DVB-C<sub>18</sub> Phase schrumpfen und es dadurch zur Ausbildung eines zusätzlichen Totvolumens (Void-Volume) am Säulenkopf kommt. Dieses zusätzliche Volumen bewirkt eine stärkere Verdünnung des Analyten, was wiederum zum Auftreten der beobachteten Doppelpeaks führt. Eine Erhöhung

des ACN-Gehaltes in der mobilen Phase von 0% auf 2% bewirkt ein erneutes Quellen der Polymerteilchen, wodurch das ursprüngliche Packungsvolumen der Säule wieder hergestellt wird. Dadurch kann die ursprüngliche Trenneffizienz der Säule wieder erhalten werden.

## 2. Bestimmung der empirischen Koeffizienten für das Additive Vorhersagemodell

Nach der Optimierung des HPLC-System durch die Verwendung des Wärmetauschers und der Anpassung des Gradienten konnten auch für die PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule und die Vydac Everest-C<sub>18</sub>-Silika-Säule, analog zum PS/DVB-Monolithen (Kapitel 3.6.2), die empirischen Koeffizienten des Additiven Retentionsvorhersagemodells bestimmt werden. Während für die Poly-(Styrol/Divinylbenzol)-C<sub>18</sub>-Säule Messungen bei 40°C, 50°C, 60°C und 80°C durchgeführt wurden, wurden auf der Everest C<sub>18</sub>-Silika-Säule die Messungen auf 30°C und 70°C beschränkt. In **Tabelle 3.11** sind die experimentell bestimmten Koeffizienten für die PS/DVB-C<sub>18</sub>-Säule zusammengefasst.

**Tabelle 3.11.** Experimentell bestimmte Koeffizienten zur Berechnung der Retentionszeiten via Additivem Vorhersagemodell. Die Daten wurden auf einer PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen.

PS/DVB-C <sub>18</sub> Säule					
Homooligonukleotid	Bez.	T=80°C	T=60°C	T=50°C	T=40°C
		Wert			
(dT) <sub>n</sub>	t	6.3051	5.5601	5.2124	4.8842
(dA) <sub>n</sub>	a	5.6251	4.8401	3.9147	3.8600
(dC) <sub>n</sub>	c	5.7667	4.9483	4.8045	5.7570
(dG) <sub>n</sub>	g	6.2006	6.0504	6.1153	6.2863
(dT) <sub>n</sub>	f	-5.4992	-1.3969	0.5723	2.4449
(dA) <sub>n</sub>	e	-6.3901	-3.0608	-0.5283	0.5259
(dC) <sub>n</sub>	h	-11.5760	-6.7446	-4.9618	-5.8907
(dG) <sub>n</sub>	i	-12.2570	-9.1551	-8.0310	-7.2305

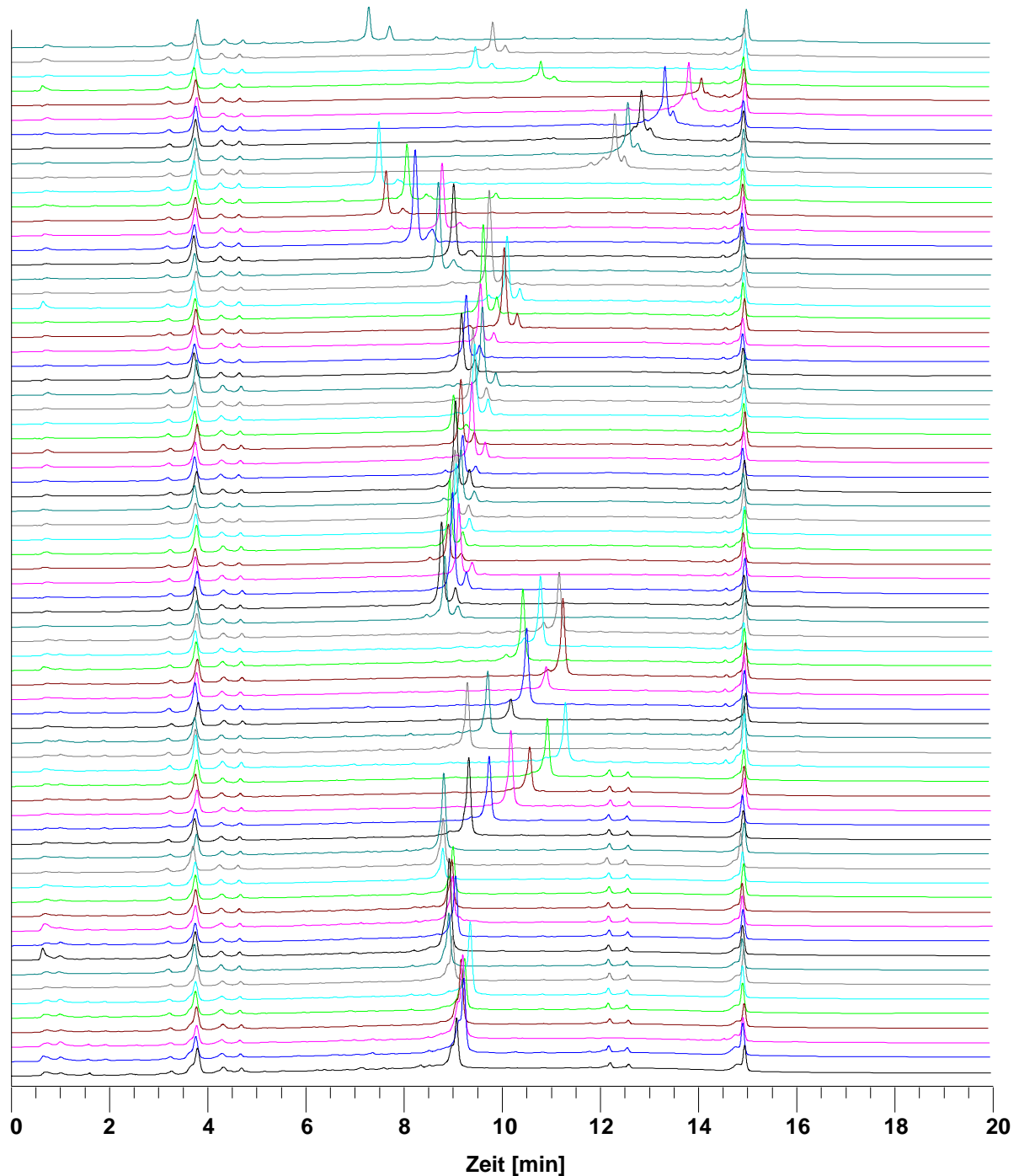
Die Daten für C<sub>18</sub>-Silika-Säule sind im Anhang dieses Kapitels der Dissertation aufgeführt (**Tabelle 3.14**).

### **3.8.3. Anwendung des Additiven Retentionsvorhersagemodells auf neue stationäre Phasen**

Wie bereits beim Monolithen wurde auch für die PS/DVB-C<sub>18</sub>-Säule und die Silika-Säule die Anwendbarkeit des Additiven Retentionsvorhersage-Modells untersucht. Dazu wurden die experimentellen Retentionszeiten von 72 verschiedenen Oligonukleotiden bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und mit den vorhergesagten Retentionszeiten verglichen. Auch für die PS/DVB-C<sub>18</sub> und die Silika-Säule wurden hohe experimentelle Anforderungen an die HPLC-Systeme gestellt. Dass diese hohen Anforderungen auch durch die konventionellen HPLC-Anlage erfüllt wurden, kann anhand eines Overlays von 72 verschiedenen Messungen auf der PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule bei 80°C (**Abbildung 3.42**) verdeutlicht werden.

Je nach Sequenz lagen die gemessenen Retentionszeiten zwischen 7.5 und 14 min. Aus den experimentellen Daten konnte für die verschiedenen Oligonukleotide bei 80°C eine mittlere Peakhalbwertsbreite von 0.10 min (6 s) bestimmt werden. Für die beiden internen Standards wurde eine Standardabweichung von 0.021 min und eine relative Standardabweichung von 0.552% für (dC)<sub>14</sub> und von 0.139% für (dT)<sub>26</sub> bestimmt. Vergleichbar gute Standardabweichungen wurden auch für 60°C ((dC)<sub>14</sub>: 0.06 min, (dT)<sub>26</sub>: 0.07 min), 50°C ((dC)<sub>14</sub>: 0.07 min, (dT)<sub>26</sub>: 0.05 min) und 40°C ((dC)<sub>14</sub>: 0.05 min, (dT)<sub>26</sub>: 0.06 min) erhalten.

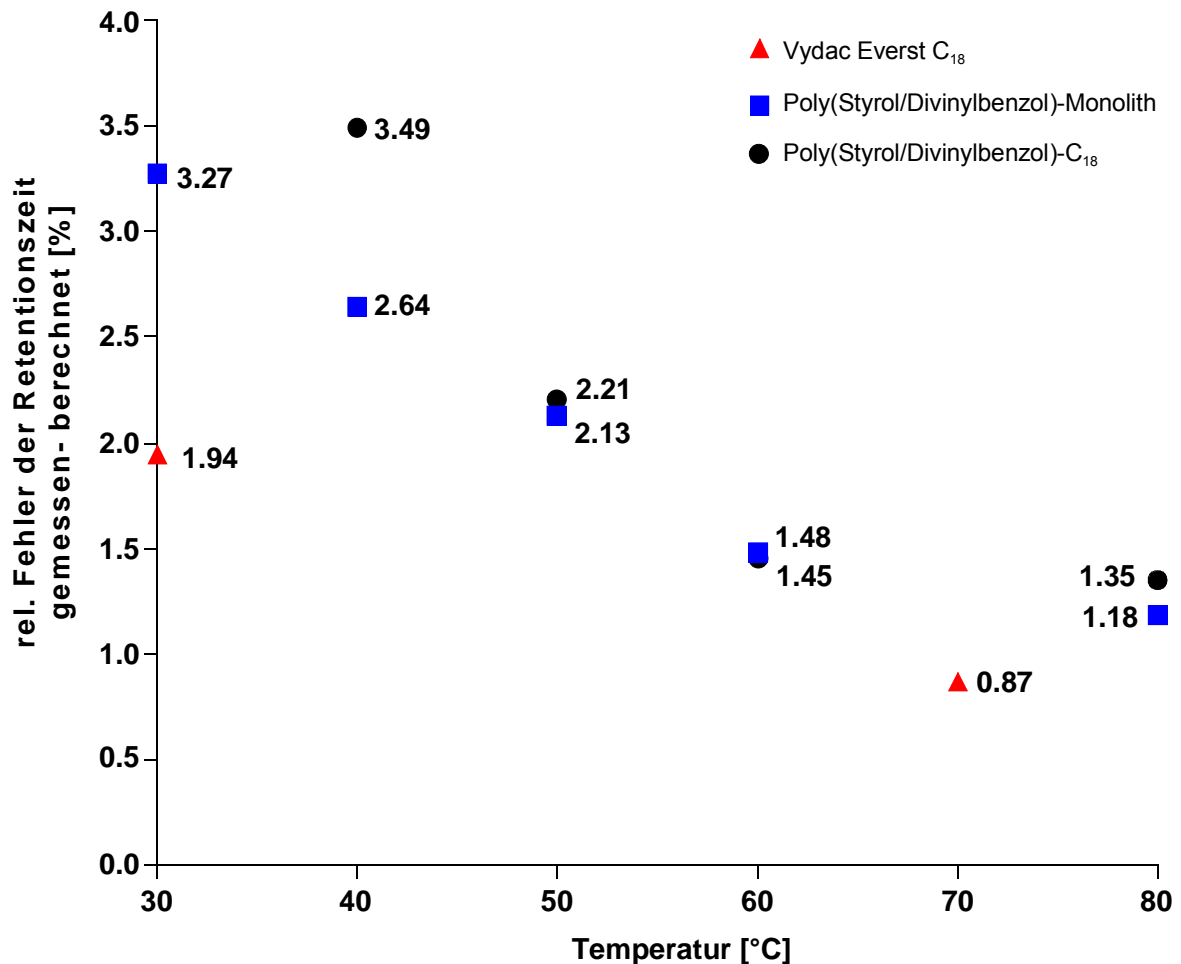




**Abbildung 3.42.** Overlay der Trennung von 72 verschiedenen Oligonukleotiden auf einer PS/DVB-C<sub>18</sub>.

Säule bei T=80°C. Säule: PS/DVB-C<sub>18</sub>, 50 x 4.6 mm I.D.; Laufmittel: (A) 100 mM Triethylammoniumacetat in 0.5 mM EDTA, (B), A+40% ACN; linearer Gradient: 2-18% ACN in 30 min; Fluss: 567 µl/min; Temperatur: 80°C; Probe: Standards (dC)<sub>14</sub> (erster Peak) und (dT)<sub>26</sub> (dritter Peak), Oligonukleotid (zweiter Peak), (dC)<sub>14</sub> und (dT)<sub>26</sub> 20 ng und Oligonukleotid 50 ng.

In nachfolgender **Abbildung 3.43** sind die korrigierten Ergebnisse der Vorhersage der Retentionszeiten für die PS/DVB-C<sub>18</sub>-Säule sowie für die Everest-C<sub>18</sub>-Silika-Säule grafisch dargestellt. Ein Überblick über die unkorrigierten Werte für diese beiden Säulen ist in **Abbildung 3.44** im Anhang dieser Arbeit gegeben



**Abbildung 3.43.** Durchschnittlicher relativer Fehler der experimentell bestimmten und berechneten (korrigierten) Retentionszeiten für 72 Oligonukleotide auf verschiedenen stationären Phasen.

Wie bereits für den Monolithen wurden auch für diese beiden Säulen Korrekturfaktoren eingeführt, um die berechneten Retentionszeiten an die experimentell bestimmten Zeiten anzugleichen. Diese Korrekturkoeffizienten wurden analog zu denen des Monolithen bestimmt. Ein Überblick über die jeweiligen Korrekturkoeffizienten ist in **Tabelle 3.12** gegeben.

**Tabelle 3.12.** Korrekturfaktoren zur Angleichung der berechneten Retentionszeiten an die experimentell bestimmten Retentionszeiten.

Säule	Korrekturfaktor		
	Temperatur [°C]	Steigung (c <sub>1</sub> )	Achsenabschnitt (c <sub>2</sub> )
PS/DVB-C <sub>18</sub>	80	0.85	2.4
	60	0.85	2.1
	50	0.85	1.9
	40	0.80	2.2
Vydac Everest-C <sub>18</sub>	70	0.74	4.1
	30	0.35	15.5

Wie aus **Abbildung 3.43** ersichtlich, wurden auch für die PS/DVB-C<sub>18</sub> und die C<sub>18</sub>-Silika-Säule gute Vorhersagewerte für alle Temperaturen erhalten. Vergleicht man die Werte der PS/DVB-C<sub>18</sub>Säule mit denen des Monolithen, so sieht man, dass man weitgehend vergleichbare Ergebnisse erhält. Während bei 80°C für den Monolithen durchschnittliche Abweichungen von 1.18% erhalten wurden, konnte für die PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule eine Abweichung von 1.35 bestimmt werden. Ähnliche Tendenzen wurde auch bei 60°C mit Abweichungen von 1.45% für die C<sub>18</sub>-Säule und 1.48% für den Monolithen und bei 50°C mit 2.21% für die C<sub>18</sub> und 2.13% für den Monolithen erhalten. Lediglich bei 40°C weichen die Werte für die PS/DVB-Säule mit 3.49% gegenüber 2.64% für den Monolithen etwas stärker ab. Auch für die Vydac Everest C<sub>18</sub>-Silika-Säule wurden mit einer Abweichung von 0.87% für 70°C und 1.94% bei 30°C sehr gute Übereinstimmungen zwischen experimentellen und berechneten Retentionszeiten erhalten. Weiterhin ist auch für diese stationären Phasen die Tendenz zu erkennen, dass die Vorhersagen umso schlechter werden, je niedriger die Trenntemperatur ist.

### 3.8.4. Vorhersage der Retentionszeiten auf einer PS/DVB-C<sub>18</sub> und einer C<sub>18</sub>-Silika-Säule unter Verwendung des SVM-Modells

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Retentionszeitvorhersagen für die PS/DVB-C<sub>18</sub>Säule und die C<sub>18</sub>-Silika-Säule aufgeführt. In nachfolgender Tabelle sind die Ergebnisse für diese beiden stationären Phasen aufgeführt.

**Tabelle 3.13.** Ergebnisse der Bewertung der Retentionsvorhersage mittels SVM-Modell für die PS/DVB-C<sub>18</sub> und die Silika-C<sub>18</sub>-Säule.

T [°C]	PS/DVB-C <sub>18</sub>			Vydac Everest C <sub>18</sub>		
	R <sup>2</sup>	s <sub>y</sub> [min]	rel. Fehler [%]	R <sup>2</sup>	s <sub>y</sub> [min]	rel. Fehler [%]
80	1.00	0.04	0.81	1.00	0.05	0.32
70						
60	0.99	0.09	0.86			
50	0.98	0.15	0.85			
40	0.99	0.15	0.77			
30				0.99	0.13	0.63

Wie aus den Daten von **Tabelle 3.13** ersichtlich, wurden auch für diese beiden Säulen mittels SVM-Modell sehr gute Vorhersageergebnisse erzielt. Auch hier ist die Qualität der Vorhersagen unabhängig von der Temperatur, was zeigt, dass dieses Modell in der Lage ist strukturelle Eigenschaften der Analyten in die Vorhersage einzubeziehen. Vergleiche man die relativen Fehler der Vorhersage mittels SVM-Modell mit denen des Additiven Retentionsvorhersage-Modells (**Abbildung 3.43**), so sieht man, dass das SVM-Modell bei 80°C um Faktor 1.6 besser ist, während dieser Wert bei 60°C auf 1.7, 50°C auf 2.6 und bei 40°C sogar auf Faktor 4.5 ansteigt (Vergleich für PS/DVB-C<sub>18</sub> Säule). Somit ist auch für diese Säulen das SVM-Modell dem Additiven Retentionsvorhersage-Modell bei niedrigen Temperaturen deutlich überlegen.

### 3.9. Literaturverzeichnis

1. R. M. Smith, *Retention and Selectivity in Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1995.
2. C. Horvath, W. Melander and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 129.
3. Cs. Horvath and W. Melander, *Chromatographic Science Series* (1985) 27.
4. Cs. Horvath and W. Melander, *High Performance Liquid Chromatography - Advances and Perspectives*, Horvath, Cs., Academic Press, New York, 1980, Vol. 2, p. 201.
5. P. W. Carr, J. H. Park and L. C. Tan, *J. Chromatogr. A*, 724 (1996) 1.
6. P. W. Carr, R. M. Doherty, M. J. Kamlet, R. W. Taft, W. Melander and Cs. Horvath, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 2674.
7. J. W. Li and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2202.
8. D. Bolliet and C. F. Poole, *Analyst*, 123 (1998) 295.
9. M. H. Abraham and M. Roses, *J. Phys. Org. Chem.*, 7 (1994) 672.
10. L. C. Tan, P. W. Carr and M. H. Abraham, *J. Chromatogr. A*, 752 (1996) 1.
11. K. Valko, L. R. Snyder and J. L. Glajch, *J. Chromatogr.*, 656 (1993) 501.
12. L. C. Tan and P. W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 799 (1998) 1.
13. M. Gilar, K. J. Fountain, Y. Budman, U. D. Neue, K. R. Yardley, P. D. Rainville, R. J. Russell 2nd and J. C. Gebler, *J Chromatogr A*, 958 (2002) 167.
14. R. Hoffmann, G. Bril and L. Otvos, *J. Chromatogr. A*, 814 (1998) 111.
15. S. Baba, *J. Chromatogr.*, 618 (1993) 41.
16. M. Palmblad, M. Ramstrom, K. E. Markides, P. Hakansson and J. Bergquist,

- Anal. Chem.*, 74 (2002) 5826.
17. T. Baczek, P. Wiczling, M. Marszall, Y. Heyden van der and R. Kaliszan, *J. of Proteome Res.*, 4 (2005) 555.
  18. R. Grüner, Universität des Saarlandes, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland, 2001.
  19. A. Wang, L. C. Tan and P. W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 848 (1999) 21.
  20. M. A. Garcia, M. F. Vitha and M. L. Marina, *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.*, 23 (2000) 873.
  21. L. Li, H. Yang, Y. Ding, L. Wang and Z. Zhang, *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.*, 22 (1999) 897.
  22. B. Cai and J. Li, *J. Chromatogr. A*, 905 (2001) 35.
  23. M. C. Pietrogrande, C. Bigli, C. Borea and F. Dondi, *J. Chromatogr.*, 522 (1990) 37.
  24. A. M. Zissimos, M. H. Abraham, A. Klamt, F. Eckert and J. Wood, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 42 (2002) 1320.
  25. A. Sandi and L. Szepeszy, *J. Chromatogr. A*, 818 (1998) 1.
  26. A. Sandi and L. Szepeszy, *J. Chromatogr. A*, 818 (1998) 19.
  27. R. Kaliszan, T. Baczek, A. Bucinski, B. Buszewski and M. Sztupecka, *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 271.
  28. T. Baczek, R. Kaliszan, H. A. Claessens and M. A. van Straten, *LC/GC Europe*, 14 (2001) 304.
  29. R. Baczek and R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A*, 962 (2002) 41.
  30. R. Kaliszan, *Structure and Retention in Chromatography. A Chemometric Approach*, Kaliszan, R., Harwood Academic Publishers, 1997.
  31. P. T. Jackson, M. R. Schure, T. P. Weber and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, 69

- (1997) 416.
32. J. Li and P. W. Carr, *Anal. Chim. Acta*, 334 (1996) 239.
33. E. Forgacs and T. Cserhati, *Molecular Bases of Chromatographic Separations*, CRC Press, Boca Raton, 1997.
34. K. Valko, C. Bevan and D. Reynolds, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2022.
35. J. H. Park, M. D. Jang, D. S. Kim and P. W. Carr, *J. Chromatogr.*, 513 (1990) 107.
36. S. V. Galushko, A. A. Kamenchuk and G. L. Pit, *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 47.
37. E. B. Ledesma and M. J. Wornat, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5437.
38. T. Hanai, *J. Chromatogr. A*, 985 (2003).
39. R. Kaliszan, T. Baczek, A. Cimochovska, P. Juszczyk, K. Wisniewska and Z. Grzonka, *Proteomics*, 5 (2005) 409.
40. P. Ghosh, B. Chawla, V. J. Prasanna and S. B. Jaffe, *Energy and Fuels*, 20 (2006) 609.
41. R. Kaliszan, T. A. G. Noctor and I. W. Wainer, *Chromatographia*, 33 (1992) 546.
42. Y. Baba and M. Fukuda, *J. Chromatogr.*, 458 (1988) 385.
43. J. A. Lewis, D. C. Lommen, W. D. Raddatz, J. W. Dolan, L. R. Snyder and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 183.
44. K. Petritis, L. J. Kangas, P. L. Ferguson, G. A. Anderson, L. Pasa-Tolic, M. S. Lipton, K. J. Auberry, E. F. Strittmaier, Y. Shen, R. Zhao and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 1039.
45. P. J. Oefner, *J. Chromatogr. B*, 739 (2000) 345.
46. W. A. Ausserer and M. L. Biros, *Biotechniques*, 19 (1995) 136.

47. M. W. Germann, R. T. Pon and J. Sande van de, *Anal. Biochem.*, 165 (1987) 399.
48. M. J. Kamlet and R. W. Taft, *J. of Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 377.
49. R. W. Taft and J. Kamlet, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 2886.
50. P. C. Sadek, P. W. Carr, R. M. Doherty, M. J. Kamlet, R. W. Taft and M. H. Abraham, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2971.
51. L. Szepesy, *Chromatographia Supplement*, 51 (2000) 98.
52. M. H. Abraham, G. S. D. R. M. Whiting and W. J. Shuley, *J. of Chromatography A*, 518 (1990) 329.
53. M. H. Abraham, G. S. Whiting, R. M. Doherty and W. J. Shuley, *J. of Chromatography A*, 587 (1991) 229.
54. M. H. Abraham and D. P. Walsch, *J. of Chromatography A*, 627 (1992) 294.
55. L. Rohrschneider, *Chromatographia*, 48 (1998) 728.
56. M. H. Abraham, C. F. Poole and S. K. Poole, *J. of Chromatography A*, 842 (1999) 79.
57. M. H. Abraham, D. S. Ballantine and B. K. Callihan, *J. of Chromatography A*, 878 (2000) 115.
58. J. H. Park, P. W. Carr, M. H. Abraham, R. W. Taft, R. M. Doherty and M. J. Kamlet, *Chromatographia*, 25 (1988) 373.
59. J. H. Park and P. W. Carr, *J. Chromatogr.*, 465 (1989) 123.
60. L. Rohrschneider, *J. of Chromatography A*, 22 (1966) 6.
61. L. Rohrschneider, *Anal. Chemistry*, 45 (1973) 1241.
62. W. O. McReynolds, *J. of Chromatographic Science*, 8 (1970) 685.
63. M. H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.*, 22 (1993) 73.



64. S. Griffin, S. Wyllie Grant and J. Markham, *J. of Chromatography A*, 864 (1999) 221.
65. M. Roses, D. Bolliet and C. F. Poole, *J. of Chromatography A*, 829 (1998) 29.
66. J. Zhao and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3619.
67. J. A. Blackwell and P. W. Carr, *J. of High Resolution Chromatography*, 21 (1998) 427.
68. M. Reta, P. W. Carr, P. C. Sadek and S. C. Rutan, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3484.
69. J. H. Park, Y. K. Ryu, H. J. Lim, J. K. Park, Y. K. Lee, M. D. Jang, J. K. Suh and P. W. Carr, *Chromatographia*, 49 (1999) 635.
70. R. Kaliszan, M. A. Straten van, M. Markuszewski, C. A. Cramers and H. A. Claessens, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999) 455.
71. M. A. Al-Haj, R. Kaliszan and A. Nasal, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2976.
72. B. J. Herbert and J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 744.
73. M. H. Abraham, H. S. Cadha, R. A. E. Leitao, R. C. Mitchel, W. J. Lambert, R. Kaliszan, A. Nasal and P. Haber, *J. of Chromatogr. A*, 766 (1997) 35.
74. B. C. Cupid, J. K. Nicholson, P. Davis, R. J. Ruane, I. D. Wilson, R. C. Glen, V. S. Rose, C. R. Beddell and J. C. Lindon, *Chromatographia*, 37 (1993) 241.
75. K. Azzaoui and L. Morin-Allory, *Chromatographia*, 42 389.
76. B. Buszewski and R. Gdzala-Kopciuch, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3277.
77. W. Haupt and A. Pingoud, *J. Chromatogr.*, 260 (1983) 419.
78. C. G. Huber, P. J. Oefner and G. K. Bonn, *Anal. Biochem.*, 212 (1993) 351.
79. S. Ikuta, R. Chattopadhyaya and R. E. Dickerson, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2253.

80. D. P. Lee and J. H. Kindsvater, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2425.
81. E. Kitzing, *Methods in Enzymology*, 211 (1992) 449.
82. D. L. Beveridge and G. Ravishanker, *Current Opinion in Structural Biology*, 4 (1994) 246.
83. D. L. Beveridge, S. Swaminathan, G. Ravishanker, J. M. Withka, J. Srinivasan, C. Prevost, S. Louise-May, D. R. Langley, F. M. DiCapua and P. H. Bolton, *Molecular Dynamics Simulations on the Hydration, Structure and Motions of DNA Oligomers*, The Macmillian Press Ltd., London, 1993.
84. S. Louise-May, P. Auffinger and E. Westhof, *Current Opinion in Structural Biology*, 6 (1996) 289.
85. C. G. Huber, A. Premstaller and H. Oberacher, *Method and Apparatus for Separating Polynucleotides Using Monolithic Capillary Columns*, US patent application U. S., 60/178.553 .
86. C. G. Huber, P. Oefner and G. Bonn, *J. Chromatogr.*, 599 (1992) 113.
87. S. P. Quinten, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Saarbrücken, Germany, 2003.
88. C. G. Huber and G. N. Berti, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2959.
89. P. Jandera, *Adv. Chromatogr.*, 43 (2005) 1.
90. Y. Shen, N. Tolic, C. Masselon, L. Pasa-Tolic, D. G. Camp 2nd, M. S. Lipton, G. A. Anderson and R. D. Smith, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 1037.
91. B. Schölkopf, R. Bartlett, A. Smola and R. Williamson, in L. Niklasson, M. Boden and T. Ziemke (Eds.), *Proc. Eighth Int'l Conf. Artificial Neural Networks*, 1998, p. 111.
92. F. Rosenblatt, *Psychological Review*, 62 386.
93. V. N. Vapnik, *The Nature of Statistical Learning Theory*, Wiley, New York, 1999.

94. P. Rice, I. Longden and A. Bleasby, *Trends Genet*, 16 (2000) 276.
95. I. Hofacker, *Vienna RNA Package, RNA Secondary Structure Prediction and Comparison* [Web Page], April 2006. Available at <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/>, accessed June 2006.
96. C.-C. Chang and C.-J. Lin, *LIBSVM: a library for support vector machines* [Web Page], 2001. Available at <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>.
97. C. G. Huber, P. J. Oefner and G. K. Bonn, *Chromatographia*, 37 (1993) 653.
98. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., 1979.
99. U. Neue, *HPLC Columns, Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, 1997.
100. J. J. Kirkland, *Chromatographia*, 8 (1975) 661.
101. R. P. W. Scott and P. Kucera, *J. of Chromatography*, 142 (1977) 213.
102. R. E. Majors and M. Przybyciel, *LC-GC Europe*, 15 (2002) 780.
103. M. Przybyciel and R. E. Majors, *LC-GC Europe*, 15 (2002) 652.

### 3.10. Anhang zum Kapitel 3

#### I. Tabellen

**Tabelle 3.14.** Experimentell bestimmte Koeffizienten für  $T=70^{\circ}\text{C}$  und  $T=30^{\circ}\text{C}$  für die Vydac Everest  $\text{C}_{18}$ -Säule zur Berechnung der Retentionszeiten mittels Additivem Modell.

Vydac Everest $\text{C}_{18}$ Säule			
Homooligonukleotid	Bez.	$T=70^{\circ}\text{C}$	$T=30^{\circ}\text{C}$
		Wert	
(dT) <sub>n</sub>	t	5.4605	6.5312
(dA) <sub>n</sub>	a	7.4161	7.7699
(dC) <sub>n</sub>	c	6.0355	12.2190
(dG) <sub>n</sub>	g	10.6470	10.9030
(dT) <sub>n</sub>	f	7.6849	6.7683
(dA) <sub>n</sub>	e	-0.7310	0.0959
(dC) <sub>n</sub>	h	-0.6867	-10.7650
(dG) <sub>n</sub>	i	-12.0910	-6.3321

**Tabelle 3.15.** Experimentelle und berechnete Retentionszeiten (Additives Modell (A.M.), SVM-Modell) für die Messung von 72 Oligonukleotiden auf einer PS/DVB- $\text{C}_{18}$  Säule bei verschiedenen Temperaturen (unkorrigierte Werte des A.M.).

PS-DVB- $\text{C}_{18}$ -Säule												
Nr.	Retentionszeit Oligonukleotid [min]											
	80°C			60°C			50°C			40°C		
	Exp.	A.M.	SVM	Exp.	A.M.	SVM	Exp.	A.M.	SVM	Exp.	A.M.	SVM
1	9.04	9.56	9.17	10.88	11.51	11.03	11.76	12.38	11.94	12.57	13.74	12.78
2	9.22	9.56	9.24	11.08	11.51	11.14	11.99	12.38	12.05	12.82	13.74	12.89
3	9.19	9.56	9.17	11.05	11.51	11.04	11.96	12.38	11.94	12.79	13.74	12.79
4	9.15	9.56	9.17	11.00	11.51	11.03	11.89	12.38	11.94	12.71	13.74	12.78
5	9.25	9.56	9.29	11.13	11.51	11.18	12.05	12.38	12.11	12.93	13.74	12.94
6	9.36	9.56	9.28	11.25	11.51	11.17	12.16	12.38	12.09	13.00	13.74	12.93
7	8.97	9.37	8.90	10.88	11.38	10.81	11.82	12.32	11.74	12.69	13.73	12.62
8	8.93	9.37	8.96	10.83	11.38	10.87	11.75	12.32	11.69	12.56	13.73	12.63

Fortsetzung von **Tabelle 3.15.**

9	8.93	9.37	8.94	10.87	11.38	10.87	11.83	12.32	11.82	12.70	13.73	12.67
10	9.06	9.37	8.91	10.99	11.38	10.80	11.97	12.32	11.72	12.91	13.73	12.62
11	9.00	9.37	8.96	10.98	11.38	10.91	11.98	12.32	11.86	12.92	13.73	12.73
12	8.99	9.37	8.95	10.93	11.38	10.87	11.88	12.32	11.82	12.75	13.73	12.67
13	9.00	9.37	8.96	10.93	11.38	10.87	11.71	12.32	11.67	12.77	13.73	12.62
14	8.80	9.37	8.88	10.67	11.38	10.79	11.55	12.32	11.72	12.43	13.73	12.59
15	8.85	9.45	8.81	10.60	11.51	10.54	11.48	12.45	11.42	12.09	13.77	12.02
16	8.79	9.45	8.93	10.67	11.51	10.85	11.56	12.45	11.66	12.32	13.77	12.39
17	9.33	9.85	9.35	11.22	11.84	11.26	12.15	12.77	12.19	13.02	14.13	13.01
18	9.75	10.27	9.74	11.63	12.23	11.61	12.56	13.15	12.53	13.43	14.50	13.37
19	10.15	10.68	10.15	12.02	12.60	12.02	12.95	13.50	12.93	13.81	14.85	13.77
20	10.55	11.06	10.48	12.40	12.95	12.30	13.32	13.84	13.20	14.20	15.17	14.05
21	10.91	11.43	10.87	12.75	13.29	12.69	13.64	14.17	13.58	14.51	15.48	14.42
22	11.28	11.78	11.21	13.08	13.61	13.01	14.04	14.48	13.89	14.84	15.78	14.72
23	9.29	9.85	9.36	11.18	11.84	11.27	12.10	12.77	12.19	12.95	14.13	13.02
24	9.72	10.27	9.75	11.57	12.23	11.62	12.49	13.15	12.54	13.31	14.50	13.38
25	10.13	10.68	10.11	11.98	12.60	11.97	12.89	13.50	12.86	13.74	14.85	13.69
26	10.49	11.06	10.53	12.31	12.95	12.38	13.21	13.84	13.27	14.05	15.17	14.12
27	10.89	11.43	10.90	12.69	13.29	12.72	13.59	14.17	13.61	14.42	15.48	14.45
28	11.20	11.78	11.24	12.99	13.61	13.04	13.86	14.48	13.92	14.69	15.78	14.76
29	10.40	11.06	10.45	12.21	12.95	12.29	13.10	13.84	13.17	13.91	15.17	13.99
30	10.78	11.43	10.81	12.55	13.29	12.61	13.42	14.17	13.48	14.24	15.48	14.31
31	11.13	11.78	11.15	12.89	13.61	12.93	13.75	14.48	13.79	14.55	15.78	14.60
32	8.81	9.24	8.79	10.70	11.21	10.67	11.62	12.10	11.57	12.45	13.51	12.40
33	8.77	9.27	8.79	10.61	11.26	10.68	11.50	12.15	11.56	12.31	13.53	12.36
34	8.96	9.44	9.09	10.76	11.35	10.92	11.63	12.17	11.81	12.39	13.53	12.61
35	9.11	9.44	9.15	10.96	11.35	11.01	11.86	12.17	11.91	12.67	13.53	12.69
36	8.91	9.37	8.87	10.83	11.38	10.77	11.76	12.32	11.69	12.63	13.73	12.56
37	8.91	9.40	8.96	10.80	11.42	10.90	11.72	12.36	11.84	12.57	13.74	12.65
38	9.05	9.42	9.01	10.95	11.47	10.96	11.85	12.41	11.87	12.67	13.76	12.65
39	9.04	9.45	9.00	10.98	11.51	10.92	11.92	12.45	11.78	12.88	13.77	12.54
40	9.17	9.53	9.17	11.06	11.47	11.02	11.96	12.34	11.95	12.80	13.73	12.84
41	9.03	9.56	9.17	10.89	11.51	11.04	11.76	12.38	11.94	12.56	13.74	12.79
42	9.21	9.56	9.17	11.09	11.51	11.03	11.98	12.38	11.94	12.78	13.74	12.78
43	9.38	9.59	9.32	11.26	11.56	11.20	12.15	12.43	12.09	12.97	13.76	12.89
44	9.13	9.59	9.18	11.00	11.56	11.05	11.88	12.43	11.94	12.70	13.76	12.75
45	9.02	9.52	9.03	10.95	11.59	11.01	11.90	12.58	11.96	12.79	13.96	12.80
46	9.44	9.73	9.44	11.29	11.61	11.25	12.17	12.41	12.14	12.98	13.75	13.00
47	9.41	9.76	9.45	11.23	11.65	11.26	12.09	12.45	12.14	12.89	13.76	12.96
48	9.57	9.79	9.46	11.37	11.70	11.28	12.22	12.50	12.15	12.99	13.78	12.92
49	9.19	9.69	9.31	11.08	11.68	11.24	11.98	12.60	12.17	12.83	13.96	13.03
50	9.29	9.72	9.36	11.16	11.73	11.29	12.05	12.65	12.21	12.88	13.97	13.05
51	9.58	9.92	9.54	11.38	11.86	11.39	12.24	12.71	12.27	13.03	13.99	13.08
52	10.03	10.09	9.81	11.82	11.96	11.59	12.68	12.74	12.47	13.47	13.99	13.29
53	9.62	10.04	9.61	11.48	12.03	11.49	12.35	12.93	12.40	13.17	14.21	13.23
54	10.11	10.34	9.95	11.96	12.29	11.80	12.84	13.17	12.72	13.83	14.42	13.60
55	9.72	9.47	9.38	11.66	11.40	11.25	12.59	12.23	12.17	13.47	13.48	13.08
56	8.71	8.74	8.65	10.70	10.72	10.55	11.67	11.59	11.50	12.60	12.94	12.37
57	9.05	8.95	9.00	11.00	10.97	10.95	11.98	11.86	11.92	12.91	13.10	12.84
58	8.25	8.33	8.34	10.32	10.46	10.38	11.34	11.45	11.37	12.30	12.77	12.29
59	8.78	8.50	8.74	10.70	10.48	10.64	11.60	11.29	11.62	12.43	12.48	12.50
60	7.64	8.06	8.13	9.61	10.06	10.14	10.55	10.90	11.14	11.44	12.13	12.03

Fortsetzung von **Tabelle 3.15.**

<b>61</b>	8.07	7.93	8.03	10.06	10.01	10.00	10.98	10.90	10.92	11.84	12.05	11.77
<b>62</b>	7.51	7.46	7.72	9.50	9.58	9.73	10.45	10.49	10.64	11.37	11.66	11.45
<b>63</b>	12.29	12.65	12.25	13.90	14.29	13.85	14.68	14.97	14.62	15.40	16.22	15.39
<b>64</b>	12.56	13.19	12.52	14.09	14.74	14.04	14.81	15.37	14.75	15.48	16.64	15.41
<b>65</b>	12.84	13.61	12.80	14.37	15.16	14.32	15.09	15.80	15.04	15.78	17.07	15.77
<b>66</b>	13.32	14.10	13.28	14.74	15.52	14.69	15.41	16.03	15.35	16.06	17.28	15.99
<b>67</b>	13.78	14.78	13.82	15.15	16.15	15.21	15.80	16.64	15.86	16.40	17.86	16.47
<b>68</b>	14.05	15.10	14.01	15.38	16.41	15.44	16.01	16.84	16.02	16.39	18.05	16.39
<b>69</b>	10.80	11.78	10.84	12.07	13.45	12.01	10.96	14.13	11.02	10.40	15.47	10.33
<b>70</b>	9.42	10.06	9.46	10.91	11.91	10.61	10.56	12.69	10.41	9.76	13.98	9.92
<b>71</b>	9.80	10.06	9.53	9.95	11.91	10.61	9.73	12.69	10.52	10.35	13.98	10.26
<b>72</b>	7.24	7.63	7.61	9.07	9.74	9.12	9.68	10.66	9.74	9.55	11.87	9.62

**Tabelle 3.16.** Experimentelle und berechnete Retentionszeiten (Additives Modell (A.M.), SVM-Modell) für die Messung von 72 Oligonukleotiden auf einem PS/DVB-Monolithen bei verschiedenen Temperaturen (unkorrigierte Werte des A.M.).

PS-DVB-Monolith															
Nr.	Retentionszeit Oligonukleotid [min]														
	80°C			60°C			50°C			40°C			30°C		
	Exp.	A.M.	SVM	Exp.	A.M.	SVM	Exp.	A.M.	SVM	Exp.	A.M.	SVM	Exp.	A.M.	SVM
<b>1</b>	13.58	15.06	13.86	15.66	16.81	15.87	16.37	17.50	16.62	16.73	18.32	17.14	17.40	19.20	17.60
<b>2</b>	13.99	15.06	13.97	15.89	16.81	15.97	16.61	17.50	16.75	17.14	18.32	17.29	17.64	19.20	17.80
<b>3</b>	14.00	15.06	13.84	15.87	16.81	15.81	16.62	17.50	16.60	17.08	18.32	17.09	17.50	19.20	17.55
<b>4</b>	13.90	15.06	13.86	15.84	16.81	15.88	16.55	17.50	16.62	17.11	18.32	17.15	17.52	19.20	17.61
<b>5</b>	14.03	15.06	13.93	15.93	16.81	15.87	16.70	17.50	16.70	17.34	18.32	17.19	17.84	19.20	17.68
<b>6</b>	14.08	15.06	13.90	16.08	16.81	15.90	16.81	17.50	16.68	17.40	18.32	17.20	17.77	19.20	17.68
<b>7</b>	13.72	14.84	13.64	15.79	16.67	15.63	16.44	17.42	16.54	17.06	18.26	17.04	17.52	19.23	17.47
<b>8</b>	13.66	14.84	13.62	15.67	16.67	15.62	16.27	17.42	16.37	16.85	18.26	16.98	16.97	19.23	17.32
<b>9</b>	13.58	14.84	13.67	15.68	16.67	15.70	16.51	17.42	16.52	17.00	18.26	17.08	17.44	19.23	17.53
<b>10</b>	13.70	14.84	13.65	15.84	16.67	15.67	16.66	17.42	16.49	17.30	18.26	17.06	17.99	19.23	17.47
<b>11</b>	13.76	14.84	13.64	15.78	16.67	15.63	16.65	17.42	16.57	17.37	18.26	17.06	18.05	19.23	17.52
<b>12</b>	13.79	14.84	13.63	15.67	16.67	15.65	16.57	17.42	16.48	17.12	18.26	17.01	17.62	19.23	17.46
<b>13</b>	13.76	14.84	13.64	15.73	16.67	15.64	16.53	17.42	16.30	17.08	18.26	16.97	17.67	19.23	17.25
<b>14</b>	13.47	14.84	13.59	15.49	16.67	15.58	16.25	17.42	16.48	17.00	18.26	16.97	17.23	19.23	17.40
<b>15</b>	13.50	15.18	13.48	15.34	16.97	15.26	15.89	17.72	16.02	16.30	18.57	16.31	16.84	19.47	16.69
<b>16</b>	13.51	15.18	13.60	15.36	16.97	15.45	16.13	17.72	16.27	16.60	18.57	16.70	16.62	19.47	17.11
<b>17</b>	13.98	15.44	14.08	16.03	17.23	16.11	16.79	17.97	16.91	17.40	18.81	17.46	17.83	19.75	17.97
<b>18</b>	14.47	15.90	14.48	16.61	17.67	16.49	17.29	18.40	17.23	17.94	19.23	17.83	18.49	20.16	18.33
<b>19</b>	14.90	16.34	14.93	16.93	18.08	16.86	17.72	18.80	17.63	18.37	19.62	18.25	18.99	20.55	18.77
<b>20</b>	15.40	16.75	15.31	17.45	18.47	17.25	18.20	19.18	17.96	18.85	20.00	18.63	19.51	20.92	19.14
<b>21</b>	15.80	17.14	15.71	17.75	18.84	17.58	18.57	19.55	18.31	19.17	20.35	18.98	19.83	21.26	19.50
<b>22</b>	16.17	17.52	16.08	18.07	19.20	17.94	18.99	19.89	18.63	19.55	20.69	19.34	20.21	21.59	19.87
<b>23</b>	13.98	15.44	14.04	15.97	17.23	16.08	16.72	17.97	16.87	17.22	18.81	17.42	17.74	19.75	17.91
<b>24</b>	14.48	15.90	14.47	16.47	17.67	16.46	17.18	18.40	17.24	17.72	19.23	17.82	18.10	20.16	18.33
<b>25</b>	14.93	16.34	14.91	16.83	18.08	16.78	17.66	18.80	17.62	18.30	19.62	18.20	18.76	20.55	18.73

Fortsetzung von **Tabelle 3.16.**

26	15.30	16.75	15.29	17.21	18.47	17.22	18.04	19.18	17.95	18.57	20.00	18.61	19.13	20.92	19.13
27	15.72	17.14	15.68	17.67	18.84	17.64	18.55	19.55	18.30	19.01	20.35	19.02	19.64	21.26	19.55
28	15.99	17.52	16.05	17.98	19.20	18.03	18.77	19.89	18.64	19.40	20.69	19.40	19.88	21.59	19.95
29	15.25	16.75	15.34	17.09	18.47	17.18	17.85	19.18	17.99	18.39	20.00	18.59	18.99	20.92	19.17
30	15.69	17.14	15.72	17.49	18.84	17.46	18.27	19.55	18.29	18.89	20.35	18.87	19.44	21.26	19.51
31	15.87	17.52	16.08	17.72	19.20	17.84	18.71	19.89	18.60	19.12	20.69	19.23	19.72	21.59	19.88
32	13.48	14.69	13.48	15.51	16.47	15.47	16.21	17.17	16.35	16.76	18.01	16.76	17.21	18.93	17.12
33	13.47	14.80	13.51	15.36	16.58	15.44	16.06	17.27	16.35	16.60	18.11	16.71	16.97	19.01	17.13
34	13.62	14.90	13.76	15.42	16.62	15.75	16.24	17.25	16.48	16.61	18.06	16.93	17.10	18.90	17.33
35	13.75	14.90	13.84	15.70	16.62	15.78	16.43	17.25	16.54	16.97	18.06	17.01	17.41	18.90	17.45
36	13.58	14.84	13.61	15.48	16.67	15.59	16.40	17.42	16.51	16.97	18.26	16.99	17.43	19.23	17.42
37	13.50	14.96	13.67	15.43	16.77	15.68	16.32	17.52	16.56	16.98	18.37	17.04	17.35	19.31	17.55
38	13.67	15.07	13.72	15.67	16.87	15.64	16.44	17.62	16.60	16.90	18.47	16.99	17.40	19.39	17.55
39	13.68	15.18	13.66	15.75	16.97	15.55	16.61	17.72	16.42	17.37	18.57	16.88	18.07	19.47	17.34
40	13.92	14.94	13.83	15.83	16.71	15.86	16.59	17.39	16.62	17.25	18.22	17.18	17.65	19.13	17.58
41	13.62	15.06	13.88	15.68	16.81	15.84	16.37	17.50	16.63	16.82	18.32	17.13	17.29	19.20	17.60
42	13.85	15.06	13.87	15.80	16.81	15.87	16.64	17.50	16.63	17.11	18.32	17.14	17.46	19.20	17.60
43	13.99	15.17	13.91	15.98	16.91	15.90	16.83	17.60	16.65	17.36	18.42	17.13	17.82	19.28	17.64
44	13.88	15.17	13.91	15.32	16.91	15.84	16.51	17.60	16.65	17.12	18.42	17.10	17.61	19.28	17.63
45	13.57	15.11	13.81	15.81	16.96	15.90	16.59	17.76	16.76	17.15	18.63	17.34	17.77	19.61	17.93
46	14.04	15.16	14.07	16.21	16.86	16.10	16.85	17.47	16.71	17.39	18.27	17.29	17.98	19.10	17.72
47	14.05	15.27	14.13	16.11	16.96	16.11	16.78	17.58	16.74	17.17	18.38	17.28	17.82	19.17	17.77
48	14.29	15.38	14.17	16.19	17.06	16.08	16.86	17.68	16.75	17.31	18.48	17.24	17.82	19.25	17.77
49	13.77	15.21	14.04	15.90	17.01	15.99	16.68	17.74	16.86	17.20	18.58	17.41	17.78	19.50	17.99
50	13.96	15.32	14.02	15.94	17.11	16.02	16.71	17.84	16.82	17.16	18.68	17.36	17.81	19.58	17.94
51	14.17	15.53	14.24	16.20	17.25	16.19	16.90	17.92	16.88	17.36	18.74	17.42	17.90	19.55	18.01
52	14.68	15.63	14.49	16.69	17.30	16.48	17.40	17.90	16.99	17.87	18.69	17.62	18.40	19.45	18.18
53	14.23	15.69	14.38	16.31	17.45	16.34	17.09	18.17	17.05	17.50	18.99	17.66	18.16	19.85	18.32
54	14.81	15.94	14.71	16.72	17.69	16.74	17.61	18.39	17.29	18.13	19.21	18.06	18.75	20.05	18.73
55	14.47	14.85	13.94	16.47	16.59	16.06	17.36	17.24	16.61	17.97	18.04	17.30	18.56	18.80	17.95
56	13.24	14.03	13.28	15.55	15.82	15.43	16.28	16.50	16.15	16.90	17.33	16.73	17.65	18.17	17.24
57	13.67	14.24	13.62	15.74	16.05	15.81	16.67	16.78	16.50	17.34	17.59	17.23	18.17	18.39	18.00
58	12.78	13.64	13.05	15.12	15.55	15.21	15.97	16.35	16.11	16.57	17.22	16.68	17.29	18.12	17.42
59	13.37	13.68	13.16	15.49	15.44	15.40	16.23	16.09	16.09	16.79	16.88	16.68	17.30	17.54	17.41
60	12.16	13.19	12.61	14.38	14.97	14.80	15.10	15.64	15.74	15.67	16.44	16.15	16.35	17.14	16.89
61	12.62	13.08	12.54	14.85	14.91	14.77	15.54	15.64	15.68	16.10	16.45	15.99	16.61	17.12	16.77
62	11.96	12.64	12.24	14.19	14.48	14.42	14.99	15.22	15.48	15.54	16.03	15.65	16.37	16.71	16.42
63	17.23	18.36	17.11	19.08	19.88	18.92	19.69	20.40	19.28	20.13	21.14	20.01	20.64	21.91	20.50
64	17.46	18.91	17.54	19.27	20.37	19.35	19.80	20.85	19.80	20.04	21.57	20.38	20.57	22.33	20.73
65	17.80	19.47	17.89	19.57	20.92	19.51	20.12	21.40	20.17	20.41	22.13	20.51	20.93	22.92	20.99
66	18.41	19.96	18.35	19.93	21.29	19.90	20.47	21.65	20.47	20.75	22.35	20.70	21.20	23.05	21.07
67	18.85	20.69	18.97	20.31	21.99	20.52	20.89	22.34	20.99	21.15	23.01	21.26	21.60	23.70	21.76
68	19.08	21.07	19.00	20.63	22.31	20.54	21.07	22.59	20.93	21.24	23.26	21.13	21.76	23.91	21.60
69	15.62	17.44	15.67	16.56	18.98	16.48	14.79	19.50	14.93	13.59	20.25	13.69	13.65	21.07	13.81
70	14.08	15.52	14.16	15.60	17.20	15.37	14.57	17.80	14.31	13.41	18.59	13.30	13.22	19.37	13.37
71	14.63	15.52	14.54	14.22	17.20	15.60	13.57	17.80	14.55	13.74	18.59	13.77	14.83	19.37	14.06
72	11.74	12.82	11.83	13.74	14.68	13.83	14.02	15.41	14.15	13.52	16.24	13.62	13.47	16.97	13.63

**Tabelle 3.17.** Experimentelle und berechnete Retentionszeiten (Additives Modell (A.M.), SVM-Modell) für die Messung von 72 Oligonukleotiden auf einer Vydac Everest C<sub>18</sub> Säule bei verschiedenen Temperaturen (unkorrigierte Werte des A.M.).

<b>Vydac Everest C<sub>18</sub></b>						
<b>Nr.</b>	<b>Retentionszeit Oligonukleotid [min]</b>					
	<b>70°C</b>			<b>30°C</b>		
	<b>Exp.</b>	<b>A.M.</b>	<b>SVM</b>	<b>Exp.</b>	<b>A.M.</b>	<b>SVM</b>
1	19.48	21.71	19.61	22.78	27.34	23.03
2	19.73	21.71	19.69	23.16	27.34	23.16
3	19.63	21.71	19.56	22.98	27.34	22.95
4	19.62	21.71	19.63	22.89	27.34	23.04
5	19.77	21.71	19.63	23.27	27.34	23.21
6	19.89	21.71	19.59	23.23	27.34	23.11
7	19.47	21.53	19.44	23.06	27.48	23.01
8	19.39	21.53	19.38	22.80	27.48	23.17
9	19.45	21.53	19.48	23.08	27.48	23.19
10	19.61	21.53	19.49	23.49	27.48	23.31
11	19.56	21.53	19.36	23.67	27.48	23.38
12	19.42	21.53	19.41	23.35	27.48	22.91
13	19.52	21.53	19.44	23.37	27.48	23.23
14	19.26	21.53	19.34	22.88	27.48	23.00
15	19.23	21.94	19.20	22.43	27.51	22.76
16	19.04	21.94	19.08	22.37	27.51	22.47
17	19.66	22.11	19.76	23.26	27.89	23.24
18	20.21	22.53	20.18	23.78	28.26	23.67
19	20.68	22.92	20.60	24.18	28.61	24.16
20	21.02	23.28	20.99	24.64	28.94	24.53
21	21.39	23.63	21.36	24.88	29.25	24.81
22	21.73	23.96	21.70	25.16	29.55	25.05
23	19.59	22.11	19.68	23.20	27.89	23.38
24	20.12	22.53	20.11	23.63	28.26	23.74
25	20.56	22.92	20.52	24.27	28.61	24.18
26	20.93	23.28	20.92	24.40	28.94	24.51
27	21.35	23.63	21.29	24.97	29.25	24.86
28	21.63	23.96	21.64	24.93	29.55	25.29
29	20.77	23.28	20.96	24.18	28.94	24.45
30	21.15	23.63	21.33	24.52	29.25	24.61
31	21.56	23.96	21.68	24.85	29.55	24.74
32	19.25	21.44	19.28	22.78	27.37	22.67
33	19.16	21.57	19.18	22.53	27.38	22.51
34	19.40	21.62	19.52	22.60	27.23	22.77
35	19.59	21.62	19.56	22.87	27.23	22.98
36	19.34	21.53	19.40	23.04	27.48	23.02
37	19.31	21.67	19.32	22.81	27.49	22.95
38	19.41	21.80	19.30	22.89	27.50	22.79
39	19.41	21.94	19.38	23.14	27.51	22.70
40	19.66	21.58	19.70	23.12	27.33	23.23
41	19.48	21.71	19.61	22.78	27.34	23.02
42	19.65	21.71	19.63	22.93	27.34	23.04



Fortsetzung von **Tabelle 3.17.**

<b>43</b>	19.83	21.85	19.57	23.20	27.36	22.89
<b>44</b>	19.51	21.85	19.58	22.94	27.36	22.90
<b>45</b>	19.37	21.76	19.48	23.10	27.61	22.99
<b>46</b>	19.90	21.76	19.93	23.18	27.20	23.29
<b>47</b>	19.87	21.89	19.92	23.13	27.21	23.12
<b>48</b>	19.96	22.03	19.93	23.16	27.22	23.06
<b>49</b>	19.67	21.80	19.71	23.06	27.46	23.02
<b>50</b>	19.73	21.94	19.62	23.17	27.47	23.13
<b>51</b>	19.96	22.12	19.96	23.17	27.33	23.22
<b>52</b>	20.46	22.16	20.43	23.79	27.19	23.49
<b>53</b>	20.07	22.21	20.10	23.34	27.45	23.50
<b>54</b>	20.66	22.35	20.65	24.06	27.41	23.95
<b>55</b>	20.23	21.20	20.07	23.76	25.96	23.36
<b>56</b>	19.27	20.57	19.24	23.09	25.94	22.86
<b>57</b>	19.82	20.50	19.79	23.62	25.11	23.51
<b>58</b>	18.86	20.05	18.89	22.90	25.21	22.79
<b>59</b>	19.33	19.83	19.36	22.87	23.88	22.76
<b>60</b>	18.14	19.43	18.41	21.88	23.80	22.40
<b>61</b>	18.69	19.13	18.66	22.47	22.89	22.38
<b>62</b>	17.98	18.75	18.02	21.84	22.81	21.95
<b>63</b>	22.75	24.75	22.78	25.68	30.07	25.57
<b>64</b>	23.10	25.31	23.08	25.80	30.81	25.73
<b>65</b>	23.40	25.97	23.40	26.19	31.61	26.30
<b>66</b>	24.02	26.54	24.01	26.60	32.05	26.63
<b>67</b>	24.49	27.13	24.53	26.91	32.59	27.02
<b>68</b>	24.89	27.63	24.85	27.11	33.09	27.00
<b>69</b>	21.39	24.16	21.36	21.43	29.87	21.53
<b>70</b>	19.91	22.03	19.94	20.73	27.17	21.14
<b>71</b>	20.16	22.03	20.19	22.20	27.17	22.09
<b>72</b>	17.72	19.03	17.75	20.53	23.38	20.64

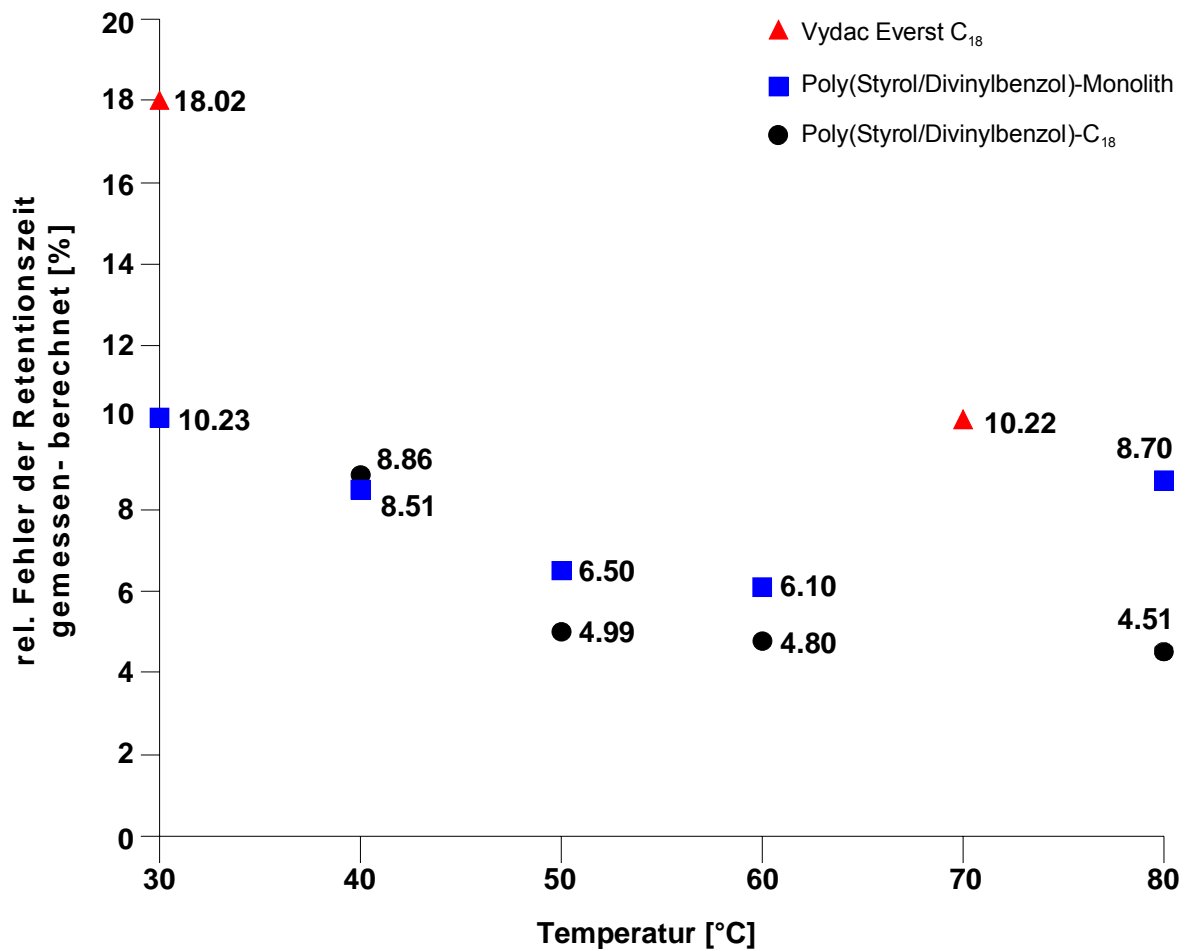
**Tabelle 3.18.** Qualität der Vorhersage mittels SVM-Modell unter der Verwendung unterschiedlicher Feature-Vektoren. Tabelle beinhaltet die Daten für verschiedene Temperaturen und stationären Phasen (M=PS/DVB-Monolith, K=PS/DVB-C<sub>18</sub>-Säule, S=Vydac Everest C<sub>18</sub>).

Modell	S	M	M	K	M	K	M	K	S	M	K
	30	30	40	40	50	50	60	60	70	80	80
contact	0.95	0.93	0.89	0.93	0.89	0.93	0.95	0.95	0.95	0.97	0.97
count	0.77	0.58	0.62	0.66	0.76	0.81	0.92	0.94	0.97	0.99	0.98
count_contact	0.95	0.93	0.89	0.92	0.86	0.93	0.95	0.96	0.97	0.98	0.98
count_contact_multistruct	0.98	0.97	0.96	0.97	0.93	0.94	0.96	0.96	0.95	0.97	0.98
count_multistruct	0.92	0.95	0.98	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96	0.97	0.97	0.97
conut_multistruct_stacking	0.94	0.96	0.98	0.98	0.96	0.97	0.96	0.97	0.98	0.98	0.99
count_multitwo	0.92	0.94	0.97	0.97	0.96	0.97	0.96	0.96	0.98	0.98	0.98
conut_multitwo_stacking	0.93	0.95	0.98	0.98	0.96	0.97	0.96	0.97	0.98	0.99	0.99
count_paired	0.92	0.95	0.95	0.95	0.96	0.96	0.96	0.97	0.97	0.98	0.98
count_paired_stacking	0.95	0.96	0.94	0.96	0.96	0.96	0.96	0.97	0.98	0.99	0.99
count_scontact	0.96	0.90	0.87	0.91	0.84	0.92	0.96	0.97	0.98	0.99	0.99
count_scontact_multistruct	0.97	0.98	0.98	0.97	0.95	0.94	0.97	0.96	0.96	0.98	0.99
count_structure	0.92	0.92	0.92	0.96	0.96	0.95	0.96	0.96	0.96	0.98	0.98
count_structure_stacking	0.93	0.92	0.91	0.96	0.96	0.95	0.96	0.96	0.96	0.98	0.99
paired_unpaired	0.92	0.94	0.95	0.94	0.95	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96	0.97
paired_unpaired_stacking	0.95	0.95	0.95	0.97	0.96	0.96	0.96	0.97	0.98	0.98	0.99
scontact	0.96	0.91	0.90	0.92	0.90	0.92	0.95	0.95	0.95	0.98	0.98
scontact_multistruct	0.97	0.97	0.97	0.97	0.95	0.94	0.96	0.95	0.92	0.96	0.98
scontact_multistruct_stacking	0.98	0.97	0.97	0.97	0.95	0.95	0.95	0.95	0.93	0.96	0.98
scontact_multitwo_stacking	0.97	0.96	0.97	0.96	0.95	0.95	0.95	0.95	0.93	0.96	0.98
scontact_paired	0.95	0.94	0.94	0.92	0.93	0.92	0.96	0.96	0.95	0.97	0.98
scontact_paired_stacking	0.96	0.93	0.95	0.93	0.94	0.92	0.96	0.96	0.95	0.97	0.98
scontact_stacking	0.96	0.91	0.90	0.92	0.89	0.91	0.95	0.95	0.96	0.98	0.98
scontact_structure	0.93	0.93	0.90	0.89	0.93	0.92	0.97	0.96	0.96	0.98	0.98
scontact_structure_stacking	0.95	0.93	0.91	0.92	0.94	0.94	0.97	0.97	0.97	0.98	0.99
structure_stacing	0.93	0.94	0.92	0.95	0.96	0.96	0.96	0.96	0.97	0.98	0.99

**Tabelle 3.19.** Qualität der Vorhersage eines kombinierten SVM-Temperatur-Modells unter der Verwendung unterschiedlicher Feature-Vektoren. Tabelle beinhaltet die Daten für verschiedene Temperaturen und stationären Phasen (M=PS/DVB-Monolith, K=PS/DVB-C<sub>18</sub>-Säule, S=Vydac Everest C<sub>18</sub>).

Modell	PS/DVB-M.	Silikasäule	PS-PS/DVB-C <sub>18</sub>
contact	0.93	0.97	0.96
count	0.87	0.95	0.93
count_contact	0.93	0.98	0.96
count_contact_multistruct	0.95	0.98	0.97
count_multistruct	0.95	0.98	0.97
conut_multistruct_stacking	0.95	0.98	0.97
count_multitwo	0.93	0.97	0.96
conut_multitwo_stacking	0.94	0.97	0.97
count_paired	0.94	0.97	0.96
count_paired_stacking	0.94	0.98	0.96
count_scontact	0.92	0.98	0.96
count_scontact_multistruct	0.95	0.98	0.97
count_structure	0.93	0.96	0.95
count_structure_stacking	0.93	0.97	0.96
paired_unpaired	0.93	0.97	0.96
paired_unpaired_stacking	0.93	0.98	0.96
scontact	0.93	0.98	0.96
scontact_multistruct	0.96	0.98	0.97
scontact_multistruct_stacking	0.95	0.98	0.97
scontact_multitwo_stacking	0.94	0.98	0.97
scontact_paired	0.94	0.97	0.96
scontact_paired_stacking	0.93	0.98	0.97
scontact_stacking	0.93	0.98	0.97
scontact_structure	0.93	0.97	0.96
scontact_structure_stacking	0.93	0.97	0.96
structure_stacking	0.92	0.97	0.96

## II. Abbildungen



**Abbildung 3.44.** Durchschnittlicher relativer Fehler der experimentell bestimmten und berechneten (unkorrigierten) Retentionszeiten für 72 Oligonukleotide auf verschiedenen stationären Phasen.