

# **Entwicklung stationärer Phasen für die Kationenaustauschchromatographie: Funktionalisierung, Charakterisierung, Anwendung**

**Kumulative Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**M.Sc. Matthias Schmitt**  
aus Hadamar

Marburg 2023

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2020 bis Dezember 2023 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Seubert am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am 19.01.2024

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Andreas Seubert

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Gottfried

Tag der Disputation: 05.02.2024

# Danksagung

# Kurzzusammenfassung

## Entwicklung stationärer Phasen für die Kationenaustauschchromatographie: Funktionalisierung, Charakterisierung, Anwendung

Stichworte: Stationäre Phase, Kationenaustauscher, Retentionsmechanismus, Massenspektrometrie, Partikelanalyse

Eine Reihe strukturell ähnlicher Kationenaustauscher mit einem variablen Verhältnis von stark zu schwach sauren Austauschergruppen wird durch die Anwendung von modularen Kleinmolekülreaktionen auf Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymerpartikeln erhalten. Es werden drei Reihen an Materialien mit unterschiedlicher Konzentration an Carbonsäuregruppen hergestellt, die zusätzlich jeweils mehrere unterschiedliche Sulfonierungsgrade aufweisen.

Mit Hilfe chromatographischer Tests und materialchemischer Charakterisierung wird ein gemischter Retentionsmechanismus bestehend aus Kationenaustausch und Verteilung gezeigt. Anhand der hergestellten Materialbibliothek wird der jeweilige Einfluss der beiden Austauschergruppen auf die Wechselwirkung mit einer großen Bandbreite von Modellanalyten untersucht. Eine neue Methode der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie im Einzelpartikel-Modus wird entwickelt, um die polymerbasierten Mikropartikel auf Einzelpartikelebene anhand ihrer funktionellen Gruppen auf Homogenität und Funktionalisierungsgrad zu untersuchen.

Die vorgestellte Säulenchemie wird für die Trennung der 20 kanonischen Aminosäuren optimiert und die Stabilität der stationären Phase in unterschiedlichen mobilen Phasen untersucht. Die robuste Trennsäule ermöglicht eine direkte Kopplung mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie und die Quantifizierung von Aminosäuren in komplexen Realproben.

# Abstract

## **Development of cation-exchange stationary phases: functionalization, characterization, application**

Keywords: stationary phase, cation-exchanger, retention mechanism, mass spectrometry, particle analysis

A series of structurally similar cation-exchangers comprising an adjustable ratio of strongly and weakly acidic cation-exchange sites is developed by applying modular small-molecule reactions to a polymeric substrate. Based on polystyrene-divinylbenzene particles, a material set with three different degrees of carboxylation and multiple degrees of sulfonation is prepared.

Mixed-mode retention properties of the column are demonstrated using chromatographic tests and material characterization. The influence of the different functional groups on ion-exchange and partitioning is demonstrated using the available column library. A single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry method is developed to characterize the homogeneity and the degree of functionalization.

The column chemistry is optimized for the separation of 20 canonical amino acids and tested for stability in different mobile phases. The robust column enables the direct coupling with electrospray ionization mass spectrometry and the quantitation of amino acids in complex sample matrices.

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Analytion
<i>a</i>	Abstand zwischen Mittelsenkrechter und Peakfront
AB	Alkylbenzol
Ala	Alanin
AQC	6-Aminochinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidylcarbammat
Arg	Arginin
As	Asymmetriefaktor
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
$\alpha$	Selektivitätsfaktor
<i>b</i>	Abstand zwischen Mittelsenkrechter und Peakende
CEX	Kationenaustauschchromatographie ( <i>engl.</i> cation-exchange chromatography)
cps	counts per second
cts	<i>engl.</i> counts
Cys	Cystein
<i>D</i>	Verteilungskoeffizient
E	Elution
EPA	US-Umweltschutzbehörde ( <i>engl.</i> United States Environmental Protection Agency)
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	und andere ( <i>lat.</i> et alia)
Fa.	Firma
FI	Fließinjektion ( <i>engl.</i> flow injection)
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
<i>H</i>	Bodenhöhe
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie ( <i>engl.</i> hydrophilic interaction chromatography)
His	Histidin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie ( <i>engl.</i> high pressure liquid chromatography)
IC	Ionenchromatographie

---

ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
Ile	Isoleucin
IR	Infrarot
$k$	Retentionsfaktor
L	Säulenlänge
Leu	Leucin
$\log P$	logarithmierter Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient
Lys	Lysin
M	Molare Masse
$m/z$	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mAU	<i>engl.</i> Milli Absorbance Unit
MCX	gemischt-funktionale Kationenaustauscher ( <i>engl.</i> mixed-acidic cation-exchanger)
Met	Methionin
MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenselektiver Detektor
$N$	Theoretische Bodenzahl
$n$	Anzahl der Kohlenstoffatome in der Kette
p.a.	pro analysi
PEEK	Polyetheretherketon
Phe	Phenylalanin
$pI$	isoelektrischer Punkt
ppb	<i>engl.</i> parts per billion
ppm	<i>engl.</i> parts per million
Pro	Prolin
PS/DVB	Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymer
$Q$	Kapazität
$R$	Auflösung
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RPLC	Umkehrphasenchromatographie ( <i>engl.</i> reversed-phase liquid chromatography)
RT	Raumtemperatur
SCX	stark saurer Kationenaustauscher ( <i>engl.</i> strongly acidic cation-exchanger)
Ser	Serin
sp	Einzelpartikel ( <i>engl.</i> single-particle)
STED	<i>engl.</i> stimulated emission depletion

$T$	Temperatur
$t_0$	Totzeit
$t_{0,\text{sys}}$	Systemtotzeit
TAA	Trialkylamin
Thr	Threonin
TIC	<i>engl.</i> total ion current chromatogram
$t_R$	Retentionszeit
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
$w$	Basisbreite
$w_{0,5}$	Halbwertsbreite
WCX	schwach saurer Kationenaustauscher ( <i>engl.</i> weakly acidic cation-exchanger)
ZIC	Zwitterionenchromatographie



---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation .....	1
1.1	Konzepte der Aminosäureanalytik .....	2
1.2	Polymerbasierte stationäre Phasen .....	4
1.3	Multifunktionale Kationenaustauscher.....	5
1.4	Aufgabenstellung .....	6
2	Theoretische Grundlagen .....	8
2.1	Chromatographie.....	8
2.1.1	Chromatographische Kenngrößen.....	8
2.1.2	Retentionsmodelle.....	11
2.1.3	Charakterisierung von stationären Phasen .....	15
2.2	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS).....	18
2.2.1	Grundlagen der ICP-MS.....	18
2.2.2	Einzelpartikelanalyse mittels ICP-MS .....	21
3	Kumulativer Teil .....	24
3.1	Gemischt-funktionalisiertes Kationenaustauschmaterial zur Trennung von underivatisierten Aminosäuren .....	25
	Erklärung des Eigenanteils.....	31
3.2	Einflussfaktoren auf das <i>mixed-mode</i> Retentionsverhalten von Kationenaustauschern als stationäre Phasen.....	32
	Erklärung des Eigenanteils.....	37
3.3	Charakterisierung metall-markierter Ionenaustauscher mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie im Einzelpartikelmodus .....	38
	Erklärung des Eigenanteils.....	43
3.4	Eine einfache Methode zur Analyse von Aminosäuren in Bier mittels Ionenchromatographie-Massenspektrometrie .....	44
	Erklärung des Eigenanteils.....	48
4	Zusammenfassung und Ausblick .....	49
5	Literaturverzeichnis.....	54
6	Publikationen und Manuskripte .....	71
7	Wissenschaftlicher Lebenslauf.....	159
8	Erklärung.....	160

# 1 Einleitung und Motivation

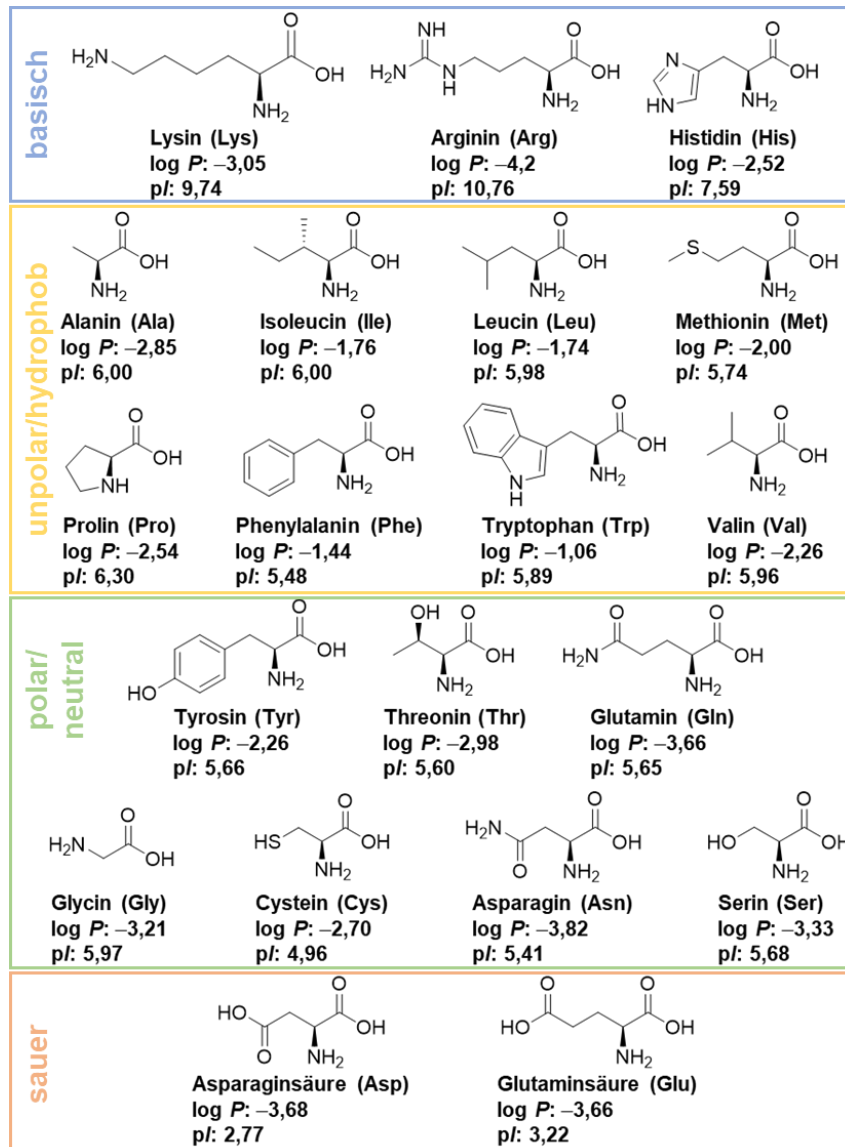
Die Ionenaustauschchromatographie (IC) mit Leitfähigkeitsdetektion ist die dominierende Technik für die Analyse anorganischer Ionen in wässriger Lösung. Ein Schwerpunkt aktueller Forschung liegt dabei auf der Erweiterung des Anwendungsgebiets auf komplexe organische Ionen.<sup>[1-3]</sup> Kationenaustauscher werden im Bereich der Kleinmolekülanalyse vor allem als stationäre Phasen für die Trennung von Metallkationen, Aminen und Ammoniumionen eingesetzt.<sup>[4,5]</sup> Generell sind alle Moleküle mit partiell oder permanent positiv geladenen funktionellen Gruppen dem Trennprinzip des Kationenaustauschs zugänglich. Zur Trennung organischer Kationen mit einer Vielzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen werden allerdings stationäre Phasen mit einer passenden Selektivität sowie Wissen über die vorherrschenden Retentionsmechanismen benötigt. Um den Anwendungsbereich von Kationenaustauschern für Analysen im Spurenbereich und zur Strukturaufklärung zu erweitern, müssen zudem Kopplungstechniken mit empfindlichen massenselektiven Detektoren etabliert werden.

Die Trennung multifunktionaler organischer Moleküle, wie beispielsweise Pestizide oder Metaboliten, sowie deren empfindliche Detektion mittels Massenspektrometrie (MS) ist im Bereich der Umwelt- und Bioanalytik von großem Interesse.<sup>[6-9]</sup> Die zumeist hochpolaren Analyten stellen allerdings eine Herausforderung für gängige Trenntechniken dar. Die etablierte und robuste Umkehrphasenchromatographie (RPLC) ist aufgrund der Hydrophobizität der verwendeten stationären Phase nicht geeignet. Ohne Derivatisierung der Analyten, beispielsweise mit Ionenpaarreagenzien, finden kaum Wechselwirkungen der polaren Verbindungen mit dem Säulenmaterial statt und die Analyten eluieren im oder nahe dem Totvolumen.<sup>[10]</sup> Die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) weist eine geeignete Polarität der stationären Phase auf. Die eingeschränkte Löslichkeit der Analyten in den unpolaren Eluenten sowie die komplexe Methodenentwicklung, geringe Matrixtoleranz und lange Equilibrierungszeiten stellen allerdings große Hürden dar.<sup>[11-13]</sup> Ein alternativer Ansatz sind *mixed-mode* Säulen, die zumeist durch die Modifikation von Silica mit unterschiedlich funktionalen Silanen hergestellt werden. Hierbei sind diskrete Wechselwirkungsstellen mit stark unterschiedlichen Eigenschaften in einem Material vereint. In diesem Aufbau leisten mehrere Wechselwirkungsmechanismen signifikante Beiträge zur Gesamtretention. Durch die Vielzahl an Kombinationsmöglichkeiten können so unterschiedliche Selektivitäten erhalten werden. Herausforderungen liegen dabei in der häufig geringen Reproduzierbarkeit der Messungen und der begrenzten Auswahl kompatibler Eluenten.<sup>[12-18]</sup>

Polymerbasierte Ionenaustauscher sind eine vielversprechende Alternative zur Schließung der „Selektivitätslücke“ zwischen RPLC und HILIC, da sich diese stationären Phasen durch die Kombination aus hydrophobem Substrat, modifizierbarer Oberfläche und zusätzlich geladenen und damit hydratisierten Austauschergruppen auszeichnen. Zugleich weisen organische Polymerpartikel als Startmaterial für eine stationäre Phase eine besonders hohe chemische Stabilität auf. Einige wenige Arbeiten zeigen bereits das Potential von IC-MS Anwendungen.<sup>[6,19]</sup> Die Vorteile der IC als orthogonaler Trennmechanismus zur RPLC und HILIC wurden beispielhaft von WALSBY-TICKLE *et al.* gezeigt. Mittels einer Anionenaustauschchromatographie-Massenspektrometriemethode konnten in einem *non-target* Ansatz neue Stoffwechselwege für Isocitratdehydrogenase-1 in Krebszellen identifiziert werden. Im direkten Vergleich zu einer HILIC-Methode wurden stabilere Retentionszeiten erhalten, die in *non-target* Ansätzen bei komplexen Realproben eine wichtige Größe zur Verifizierung der Massenspektren sind.<sup>[20]</sup> In einem alternativen Ansatz wurde ein Ionenaustauscher seriell mit einer Umkehrphase gekoppelt, um den untersuchbaren Polaritätsbereich von Metaboliten in klinischen Proben zu erweitern.<sup>[21]</sup> NAKATANI *et al.* nutzten einen neu entwickelten Anionenaustauscher, um mittels eines Lösungsmittelgradienten anionische und neutral-polare Verbindungen in einer Multimethode für 400 polare Metaboliten gleichzeitig zu identifizieren.<sup>[22]</sup> Eine breite Anwendung der IC als alternativer Trennmechanismus ist allerdings noch nicht zu beobachten, wobei insbesondere im Bereich der Kationenaustauscher kaum Vorarbeiten existieren.

## 1.1 Konzepte der Aminosäureanalytik

Die kanonischen  $\alpha$ -Aminosäuren sind aufgrund der großen Bandbreite an Eigenschaften ein gutes Beispiel für die Herausforderungen in der Analyse hochpolarer, multifunktionaler Moleküle mittels chromatographischer Techniken. Anhand von Polarität und Ladung werden die 20 kanonischen Aminosäuren als sauer, polar/neutral, unpolar/hydrophob und basisch eingeteilt (Abb. 1). Wesentliche Kriterien für diese Einteilung sind der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (zumeist als  $\log P$  bezeichnet)<sup>[23]</sup> bezogen auf die zwitterionische Form sowie der isoelektrische Punkt ( $pI$ ).<sup>[24]</sup>



**Abbildung 1:** Struktur und Eigenschaften der 20 kanonischen  $\alpha$ -L-Aminosäuren.<sup>[23,24]</sup>

Die Analyse von Standardamino­säuren wird häufig mittels Kationenaustauschchromatographie nach einem von MOORE, SPACKMAN und STEIN entwickelten Prinzip durchgeführt. Dabei werden die Aminosäuren in einer sauren Umgebung auf einem hochkapazitiven Kationenaustauscher immobilisiert und durch schrittweise Erhöhung des pH-Wertes der mobilen Phase anhand ihres isoelektrischen Punktes getrennt. Die Detektion erfolgt photometrisch nach Derivatisierung mit Ninhydrin.<sup>[25–28]</sup> Durch die aufwändige Entwicklung komplexer Gradientenprogramme ist eine Adaption auf Aminosäurederivate, die in der biochemischen Forschung eine Rolle spielen, nur bedingt möglich.<sup>[10,29]</sup> Außerdem verhindert die nicht flüchtige mobile Phase die Kopplung mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).<sup>[30]</sup>

Eine weitere Möglichkeit ist die Trennung mittels RPLC nach Derivatisierung oder dem Zusatz von Ionenpaarreagenzien. Dabei werden die polaren Analyten in unpolare Verbindungen überführt, die eine geeignete und einstellbare Selektivität der RPLC-Trennung ermöglichen.<sup>[31]</sup> Ein häufig verwendetes Derivatisierungsverfahren für die Trennung von Aminosäuren ist die Vorsäulenderivatisierung mit AQC (6-Aminochinoly-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate).<sup>[32]</sup> Neben dem zusätzlichen experimentellen Aufwand ist die Derivatisierung allerdings eine bedeutende Fehlerquelle, da alle Analyten reproduzierbar und möglichst quantitativ in ihre Derivate überführt werden müssen. Die zumeist hohe Konzentration der Derivatisierungsreagenzien sorgt zusätzlich für Matrixeffekte und kann die Ionisierung im Elektrospray beeinflussen, weshalb eine umfangreiche Validierung quantitativer Daten nötig ist.<sup>[33,34]</sup>

Die HILIC-MS mit amid-funktionalisierten oder zwitterionischen stationären Phasen ist eine leistungsstarke Methode zur Analyse underivatisierter Aminosäuren.<sup>[35–37]</sup> Vorteile dieser Methode sind die geeignete Selektivität für saure und polare Aminosäuren, die gute Peakform sowie die Kompatibilität mit der MS-Detektion.<sup>[38–40]</sup> Neben den bereits diskutierten Herausforderungen in Bezug auf die Equilibrierung und Matrixkompatibilität ist die Trennung der Isomere Leucin und Isoleucin kritisch.<sup>[13,41,42]</sup> Dennoch konnte eine Vielzahl leistungsfähiger Methoden zur Aminosäureanalyse beispielsweise für Metaboliten in klinischen Proben entwickelt werden.<sup>[12,42]</sup> Ein weiterer Schwerpunkt der Methodenentwicklungen liegt im Bereich der Lebensmittelanalytik, die aufgrund der zumeist komplexen Probenmatrices einen herausfordernden Anwendungsbereich darstellt.<sup>[11,33,43–49]</sup>

## 1.2 Polymerbasierte stationäre Phasen

Die stationäre Phase ist, wie am Beispiel der Aminosäuretrennung gezeigt, die zentrale Komponente des Chromatographiesystems und bestimmt die Trennbarkeit der Analyten sowie die Geschwindigkeit und Robustheit der Analyse. Eine zentrale Anforderung an die Trennsäule ist dabei die hohe Stabilität in Wasser, unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln und hochkonzentrierten Salzlösungen über einen weiten pH-Bereich.<sup>[50]</sup> Polymerbasierte Materialien erfüllen diese Anforderung durch ihre chemische Inertheit. Partikel auf Basis von Polystyrol/Divinylbenzol (PS/DVB) stellen dabei ein häufig verwendetes Trägermaterial dar.<sup>[51]</sup> Neben der Kompatibilität mit unterschiedlichen mobilen Phasen sorgt eine stabile Säulenchemie für geringes Säulenbluten, das für Kopplungen mit Lichtstreuendetektoren oder empfindlicher MS-Detektion von Bedeutung ist und eine stabilere Basislinie liefert.<sup>[52]</sup> Neben

der Stabilität zeichnen sich polymerbasierte stationäre Phasen durch variable Polaritäten aus, bei denen das zumeist hydrophobe Grundpolymer hydrophobe Wechselwirkungen und die Anreicherung von unpolaren Lösungsmitteln an der Oberfläche ermöglicht. LOSHIN *et al.* zeigten, wie PS/DVB-Partikel direkt für RPLC-Anwendungen verwendet werden können.<sup>[51]</sup> Oberflächenmodifikationen mit polaren Gruppen, Beschichtungen oder Ionenaustauschergruppen ermöglichen analog zu den bereits beschriebenen silicabasierten *mixed-mode* Säulen zusätzliche Interaktionsmechanismen mit multifunktionalen Analyten. Die Kombination aus hydrophobem Substrat und der Vielzahl verfügbarer Funktionalisierungskonzepte ermöglicht so auch die Verwendung polymerbasierter Trennsäulen für HILIC oder *mixed-mode* Anwendungen. FRITZ *et al.* verwendeten stark sulfoniertes PS/DVB zur Trennung von Zuckern in acetonitrilreichen Eluenten und zur Trennung hydrophober aromatischer Verbindungen in wasserreichen Eluenten.<sup>[53,54]</sup> Eine Methode zur Hydrophilisierung von PS/DVB wurde von TRIPP *et al.* entwickelt und zur Optimierung der Selektivität von Bromat und Chlorid angewendet.<sup>[55]</sup> Eine PS/DVB-basierte polyethylenimin-funktionalisierte stationäre Phase von SHEN *et al.* zeigte signifikante Retention für Anionen und ungeladene polare Analyten.<sup>[56]</sup> Der Betrieb eines Anionenaustauschers im Ionenaustausch-, RPLC- und HILIC-Modus wurde erstmals von POPOV *et al.* gezeigt. Durch die Kombination dieser Modi wurde ein breites Spektrum von Verbindungen unter Verwendung unterschiedlicher mobiler Phasen analysiert.<sup>[57]</sup> YANG *et al.* stellten polymerbasierte HILIC-Säulen her, die mit hochverzweigtem Polyglycerin oder Acrylamid modifiziert wurden.<sup>[58,59]</sup> Die Funktionalisierung mit zwitterionischen funktionellen Gruppen erwies sich als weiterer wirksamer Ansatz zur Herstellung polymerbasierter HILIC-Säulen.<sup>[60-62]</sup> Eine systematische Untersuchung von strukturellen Einflussgrößen auf solche gemischten Retentionsmechanismen steht allerdings noch aus. Für polymerbasierte Kationenaustauscher wurde außerdem das Vorhandensein und die gezielte Nutzung der erwarteten multimodalen Eigenschaften noch nicht gezeigt.

### 1.3 Multifunktionale Kationenaustauscher

Kationenaustauscher werden anhand ihrer funktionellen Gruppen in stark (*engl.* strongly acidic cation-exchanger, SCX) und schwach saure (*engl.* weakly acidic cation-exchanger, WCX) Kationenaustauscher eingeteilt. Hierbei ist der Einfluss der Austauschergruppen auf die Trennung von Alkali- und Erdalkalimetallkationen gut untersucht. Sulfonierte Materialien zeigen eine hohe Auflösung ähnlich geladener Verbindungen, während carboxylierte stationäre

Phasen die Analyse von Kationen mit großen Ladungsunterschieden innerhalb eines chromatographischen Laufs ermöglichen.<sup>[63,64]</sup>

Die Kombination beider Austauschertypen ist ein wenig untersuchter Ansatz, von dem allerdings neue Trenneigenschaften erwartet werden. In einigen wissenschaftlichen Arbeiten wird die Mischung unterschiedlicher Austauscherguppen als Nebenprodukt neu entwickelter Funktionalisierungsstrategien beschrieben.<sup>[65–67]</sup> Im Bereich kommerziell verfügbarer stationärer Phasen wurden von der DIONEX CORPORATION zwei Materialien entwickelt, die Carbon- und Phosphonsäuregruppen enthalten (IonPac CS12A) oder zusätzlich dazu Sulfonsäuregruppen aufweisen (IonPac CS20).<sup>[68,69]</sup> Der breite  $pK_s$ -Bereich dieser Austauscher wurde für die Trennung von Aminen mit unterschiedlichen organischen Substituenten und Ladungen sowie von anorganischen Kationen genutzt.<sup>[70]</sup> Eine Variation des Anteils der funktionellen Gruppen wurde in der entsprechenden Patentliteratur untersucht und als Schlüsselfaktor für die Beeinflussung der Retention zwischen verschiedenen Gruppen von Analyten ermittelt. Details zu Materialeigenschaften und Herstellungsprozessen sind bei diesen Industrieforschungsarbeiten allerdings nur eingeschränkt verfügbar.<sup>[71,72]</sup>

Die Unterschiede im Ionenaustauschverhalten der Austauscherguppen werden durch unterschiedliche chemische Eigenschaften wie Dissoziationsgrad, Ladungsdichte, Polarisierbarkeit und Hydratisierung beeinflusst.<sup>[1,73–75]</sup> Eine Herausforderung bei der Charakterisierung solcher Wechselwirkungen ist die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Strukturmerkmale sowie deren Abhängigkeit von den Materialeigenschaften. Daher wurden in mehreren Studien Methoden für die Analyse solcher Wechselwirkungen entwickelt, mit denen jedoch keine systematische Identifizierung und Interpretation von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen möglich war. Ein häufiger Grund dafür ist die Verwendung komplexer Funktionalisierungsmethoden, mit denen keine systematische Variation der Materialeigenschaften möglich ist.<sup>[76–79]</sup>

## 1.4 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss unterschiedlicher Kationenaustauscherguppen auf die Trennung multifunktionaler Analyten untersucht. Dazu wird ein modulares System zur Herstellung von Kationenaustauschern entwickelt, mit dem Carbon- und Sulfonsäuregruppen in variabler Menge kovalent an das Polymer-Grundmaterial gebunden werden können. Zum Verständnis des Aufbauprinzips werden verschiedene Charakterisierungsmethoden für Kationenaustauscher entwickelt und angewendet. Die

hergestellte Serie von stationären Phasen wird auf ihre Wechselwirkung mit Modellsubstanzen hin untersucht. Die Beiträge unterschiedlicher Retentionsmechanismen werden identifiziert und deren relative Stärke zueinander bewertet. Zur Einordnung der erhaltenen Ergebnisse werden diese Tests auch mit kommerziell erhältlichen Trennsäulen durchgeführt, um den Bereich der in dieser Studie untersuchten Materialeigenschaften zu erweitern und Möglichkeiten zur Verwendung bestehender Säulenchemien für multimodale Anwendungen zu testen. Neben chromatographischen Tests werden materialchemische Untersuchungen genutzt, um die räumliche Verteilung der Austauscherguppen im Partikel zu beschreiben. Zusätzlich wird eine elementanalytische Methode auf Einzelpartikelebene entwickelt, um direkte Informationen zur Funktionalisierung einzelner Partikel und der Homogenität unterschiedlicher Materialien zu erhalten.

Durch die Charakterisierung mit unabhängigen Methoden und die Verknüpfung mit bekannten Details zur Materialfunktionalisierung soll das Potential von Kationenaustauschern als stationäre Phasen für komplexe Anwendungen bewertet und ein besseres Verständnis der relevanten Einflussgrößen erarbeitet werden. Abschließend wird die Kombination aus modularem Säulendesign und der Kenntnis von Struktur-Eigenschafts-Beziehungen für die Lösung aktueller Trennprobleme angewandt. Die Vorteile des systematischen Säulendesigns und die Möglichkeit zur Kopplung mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie werden dazu an der Beispielapplikation der Aminosäureanalyse getestet, für die eine optimierte Säule hergestellt wird.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Chromatographie

Der Begriff Chromatographie bezeichnet ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, mit dem Substanzgemische durch wiederholte Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase getrennt werden. Eine Trennung erfolgt für Substanzen mit unterschiedlicher Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase, indem die mobile Phase gegen die stationäre Phase verschoben wird.<sup>[80]</sup>

Eine weitere Einteilung chromatographischer Techniken erfolgt anhand des Aggregatzustandes der mobilen und stationären Phase, wobei die Gas- und Flüssigchromatographie die verbreitetsten Techniken darstellen. Außerdem können die vorhandenen Methoden nach dem dominierenden Interaktionsmechanismus unterteilt werden. Beispiele dafür sind Trennungen basierend auf Adsorption, Verteilung, Größenausschluss, Ionenaustausch oder Ionenausschluss.<sup>[81]</sup>

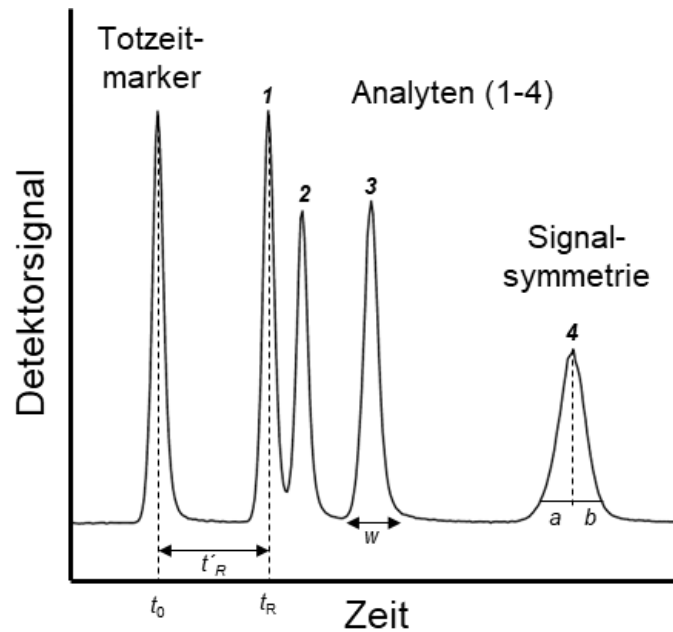
Die Verteilung von Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase wird für jede Komponente durch den Verteilungskoeffizienten  $D_A$  beschrieben (Gleichung 1). Dieser beschreibt zu einem Zeitpunkt das Konzentrationsverhältnis eines betrachteten Analyten zwischen stationärer  $c_S$  und mobiler Phase  $c_M$ . Für die Trennung zweier Komponenten ist damit unter anderem ein hinreichend unterschiedlicher Verteilungskoeffizient notwendig.<sup>[82]</sup>

$$D_A = \frac{c_S}{c_M} \quad (1)$$

Für analytische Anwendungen ist die Säulenchromatographie die dominante Ausführungsform. Dabei wird die zu untersuchende Probe auf die Säule aufgetragen und die mobile Phase kontinuierlich nachgeliefert. Zugleich wird am Ende der Trennsäule das Detektorsignal aufgenommen und die Analyten werden nach dem Verlassen der Trennstrecke als Elutionschromatogramm detektiert.

#### 2.1.1 Chromatographische Kenngrößen

Ein Chromatogramm stellt eine Auftragung des Detektorsignals gegen die Zeit dar. Abbildung 2 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm und zentrale Kenngrößen, die zur numerischen Beschreibung genutzt werden können.<sup>[81]</sup>



**Abbildung 2:** Beispielchromatogramm mit relevanten Kenngrößen.

Als Nettoretentionszeit  $t'_R$  wird die Verweilzeit eines Analyten in der stationären Phase beschreiben. Dazu wird die Zeit zwischen der Injektion der Probe und der Detektion (Bruttoretentionszeit  $t_R$ ) um die Totzeit  $t_0$  bereinigt (Gleichung 2). Die Totzeit ist als Verweilzeit einer Komponente im Messsystem ohne Wechselwirkung mit der stationären Phase definiert. Zum Vergleich verschiedener Trennsäulen wird nur die Zeit einer solchen Komponente im Säulenkörper  $t_{0,\text{Säule}}$  verwendet, weshalb eine Korrektur um die Durchflusszeit durch Systemkomponenten  $t_{0,\text{System}}$  durchgeführt werden muss.<sup>[80,81]</sup>

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (2)$$

Die dimensionslose Größe des Retentionsfaktors  $k$  ermöglicht einen Methodenvergleich unabhängig von experimentellen Bedingungen wie dem verwendeten chromatographischen System und der Säulendimension (Gleichung 3). Der Retentionsfaktor beschreibt die Verweildauer in der stationären Phase relativ zur Verweildauer in der mobilen Phase und wird als das Produkt von Phasenverhältnis  $\Phi$  und Verteilungskoeffizient  $D$  definiert.<sup>[81]</sup>

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = D \cdot \Phi = D \cdot \frac{V_S}{V_M} \quad (3)$$

Der Selektivitätsfaktor  $\alpha$  ist ein Maß für die relative Lage zweier Peakschwerpunkte zueinander. Dieser relative Trennfaktor wird über das Verhältnis der Retentionsfaktoren zweier Analyten beschrieben und repräsentiert Unterschiede im Verteilungskoeffizienten der Komponenten (Gleichung 4).<sup>[81]</sup>

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{mit } k_2 > k_1 \quad (4)$$

Die Auflösung  $R$  beschreibt die Güte der Trennung zweier benachbarter Peaks (Gleichung 5). Dazu werden im Gegensatz zum Selektivitätsfaktor die Basisbreiten  $w$  der Peaks berücksichtigt.<sup>[81]</sup>

$$R = \frac{\Delta t_R}{0,5 \cdot (w_1 + w_2)} \quad (5)$$

In der Chromatographie auftretende Peaks haben aufgrund der lateralen Equilibrierung innerhalb der Trennsäule idealerweise den Verlauf einer GAUß-Funktion, die eine Beschreibung mittels Vielfachen der Standardabweichung ermöglicht. Da allerdings häufig keine ideale Normalverteilung um den Peaksschwerpunkt erhalten wird, kann die Symmetrie von Signalen mit Hilfe des Asymmetriefaktors  $As$  beschrieben werden. Dabei wird das Verhältnis der rechts- zu linksseitigen Peakbreite bei zehnpromzentiger Höhe ermittelt (Gleichung 6). Bei  $As > 1$  wird von Tailing, bei  $As < 1$  von Fronting gesprochen.<sup>[81]</sup>

$$As = \frac{b}{a} \quad (6)$$

Die Effizienz ist ein wesentlicher Parameter zur Beurteilung von chromatographischen Prozessen, wobei eine geringe Peakverbreiterung Grundlage für die Trennung möglichst vieler Spezies in kurzer Zeit ist. MARTIN und SYNGE übertrugen dabei 1941 das Konzept der Glockenböden von fraktionierten Destillationskolonnen auf die Chromatographie.<sup>[83]</sup> Die Trennsäule wird dabei als Reihung theoretischer Böden aufgefasst, an denen eine spontane Gleichgewichtseinstellung des Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase stattfindet. Dabei entspricht die theoretische Bodenhöhe  $H$  dem Quotienten aus Säulenlänge  $L$  und der Anzahl theoretischer Böden  $N$  (Gleichung 7).

$$H = \frac{L}{N} \quad (7)$$

Die theoretische Bodenzahl normiert auf eine Säulenlänge von einem Meter wird in der Chromatographie als Maß für die Effizienz einer Trennung verwendet. Sie kann nach Gleichung 8 direkt aus chromatographischen Daten ermittelt werden.

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (8)$$

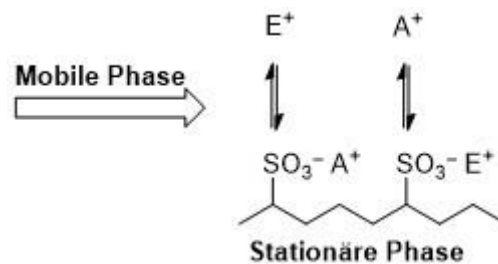
## 2.1.2 Retentionsmodelle

Eine wesentliche Eigenschaft chromatographischer Methoden ist ihr mittelnder Charakter. Zentrale Informationsgrößen wie die Retention spiegeln dabei die Summe aller Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase im jeweiligen Eluenten wider. Zum Verständnis chromatographischer Prozesse und zur Entwicklung neuer Methoden sind daher Modelle zur Beschreibung und Vorhersage der Retention in Abhängigkeit der Messparameter notwendig.

### Kationenaustausch

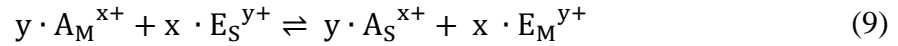
In der Ionenaustauschchromatographie erfolgt die Trennung der Analyten aufgrund von stöchiometrisch ablaufenden chemischen Reaktionen zwischen Ionen in Lösung und den an einer Oberfläche fixierten ionischen funktionellen Gruppen (Abb. 3). Dabei dominieren elektrostatische COULOMB-Wechselwirkungen wegen ihrer Stärke und Reichweite. Entscheidend für die Retention ist dabei die effektive Ladung von Analyt und Austauschergruppe, die durch die Hydrathülle der Ionen in wässriger Umgebung beeinflusst wird.<sup>[84,85]</sup>

Zur Trennung von Kationen weist die stationäre Phase eine negative Ladung auf, wozu zumeist Carbonsäuren und Sulfonsäuren als funktionelle Gruppen der stationären Phase verwendet werden. Die Austauschreaktion ist eine Konkurrenzreaktion zwischen Analytionen  $A^+$  und Elutionen  $E^+$  zur aus Elektroneutralitätsgründen stets besetzten stationären Phase.<sup>[85,86]</sup>



**Abbildung 3:** Darstellung des Kationenaustauschprozesses in der Ionenchromatographie,  $A^+$  Analytkation,  $E^+$  Eluentkation.

Zur Erklärung der Trennung verschiedener Analyten kann basierend auf der Gleichgewichtskonstante  $K_{A,E}$  der in Gleichung 9 gezeigten Reaktionsgleichung für den Austausch zwischen mobiler und stationärer Phase das Retentionsmodell hergeleitet werden.<sup>[87]</sup>



$A_{M/S}$  : Analytkation in mobiler/stationärer Phase

$E_{M/S}$  : Eluentkation in mobiler/stationärer Phase

$x, y$  : Ladung

Neben der Ladung von Analytation und Elution hängt der Retentionsfaktor von der Austauscherkapazität  $Q$  der stationären Phase, dem Phasen-Volumenverhältnis  $\Phi$  und in vereinfachter Betrachtung der Konzentration der Elutionen  $[E_M^{y+}]$  ab (Gleichung 10).

$$\log k_A = \frac{1}{y} \log K_{A,E} + \frac{x}{y} \log \frac{Q}{y} + \log \Phi - \frac{x}{y} \log [E_M^{y+}] \quad \text{mit } \Phi = \frac{V_S}{V_M} \quad (10)$$

Werden die trennsäulenspezifischen Parameter  $Q$ ,  $K_{A,E}$  und  $\Phi$  in Gleichung 10 konstant gehalten, so ergibt sich vereinfacht Gleichung 11. Diese kann zur Optimierung der Trennung auf einer bestimmten Säule verwendet werden.<sup>[85]</sup> Durch Auftragung von  $\log k_A$  gegen  $\log [E_M^{y+}]$  unter Verwendung monokationischer Eluenten (z.B. Salpetersäure,  $\text{HNO}_3$ ) kann die effektive Ladung der Analytionen aus der Steigung der Geraden bestimmt werden. Die Abweichung des erhaltenen Wertes von der erwarteten Steigung kann Rückschlüsse auf sekundäre Wechselwirkungen ermöglichen.<sup>[64,87,88]</sup>

$$\log k_A = C - \frac{x}{+1} \log [E_M^{y+}] \quad (11)$$

## Umkehrphasenchromatographie

Die Umkehrphasenchromatographie (*engl.* reversed-phase liquid chromatography, RPLC) ist die verbreitetste Variante der Flüssigchromatographie. Die Wechselwirkung der unpolaren Analyten mit der stationären Phase beruht dabei einerseits auf der Adsorption an der unpolaren stationären Phase. Andererseits findet eine Verteilung der Analyten zwischen der mobilen Phase und der an der Oberfläche der stationären Phase angereicherten unpolaren Komponente des Eluenten statt.<sup>[89,90]</sup>

Als stationäre Phase werden zumeist Silicapartikel verwendet, die mit Alkylketten (häufig *n*-Octadecyl (C18) oder *n*-Octyl (C8)) funktionalisiert sind. Dabei ist eine Vielzahl von Materialien erhältlich, die sich in Partikelgröße, Porenstruktur, Stabilität und

Oberflächenbeladung unterscheiden.<sup>[91]</sup> Es existieren auch hydrophobe Polymerpartikel beispielsweise PS/DVB, die direkt als Packungsmaterial für die RPLC verwendet werden. Hierbei dominiert die Adsorption der Analyten durch die ausgeprägten  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit dem aromatischen System.<sup>[92]</sup>

Als mobile Phase werden zumeist Gemische von Wasser und einer organischen Komponente verwendet, wobei durch einen hohen Wasseranteil ein Polaritätsunterschied zwischen mobiler und stationärer Phase besteht, der für die Trennung der Analyten mittels Verteilung genutzt wird.<sup>[89]</sup>

Zur Beschreibung der Abhängigkeit der Retention vom organischen Anteil im Eluenten wurden verschiedene empirische Zusammenhänge ermittelt. Besonders verbreitet ist das linear exponentielle Modell nach SCHOENMAKERS für den Bereich geringer Organikanteile, in dem ein linearer Zusammenhang von logarithmiertem Retentionsfaktor und organischem Modifier  $\varphi$  im Eluenten besteht (Gleichung 12). Die Retention einer Verbindung bei einer bestimmten Eluentzusammensetzung wird dabei aus dem Retentionsfaktor der Komponente bei 100 % Wasseranteil  $\log k_w$  im Eluenten ermittelt. Dieser Wert wird um die Steigung  $S$  als Maß für die Empfindlichkeit der Retention gegenüber der Eluentzusammensetzung korrigiert. Mit Hilfe dieses Modells können auch Unterschiede zwischen verschiedenen stationären Phasen identifiziert werden.<sup>[93]</sup>

$$\log k = \log k_w - S \cdot \varphi \quad (12)$$

### Hydrophile Interaktionschromatographie

Die hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) wurde von ALPERT als Technik zur Analyse von polaren Verbindungen etabliert, wobei es sich bei der HILIC mechanistisch um eine Form der Verteilungschromatographie handelt.<sup>[94,95]</sup> Die Verteilung der Analyten findet zwischen einer wasserreichen Schicht auf der Oberfläche der stationären Phase und der mobilen Phase statt.<sup>[96]</sup> Die erhaltene Selektivität im HILIC-Modus weist eine hohe Orthogonalität zu Umkehrphasenmethoden auf, da die polare Eluentkomponente an der Oberfläche der stationären Phase angereichert wird. Daher eignet sich die HILIC besonders gut zur Trennung von hochpolaren Verbindungen, die mittels RPLC kaum retardiert werden.<sup>[97,98]</sup>

Die mobile Phase weist einen hohen Anteil (zumeist größer als 60 %) eines aprotischen Lösungsmittels auf, was die Ausbildung der wasserreichen Schicht auf der stationären Phase begünstigt. Um den Ladungszustand der Analytmoleküle und teilweise auch der stationären Phase konstant zu halten, wird der mobilen Phase ein Puffer zugesetzt. Bei Verwendung von

flüchtigen Puffern eignen sich solche mobilen Phasen sehr gut zur direkten Kopplung der HILIC mit MS-Detektion.<sup>[95,98]</sup> Die verwendeten stationären Phasen zeichnen sich durch polare funktionelle Gruppen aus, die die Anlagerung der Wasserschicht auf der Oberfläche ermöglichen. Häufig verwendete Funktionalisierungen sind Modifizierungen der Partikel mit Diolen, Amiden, aber auch zwitterionischen Bausteinen. Neben der Verwendung von Silica als Trägermaterial wurden auch polymerbasierte Trennsäulen entwickelt.<sup>[99–101]</sup>

Neben der beschriebenen Verteilung tragen weitere Mechanismen zur Retention im HILIC-Modus bei, deren Identifizierung ein Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten ist. Die Auftragung des Retentionsfaktors gegen den organischen Anteil im Eluenten führt bei Betrachtung eines großen Konzentrationsbereichs (typischerweise 10 bis 90 % organischer Anteil) häufig zu einem U-förmigen Verlauf. Hierbei zeigt sich, dass bei typischen HILIC-Materialien je nach Polarität des Eluenten hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase oder die Verteilung in der immobilisierten Wasserschicht dominiert.<sup>[97]</sup> Außerdem konnten in weiteren Arbeiten Beiträge durch elektrostatische Wechselwirkungen, Oberflächenadsorption, Wasserstoffbrücken und Dipolwechselwirkungen gezeigt werden, wodurch die exakte quantitative Beschreibung des Wechselwirkungsmechanismus für eine spezifische Kombination aus Trennsäule und Analyt eine Herausforderung darstellt.<sup>[95,97,102]</sup>

Allerdings weist die HILIC im Vergleich zur RPLC eine geringere Robustheit auf, da die quasi-stationäre Wasserschicht auf der polaren Materialoberfläche aufgrund der starken Wasserstoffbrückenbindungen im Vergleich zu einer adsorbierten organischen Schicht dünn und starr ist.<sup>[103]</sup> Dadurch kommt es zu einem starken Einfluss der Probenmatrix, die sich auf die stationäre Wasserschicht auswirkt und für eine geringere Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten sorgt.<sup>[95]</sup> Eine weitere Auswirkung ist die im Vergleich zur Umkehrphasenchromatographie lange Equilibrierungszeit.<sup>[15]</sup> Durch den zumeist stark unpolaren Eluenten ist zusätzlich die Löslichkeit der Analyten in der mobilen Phase ein kritischer Aspekt.<sup>[12]</sup>

Aufgrund des multimodalen Retentionsmechanismus sowie der Vielzahl und Komplexität verfügbarer Säulenchemien hat sich die Charakterisierung und Klassifizierung von HILIC-Säulen und Wechselwirkungen durch Modellanalyten unter definierten Bedingungen als Methode der Wahl etabliert.<sup>[104]</sup>

### 2.1.3 Charakterisierung von stationären Phasen

#### Selektivitätsparameter

Eine Möglichkeit zur Klassifizierung von stationären Phasen und der Identifikation vorherrschender Wechselwirkungsmechanismen ist die Messung von Referenzverbindungen unter standardisierten Bedingungen.<sup>[105–109]</sup> Der verbreitetste Testsatz zur Beschreibung der Polarität von Säulenmaterialien wurde von TANAKA und Mitarbeitern entwickelt, wobei für RPLC-<sup>[110]</sup> und HILIC<sup>[104]</sup>-Bedingungen je ein eigener Test entwickelt wurde. Mit wenigen Injektionen von Testsubstanzen kann auf diese Weise eine Vielzahl an Parametern beschrieben werden. Obwohl beide Tests ursprünglich für klassische RPLC- und HILIC-Phasen entwickelt wurden, konnte eine Eignung für multimodale Trennungen gezeigt werden.<sup>[111,112]</sup>

Trennsäulen für die RPLC werden mit verschiedenen Alkylbenzolen untersucht, wobei aus der absoluten Retention die Menge an Wechselwirkungsstellen und aus dem Selektivitätskoeffizienten von Ethylbenzol zu Butylbenzol die Hydrophobizität bestimmt wird. Zusätzlich wird die sterische Selektivität durch Vergleich des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs Triphenylen und des nicht polyzyklischen *o*-Terphenyl bestimmt. Als weitere Interaktionsmechanismen werden Wasserstoffbrückenbindungen durch Vergleich von Koffein und Phenol sowie der Kationenaustausch durch Vergleich von Benzylamin und Phenol untersucht.<sup>[110]</sup>

Im Fall von HILIC-Trennsäulen ist die Klassifizierung von Trennsäulen aufgrund der zuvor beschriebenen Vielfalt an Säulenmaterialien und beteiligten Mechanismen von besonderer Bedeutung. Daher wurde von KAWACHI *et al.* ein Testprotokoll entwickelt, das die Retention verschiedener Nukleoside, Saccharide, Xanthine sowie der ionischen Verbindungen *p*-Toluolsulfonsäure und Trimethylphenylammoniumchlorid verwendet. Damit wird unter anderem die Hydrophilie, die Selektivität gegenüber einzelnen hydrophilen und hydrophoben funktionellen Gruppen, der Einfluss der Position und Konfiguration hydrophiler Gruppen sowie Ionenaustausch und lokaler pH-Wert der stationären Phase untersucht. Durch diese Parameter können verfügbare Säulen geclustert werden und es kann eine systematische Auswahl erfolgen.<sup>[104]</sup> Tabelle 1 zeigt einen Überblick etablierter Selektivitätsparameter für den RPLC- und HILIC-Modus.



**Tabelle 1:** Chromatographische Tests zur Bestimmung von Selektivitätsparametern. Chromatographische Bedingungen: 20 mM Phosphatpuffer/Methanol (RPLC), 20 mM Ammoniumacetatpuffer/Acetonitril (HILIC).

Parameter	Bestimmung	Mobile Phase	Eigenschaft der stationären Phase
<b>RPLC-Tests</b>			
$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{Tanaka}}$	$\frac{k(\text{Ethylbenzol})}{k(\text{Butylbenzol})}$	80 % Methanol	Hydrophobizität
$\alpha(\text{T/O})$	$\frac{k(\text{Triphenylen})}{k(o\text{-Terphenyl})}$	80 % Methanol	sterische Selektivität
$\alpha(\text{C/P})$	$\frac{k(\text{Koffein})}{k(\text{Phenol})}$	30 % Methanol	Wasserstoffbrückenbindung
$\alpha(\text{A/P})$	$\frac{k(\text{Benzylamin})}{k(\text{Phenol})}$	30 % Methanol, pH 2,7 und 7,6	Kationenaustausch
<b>HILIC-Tests</b>			
$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{Tanaka}}$	$\frac{k(5\text{-Methyluridin})}{k(\text{Uridin})}$	90 % Acetonitril	Selektivität gegenüber einer Methylengruppe
$\alpha(\text{OH})$	$\frac{k(2\text{-Desoxyuridin})}{k(\text{Uridin})}$	90 % Acetonitril	Selektivität gegenüber einer Hydroxylgruppe
$\alpha(\text{V/A})$	$\frac{k(\text{Vidarabin})}{k(\text{Adenosin})}$	90 % Acetonitril	Selektivität gegenüber Konfigurationsisomeren
$\alpha(2\text{dG}/3\text{dG})$	$\frac{k(2\text{-Desoxyguanosin})}{k(3\text{-Desoxyguanosin})}$	90 % Acetonitril	Selektivität gegenüber Regioisomeren
$\alpha(\text{AX})$	$\frac{k(\text{Natrium-}p\text{-toluolsulfonat})}{k(\text{Uridin})}$	90 % Acetonitril	Anionenaustausch
$\alpha(\text{CX})$	$\frac{k(\text{Trimethylphenyl-ammoniumchlorid})}{k(\text{Uridin})}$	90 % Acetonitril	Kationenaustausch
$\alpha(\text{Tb/Tp})$	$\frac{k(\text{Theobromin})}{k(\text{Theophyllin})}$	90 % Acetonitril	pH-Wert der Oberfläche

Ein weiterer Ansatz zur Beschreibung der Hydrophobizität von stationären Phasen nutzt eine homologe Reihe von Modellanalyten mit zunehmender Alkylkettenlänge. Für die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette  $n_C$  wird ein näherungsweise linearer Zusammenhang mit dem logarithmierten Retentionsfaktor erhalten. Dabei nimmt die Retention hydrophober Verbindungen wie beispielsweise der Alkylbenzole mit steigender Kettenlänge zu (Gleichung 13). Die Steigung  $\alpha(\text{CH}_2)$  der Auftragung von  $\log k$  gegen  $n_C$  beschreibt die Empfindlichkeit der stationären Phase gegenüber einer zusätzlichen Methylengruppe im Modellanalyten und wird daher auch als Methylenselektivität bezeichnet.<sup>[78,89,113]</sup>

$$\log k = \log k_{C_0} + \alpha(\text{CH}_2) \cdot n_C \quad (13)$$

Solche homologen Reihen können je nach Beschaffenheit der stationären Phase neben Alkylbenzolen mit weiteren Verbindungen aufgenommen werden. Wird anstelle eines Phenylrests eine ionische Kopfgruppe (z.B. Sulfon- oder Carbonsäure) verwendet, wird Gleichung 13 ab  $n \geq 3$  angewendet, um den Einfluss der Alkylkette auf die Ladung zu minimieren. Die Verwendung der ionischen Modellsubstanzen mit variabler Länge der Kohlenstoffkette ermöglicht zusätzlich die Bestimmung der Methylenselektivitäten für Analyten, die einen multimodalen Retentionsmechanismus aufweisen.<sup>[77,78]</sup> Eine Möglichkeit, zwischen den Beiträgen von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zu unterscheiden, wurde von NESTERENKO eingeführt. Hierbei wird der Anteil rein elektrostatischer Wechselwirkungen durch die Retention eines anorganischen Ions  $k_{\text{Ion}}$  beschrieben und durch die Methylenselektivität geteilt. Der erhaltene *mixed-mode* Faktor (Gleichung 14) beschreibt im Falle von Ionenaustauschern damit den Anteil von sekundären Wechselwirkungen.<sup>[78]</sup>

$$F = \frac{\text{Ionenaustausch}}{\text{Methylenselektivität}} = \frac{k_{\text{Ion}}}{\alpha(\text{CH}_2)} \quad (14)$$

### Überschussadsorptionsisothermen

Zur Untersuchung der Polarität einer stationären Phase kann die Zusammensetzung des adsorbierten Flüssigkeitsfilms auf der Materialoberfläche aus einem binären Lösungsmittelgemisch bestimmt oder simuliert werden.<sup>[114–116]</sup> Die Polarität des Säulenmaterials entscheidet darüber, ob im Vergleich zum Lösungsmittelgemisch ohne Einfluss der Oberfläche ein Überschuss von Wasser oder einem organischen Lösungsmittel vorliegt. Als Maß für die Anreicherung wurden Überschussadsorptionsisothermen (*engl.* excess adsorption isotherms) eingeführt und für eine Vielzahl von Materialien und Lösungsmittelgemischen bestimmt.<sup>[79,117–119]</sup> Die ermittelte Zusammensetzung der adsorbierten Schicht ermöglicht eine Erklärung von Verteilungsmechanismen. Eine unpolare Umkehrphase weist in einer typischen mobilen Phase beispielsweise einen Überschuss von unpolarem organischem Lösungsmittel auf, weshalb unpolare Analyten durch Verteilung in diesem Flüssigkeitsfilm retardiert werden.<sup>[120]</sup>

Eine häufig verwendete experimentelle Methode zur Bestimmung der Überschussadsorptionsisotherme ist die Methode der geringfügigen Störung (*engl.* minor disturbance method). Hierbei wird die Trennsäule mit einem binären Lösungsmittelgemisch

equilibriert und das Gleichgewicht durch Injektion einer der beiden Komponenten in Reinform gestört. Die Lage des Störsignals im erhaltenen Chromatogramm hängt dabei von der Zusammensetzung der mobilen Phase, den verwendeten Lösungsmitteln und den Eigenschaften der stationären Phase ab. Durch systematische Variation des binären Lösungsmittelgemisches von 0 bis 100 % der organischen Komponente kann die Veränderung des Flüssigkeitsfilms auf der stationären Phase beschrieben werden. Die mathematische Auswertung der Überschussadsorption  $\Gamma(c)$ , normiert auf die Oberfläche des Packungsmaterials  $S$ , erfolgt über die Retentionsvolumina  $V_R(c)$  der Störpeaks und das thermodynamische Totvolumen  $V_M$  (Gleichung 15).<sup>[79,121,122]</sup>

$$\Gamma(c) = \frac{\int_0^c (V_R(c) - V_M) dc}{S} \quad (15)$$

Da die Messung der Materialoberfläche  $S$  in der Praxis stark von der angewendeten Methode abhängt und zwischen verschiedenen Aufbauten abweichende absolute Ergebnisse erhalten werden können, hat sich die Normierung auf das Innenvolumen der Trennsäule zur Beschreibung von Chromatographiematerialien etabliert. Zur Bestimmung des thermodynamischen Totvolumens werden die Störsignale über den gesamten verwendeten Messbereich integriert und auf die maximale Konzentration  $c_{\max}$  der zu untersuchenden Komponente normiert (Gleichung 16).<sup>[79]</sup>

$$V_M = \frac{1}{c_{\max}} \int_0^{c_{\max}} V_R(c) dc \quad (16)$$

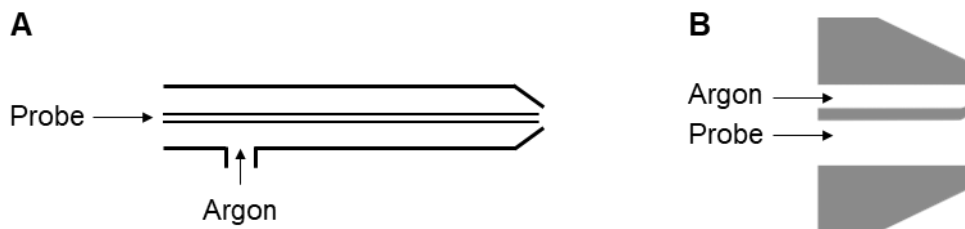
## 2.2 Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)

### 2.2.1 Grundlagen der ICP-MS

Die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) ist eine schnelle und empfindliche Methode in der Elementanalytik. Besonderheiten sind dabei die Multielementfähigkeit, niedrige Nachweisgrenzen für fast alle Elemente des Periodensystems und ein großer dynamischer Bereich von bis zu 10 Zehnerpotenzen. Außerdem zeigt das ICP-MS eine nahezu speziesunabhängige Empfindlichkeit für die untersuchbaren Isotope.<sup>[123,124]</sup>

Die wesentlichen Schritte der Methode sind die Überführung der Probe in ein feines Aerosol, dessen Atomisierung und Ionisierung in einem Argonplasma, sowie die Detektion der Elementkationen mittels Massenspektrometrie.<sup>[125]</sup>

Zur Erzeugung des Probenaaerosols wird häufig ein pneumatischer Zerstäuber verwendet, in dem die Probelösung mit Hilfe des Zerstäubergases (zumeist Argon) in feine Tröpfchen überführt wird. Eine typische Ausführungsform ist der konzentrische Zerstäuber (Abb. 4A), der eine gleichmäßige Tröpfchengrößenverteilung bietet. Allerdings kann dieser Aufbau bei hohen Salzfrachten und Partikeln in der Probe leicht verstopfen, weshalb alternative Geometrien wie der Parallelpfadzestäuber (Abb. 4B) mit zusätzlich vergrößerter Bohrung entwickelt wurden.<sup>[126,127]</sup>

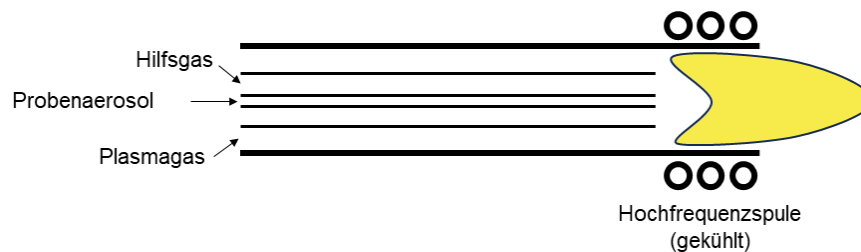


**Abbildung 4:** Aufbau verschiedener Typen von pneumatischen Zerstäubern: (A) konzentrischer Zerstäuber, (B) Parallelpfadzestäuber.<sup>[126,127]</sup>

Zur Entfernung großer Tröpfchen sowie zum Ausgleich geringfügiger Schwankungen der Peristaltikpumpe und des Zerstäubers wird eine Sprühkammer verwendet. Bei der Auswahl einer geeigneten Sprühkammer besteht die Abwägung zwischen hoher Signalstabilität durch eine möglichst homogene Tröpfchengrößenverteilung und dem Anteil der Probe, der ins Plasma gelangt. Ein typischer Anteil der Probe, der als Aerosol ins Plasma gelangt, beträgt dabei für eine SCOTT Sprühkammer etwa 2-10 %.<sup>[127,128]</sup>

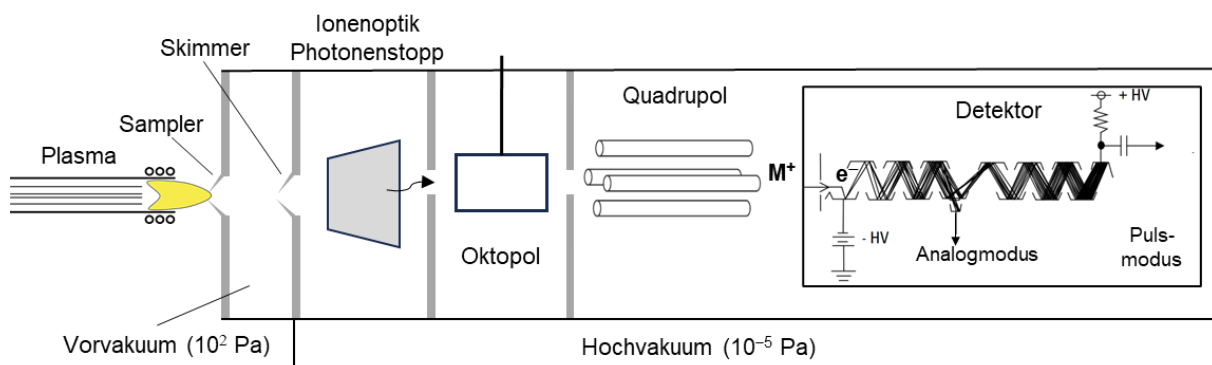
Das Probenaaerosol wird anschließend in der etwa 7500 K heißen Plasmafackel desolvatisiert, atomisiert und ionisiert. Die Ionisierung erfolgt durch Stöße der Analytatomene mit Argonkationen im Plasma. Neben den geringen Kosten zeichnet sich Argon als Plasmagas durch seine Wirkung als Ionisationspuffer aus, da die 1. Ionisierungsenergie von Argon (15,8 eV) zwischen der ersten und zweiten Ionisierungsenergie der meisten Elemente liegt. Damit werden für die meisten Elemente des Periodensystems hauptsächlich einfach geladene Kationen erhalten. Die Empfindlichkeit des ICP-MS gegenüber verschiedenen Elementen wird dabei hauptsächlich durch den Ionisierungsgrad im Plasma bestimmt, der für viele Elemente über 90 % liegt. Einige Elemente wie beispielsweise Arsen und Schwefel weisen allerdings auch deutlich geringere Ionisierungsgrade auf.<sup>[129–131]</sup>

Die Ionisierung erfolgt in der Plasmafackel (Abb. 5). Nach einer initialen Zündung mittels eines Teslafunkens werden die erzeugten Argonkationen und Elektronen über ein eingekoppeltes, elektromagnetisches Wechselfeld beschleunigt. Durch Stoßprozesse entstehen weitere Ladungsträger, wodurch das Plasma in einem quasi-stationären Zustand mit konstanter Temperatur vorliegt. Die Plasmafackel besitzt drei Quarzröhren, in denen jeweils unterschiedliche Argonströme vorliegen. Die Ionisierung des Probenaaerosols erfolgt in der inneren Röhre, wobei ein Gasstrom von typischerweise  $0,5$  bis  $1,5 \text{ L min}^{-1}$  verwendet wird. Das Hilfsgas strömt mit einem Fluss von  $0$  bis  $2 \text{ L min}^{-1}$  durch die mittlere Röhre und sorgt für die Formung des Plasmas. Die äußere Röhre führt das Plasmagas mit einem Fluss von  $7$  bis  $18 \text{ L min}^{-1}$ . Dieses dient der Aufrechterhaltung des Plasmas und der Kühlung der äußeren Quarzwände.<sup>[126]</sup>



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Fackel des ICP-MS.<sup>[126,132]</sup>

Die Elementkationen in der entstandenen Ionenwolke werden über eine Kombination von gekühlten Metalllochblenden vom Atmosphärendruck des Plasmas ins Hochvakuum überführt (Abb. 6). Durch die Ionenoptik wird der Ionenstrahl umgeleitet, wodurch Photonen, Neutralteilchen und Anionen entfernt werden. Der folgende Oktopol kann mit einem Reaktiv- oder Inertgas gefüllt und damit als Reaktions- oder Kollisionszelle betrieben werden, um polyatomare Interferenzen zu entfernen.<sup>[123,132]</sup>



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung von Interface und Hochvakuumbereich des ICP-MS.<sup>[126,132]</sup>

Der am häufigsten verwendete Massenfilter im ICP-MS ist ein Quadrupol. Der Quadrupol besteht aus vier konzentrisch, paarweise gegenüberliegend angeordneten Metallstäben. Durch die Überlagerung von Gleich- und Wechselstromfeld werden die Ionen auf konzentrische Kreisbahnen gezwungen. Für jedes Verhältnis von Gleich- zu Wechselspannung wird nur für einen kleinen Masse-zu-Ladungsbereich der Analyten eine stabile Flugbahn erhalten. Dieser kann durch Stabilitätsdiagramme nach MATHIEU beschrieben werden. Alle anderen Teilchen treffen auf die Metallstäbe, werden neutralisiert und im Hochvakuum entfernt.<sup>[133,134]</sup>

Der resultierende Ionenstrahl wird im Detektor in ein elektronisches Signal umgewandelt. Hierbei treffen die Ionen auf eine primäre Dynode, in der Elektronen herausgeschlagen werden. Diese Elektronen werden in einem Elektronenmultiplier in einer Kaskade von mehreren weiteren Dynoden mit steigendem Potential vervielfacht und zu einem messbaren Impuls verstärkt. Trifft eine hohe Anzahl von Ionen auf den Detektor, wird anstelle einzelner Impulse der Strom als resultierende Messgröße verwendet.<sup>[132,135]</sup>

Durch die weitgehend stabile Zusammensetzung der Ionenwolke ist es möglich, sequenziell verschiedene  $m/z$ -Verhältnisse zu analysieren. Typischerweise wird dabei für jedes untersuchte Isotop eine Integrationszeit des Detektorsignals von 50-100 ms verwendet, was selbst bei einer hohen Anzahl zu untersuchender Elemente zu einer ausreichend hohen Messpunktdichte führt. Diese kann beispielsweise für die Kopplung von chromatographischen Methoden mit ICP-MS als Detektor verwendet werden.<sup>[136]</sup>

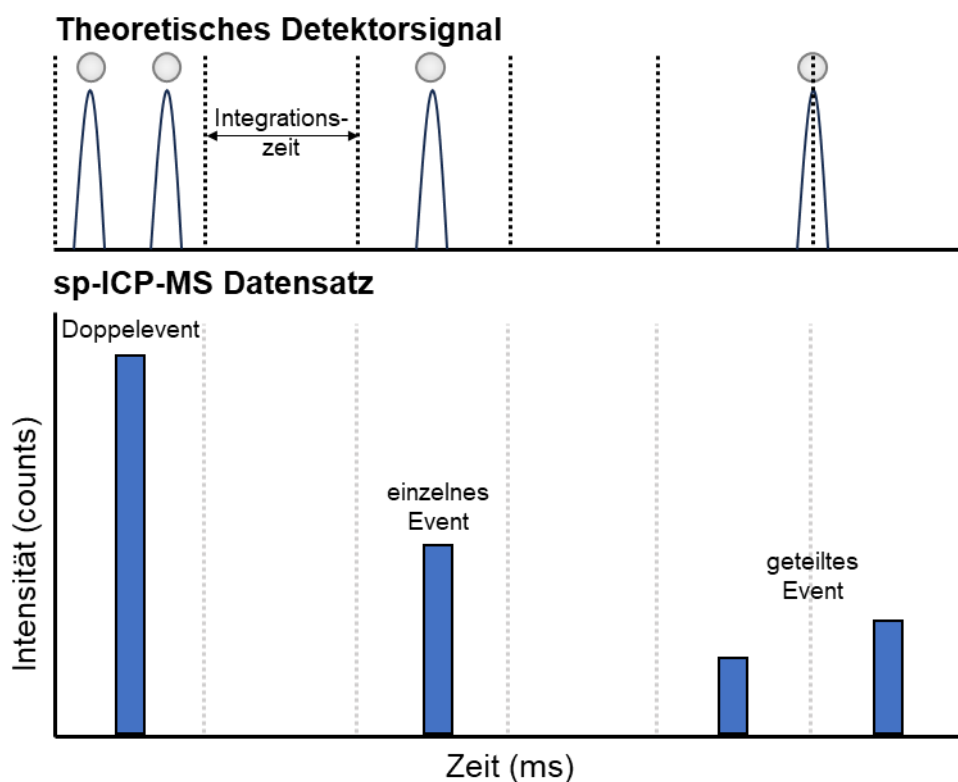
### 2.2.2 Einzelpartikelanalyse mittels ICP-MS

Der im vorherigen Abschnitt beschriebene Aufbau des ICP-MS kann auch verwendet werden, um im Gegensatz zu den dort erhaltenen Durchschnittselementgehalten einer Probe im Ultraspurenbereich, Elementinformationen über einzelne Partikel zu erhalten. Hierzu wird das Messinstrument im zeitaufgelösten Modus betrieben und stark verdünnte Suspensionen mit Partikelkonzentrationen von typischerweise weniger als  $10^9$  Partikeln pro Liter analysiert.<sup>[136,137]</sup>

Durch die hohe Verdünnung der partikulären Probe entsteht im Einzelpartikel-Modus (*engl.* single-particle mode) kein konstantes Messsignal. Die meiste Zeit wird dabei nur das Untergrundsignal des Lösungsmittels aufgenommen, dessen Gehalt des zu untersuchenden Elements den Hintergrund bestimmt. Wird ein einzelnes Partikel im Plasma ionisiert, wandert die entstandene Ionenwolke zum Massenspektrometer und wird als kurzer Signalpuls detektiert. Die Dauer eines solchen Events beträgt dabei zumeist einige hundert  $\mu$ s. Die Intensität des

Signals ist direkt proportional zur Menge an ionisierten Atomen in einem Partikel, wohingegen die Häufigkeit der detektierten Events von der Partikelkonzentration in der Suspension abhängt. Eine Besonderheit der Methode ist, dass die Verdünnung der Probe keinen Einfluss auf die Signalintensität hat. Diese hängt nur vom Elementgehalt des einzelnen Partikels ab.<sup>[136–138]</sup>

Zur Messung einzelner Partikel muss eine hohe Detektorfrequenz verwendet werden, indem nur ein Isotop untersucht wird und die Integrationszeit des Detektorsignals so gering wie möglich eingestellt wird. Typische Integrationszeiten liegen bei  $< 10$  ms, womit die Ionenwolke eines Partikels innerhalb einer Integrationszeit das Massenspektrometer passiert. Dabei ist die Partikelkonzentration so gering zu wählen, dass Doppelevents nur einen geringen Anteil aller detektierten Signale ausmachen und mittels POISSON-Filter entfernt werden können.<sup>[139]</sup> Zu geringe Konzentrationen hingegen sorgen für eine hohe Messzeit, um eine statistisch relevante Anzahl an Partikeln zu detektieren. Ein weiterer Effekt von Integrationszeiten im Millisekundenbereich ist die Möglichkeit geteilter Signale in zwei aufeinanderfolgenden Datenpunkten, die ebenfalls nicht den Elementgehalt eines einzelnen Partikels repräsentieren (Abb. 7). Die Bestimmung des Elementgehalts in einem Partikel erfolgt durch Kalibration mit wässrigen Elementstandards unter identischen Messbedingungen.<sup>[136,138,140]</sup>



**Abbildung 7:** Zeitaufgelöste Signale einer Partikelsuspension und mögliche Messfehler in Abhängigkeit von der verwendeten Integrationszeit des Detektors.<sup>[136,137]</sup>

Eine Möglichkeit zur Vermeidung dieser Messfehler ist die Anwendung geringerer Integrationszeiten von einigen  $\mu\text{s}$ , wie sie neuere Detektoren erreichen. Dadurch wird ein Partikel durch mehrere Messpunkte beschrieben und kann als Peak gefittet werden. Durch die Verteilung der generierten Ionen auf mehrere Integrationseinheiten sinkt allerdings die Intensität des Detektorsignals, was die Empfindlichkeit der Technik verringert.<sup>[136]</sup>

In den vergangenen Jahren hat sich die Einzelpartikel ICP-MS zu einer bedeutenden Technik in der Analyse von Nanopartikeln, Polymerpartikeln und Zellen entwickelt.<sup>[136,137,141,142]</sup>



### 3 Kumulativer Teil

Die im Rahmen der Dissertation entstandenen und vorab publizierten Forschungsergebnisse seien an dieser Stelle zusammenfassend dargestellt. Der Eigenanteil und die Beiträge der einzelnen Koautoren werden im Anschluss an die jeweiligen Kapitel in Anlehnung an die Contributor Roles Taxonomy (CRediT) dargestellt.

- (I) M. Schmitt, M. Egorycheva, A. Seubert, *Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids*, Journal of Chromatography A, **2022**, 1664, 462790.
- (II) M. Schmitt, M. Egorycheva, D. Frerichs, S. Fiedler, P. L. Graumann, A. Seubert, *Factors affecting mixed-mode retention properties of cation-exchange stationary phases*, Journal of Chromatography A, **2023**, 1695, 463934.
- (III) M. Schmitt, Z. Zhou, E. Meiers, L. Schipplick, D. Beauchemin A. Seubert, *Characterization of metal-labeled ion-exchange microparticles using single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, eingereicht bei Journal of Analytical Atomic Spectrometry (28.11.2023).
- (IV) M. Schmitt, F. Fillsack, A. Seubert, *A simple ion chromatography-mass spectrometry method for amino acid analysis in beer*, Journal of Separation Science, **2023**, 46, 2300106.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Herstellung gemischt-funktionaler Kationenaustauscher auf Basis von Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymerpartikeln. Dabei wird der Einfluss unterschiedlicher funktioneller Gruppen im Material auf das Ergebnis chromatographischer Trennungen untersucht und eine Materialbibliothek hergestellt, die sich im Anzahlverhältnis der funktionellen Gruppen zueinander, bei ansonsten gleichbleibenden Eigenschaften, unterscheidet. Die folgenden beiden Kapitel widmen sich der Entwicklung neuer Charakterisierungsmethoden und ihrer Anwendung auf die erhaltenen Materialien. Die Eigenschaften der stationären Phasen werden dabei zunächst mittels materialchemischer Methoden und chromatographischer Tests zur Identifikation von Retentionsmechanismen bestimmt. Das darauffolgende Kapitel beschreibt die Entwicklung einer Methode zur Charakterisierung der Ionenaustauscher auf Einzelpartikelebene mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie. Abschließend wird das Wissen über die hergestellten Trennsäulen verwendet, um mittels einer angepassten stationären Phase underivatisierte Aminosäuren in einer komplexen Probenmatrix zu quantifizieren.

### 3.1 Gemischt-funktionalisiertes Kationenaustauschmaterial zur Trennung von underivatisierten Aminosäuren

M. Schmitt, M. Egorycheva, A. Seubert

*Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids*

Journal of Chromatography A, **2022**, 1664, 462790

Die Austauscherguppe ist ein wesentliches Strukturmerkmal zur Steuerung chromatographischer Eigenschaften von Kationenaustauschern.<sup>[1,4,5,143–145]</sup> Der Einfluss verschiedener Austauscherguppen unterschiedlicher Acidität auf die Trennung anorganischer Kationen in rein wässrigen Eluenten ist dabei sehr gut beschrieben.<sup>[63,64,146]</sup> Gemischt-funktionalisierte Materialien bieten die Möglichkeit, die Ergebnisse einer Trennung durch systematische Variation der Säulenzusammensetzung zu beeinflussen. Vereinzelt finden solche Materialien mit unterschiedlich aziden Austauscherguppen bereits Anwendung<sup>[65–70,72]</sup>, eine systematische Betrachtung des Wechselspiels unterschiedlicher Austauscherguppen in einem Material und deren Verständnis existiert allerdings nicht. Neben der Untersuchung der Trennung von anorganischen Kationen, wurden Aminosäuren als organische Modellanalyten verwendet. Neben ihrer pH-Wert abhängigen Ladung zeichnen sich diese Analyten durch eine große Bandbreite an Polaritäten aus. Die Trennung solcher Analyten mit stark unterschiedlichen Eigenschaften ist eine typische Herausforderung in der Chromatographie, weshalb diese Modellanalyten zur Untersuchung der Säulenchemie besonders geeignet sind.<sup>[10,12]</sup>

Ausgehend von einer Charge an makroporösen PS/DVB-Partikeln, die sich als Packungsmaterial in der HPLC bewährt haben<sup>[92,147]</sup>, wurden schwach saure Austauscherguppen (*engl.* weakly acidic cation-exchanger, WCX) durch die Reaktion terminaler Doppelbindungen mit *in-situ* gebildeter Peroxyameisensäure erzeugt. Die Menge der Carboxylgruppen konnte anschließend durch Reduktion zu Hydroxylgruppen mittels Lithiumaluminiumhydrid wieder verringert werden. Auf dem Material mit einem maximalen Anteil an Carbonsäureaustauschern wurden anschließend stark saure Austauscherguppen (*engl.* strongly acidic cation-exchanger, SCX) durch Sulfonierung am Aromaten eingeführt. Der Funktionalisierungsgrad wurde über die Verdünnung der Schwefelsäure in Essigsäure eingestellt und mittels Verbrennung und anschließender Quantifizierung von Sulfat bestimmt.

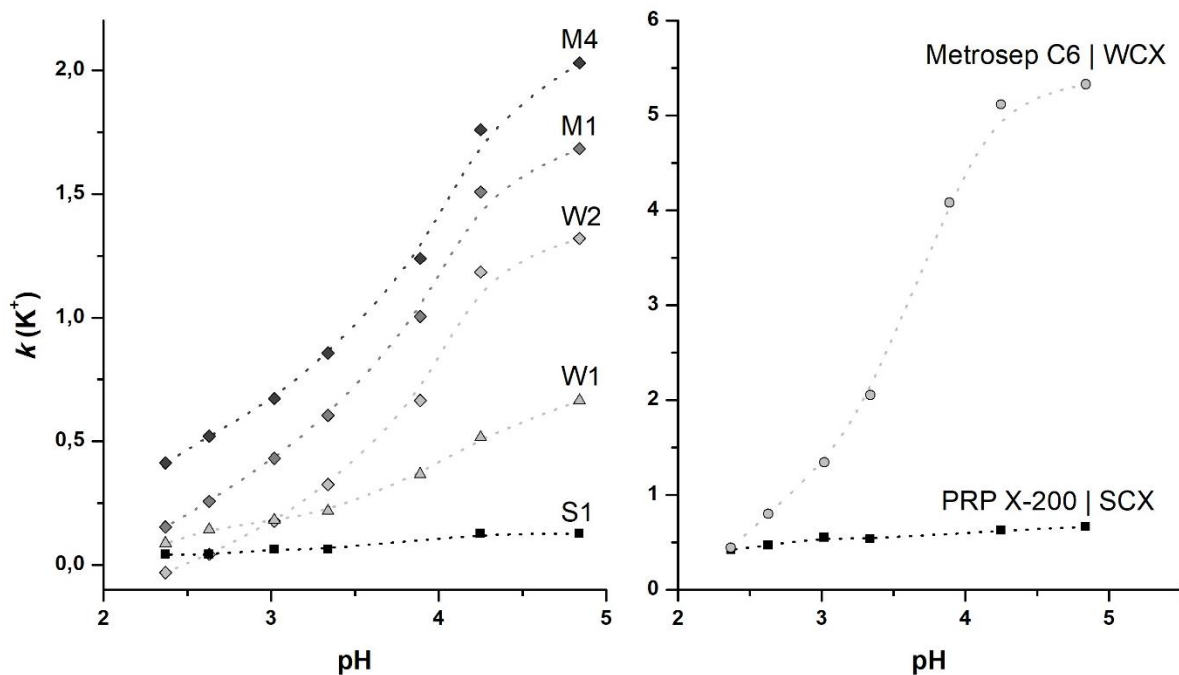
Die für den Kationenaustausch insgesamt zur Verfügung stehende Protonenkapazität wurde bei neutralem pH-Wert durch Verdrängungsexperimente von  $H^+$  gegen  $K^+$  bestimmt. Tabelle 2 zeigt die Reihe hergestellter Kationenaustauscher sowie die verwendeten kommerziell erhältlichen Referenzmaterialien und deren Charakteristika. Die kommerziellen Vergleichssäulen zeichnen sich durch jeweils nur eine Art von Austauscherguppe sowie einer stark unterschiedlichen Hydrophilie des Grundpartikels aus, wodurch die Unterschiede zu den neu entwickelten Materialien herausgearbeitet werden sollen.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung und Eigenschaften der verwendeten Kationenaustauscher.

Name	Typ	Substrat	Kapazität / $\mu\text{mol/mL}$	(w/w) % Schwefel	c ( $H_2SO_4$ ) / mL/mL HAc
<i>hergestellte Säulen</i>					
W1	WCX	PS/DVB	$33 \pm 1$	0,00	-
W2	WCX	PS/DVB	$50 \pm 1$	0,00	-
M1	MCX	W2	$51 \pm 3$	$0,09 \pm 0,00_1$	0,1/10
M2	MCX	W2	$52 \pm 3$	$0,12 \pm 0,01$	1,0/10
M3	MCX	W2	$59 \pm 1$	$0,23 \pm 0,01$	2,0/10
M4	MCX	W2	$68 \pm 3$	$0,27 \pm 0,02$	1,0/5
S1	SCX	PS/DVB	$22 \pm 2$	$0,09 \pm 0,01$	1,0/10
<i>kommerziell erhältliche Säulen</i>					
PRP X-200	SCX	PS/DVB	$27 \pm 2$	$0,31 \pm 0,03$	-
C6	WCX	Silica	$99 \pm 2$	-	-

Da der  $pK_s$ -Wert ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal von Carbon- und Sulfonsäure Austauscherguppen ist, wurde die Stärke der Wechselwirkung unterschiedlicher Säulenmaterialien mit dem einfach geladenen, anorganischen Kaliumkation in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung untersucht. Die  $K^+$ -Retention als Maß für die Stärke der Wechselwirkung zeigte dabei je nach Austauscherguppe im Material einen charakteristischen Verlauf (Abb. 8). Stark saure Sulfonsäuregruppen liegen im gesamten untersuchten pH-Bereich deprotoniert vor, weshalb eine konstante Retention beobachtet wurde. Carbonsäuren hingegen liegen bei einem pH-Wert der mobilen Phase unterhalb ihres  $pK_s$  -Wertes überwiegend protoniert vor, wobei die Ladung der stationären Phase mit steigendem pH-Wert zunimmt. Die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Modellanalyten weisen daher einen sigmoidalen Kurvenverlauf auf. Für die untersuchte Reihe gemischt-funktionaler Materialien addieren sich beide Effekte. Hierbei bleibt der sigmoidale Anstieg der Retention mit dem pH-Wert bestehen, wohingegen ein zunehmender Sulfonierungsgrad an einem konstanten zusätzlichen Beitrag zur

Retention und einer entsprechenden Verschiebung der Kurve auf der y-Achse erkennbar ist. Das gezeigte Experiment bestätigt damit die Herstellung gemischt-funktionalisierter Kationenaustauscher und ebenfalls die Erwartung flexibel einstellbarer chromatographischer Eigenschaften durch Materialzusammensetzung und pH-Wert. Der Vergleich mit typischen rein stark oder schwach sauren Kationenaustauschern bestätigt zusätzlich die neuen Eigenschaften und die Modulierbarkeit der Säulenchemie.

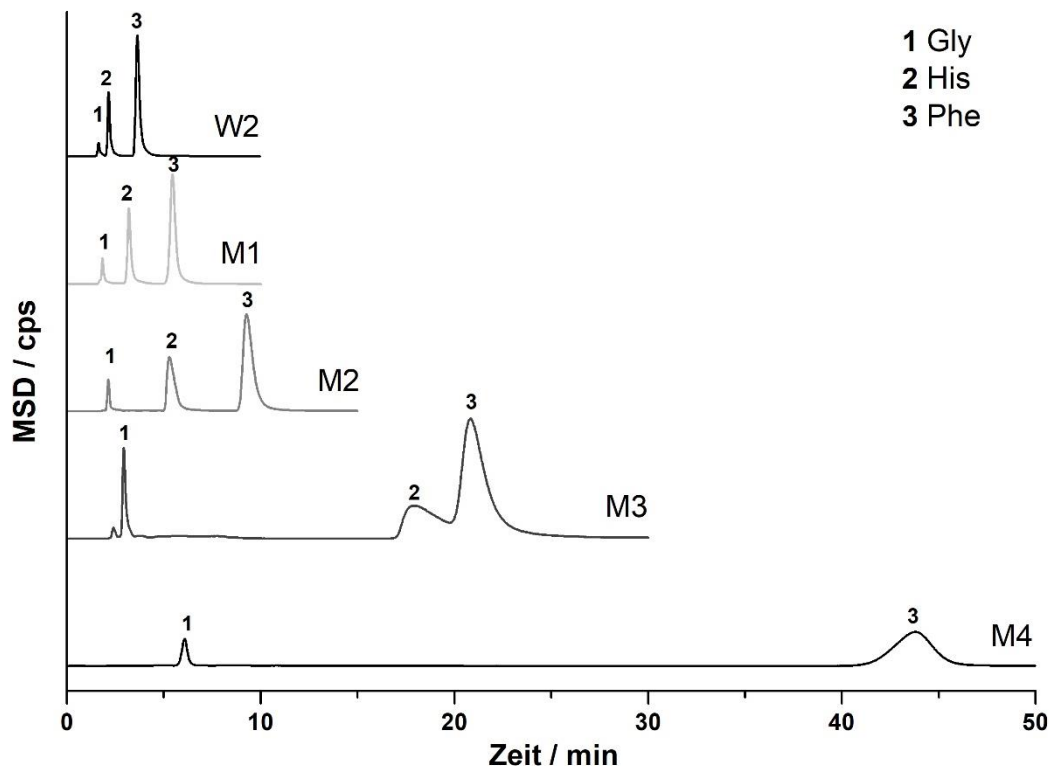


**Abbildung 8:** Retention von  $K^+$  als Funktion des pH-Werts des Eluenten auf verschiedenen Kationenaustauscher-Säulen.

Im nächsten Schritt wurde die Retention von Aminosäuren in Abhängigkeit von der Säulen- und Eluentzusammensetzung untersucht. Die kanonischen Aminosäuren sollen dabei genutzt werden, um zu zeigen, dass gemischt-funktionalisierte Kationenaustauscher Vorteile für praktisch relevante Anwendungen haben.

Für die untersuchte Reihe von gemischt-funktionalen Säulen wurde kein signifikanter Einfluss des Anteils stark saurer Austauschergruppen auf die Selektivität von sauren, neutral/polaren und neutral/hydrophoben Analyten gefunden, deren isoelektrischer Punkt  $pI$  sich nur in geringem Maße unterscheidet. Die Retention aller Analyten dieser Gruppen nahm mit dem Sulfonierungsgrad um einen bestimmten Anteil zu. Im Gegensatz dazu ermöglicht die Menge stark saurer Austauschergruppen die Steuerung der Selektivität der basischen Aminosäuren zu allen anderen Gruppen (Abb. 9), die auch für Änderung der Retentionsreihenfolge genutzt werden kann. Hierzu wurden Glycin (neutral/polar), Histidin (basisch) und Phenylalanin (neutral/hydrophob) als Vertreter der jeweiligen Gruppen von Aminosäuren betrachtet. Es

konnte gezeigt werden, dass die Elektroselektivität auch für die Trennung von Aminosäuren genutzt werden kann. Die Trennsäule kann somit entsprechend der Ladung der zu analysierenden Verbindungen optimiert werden.

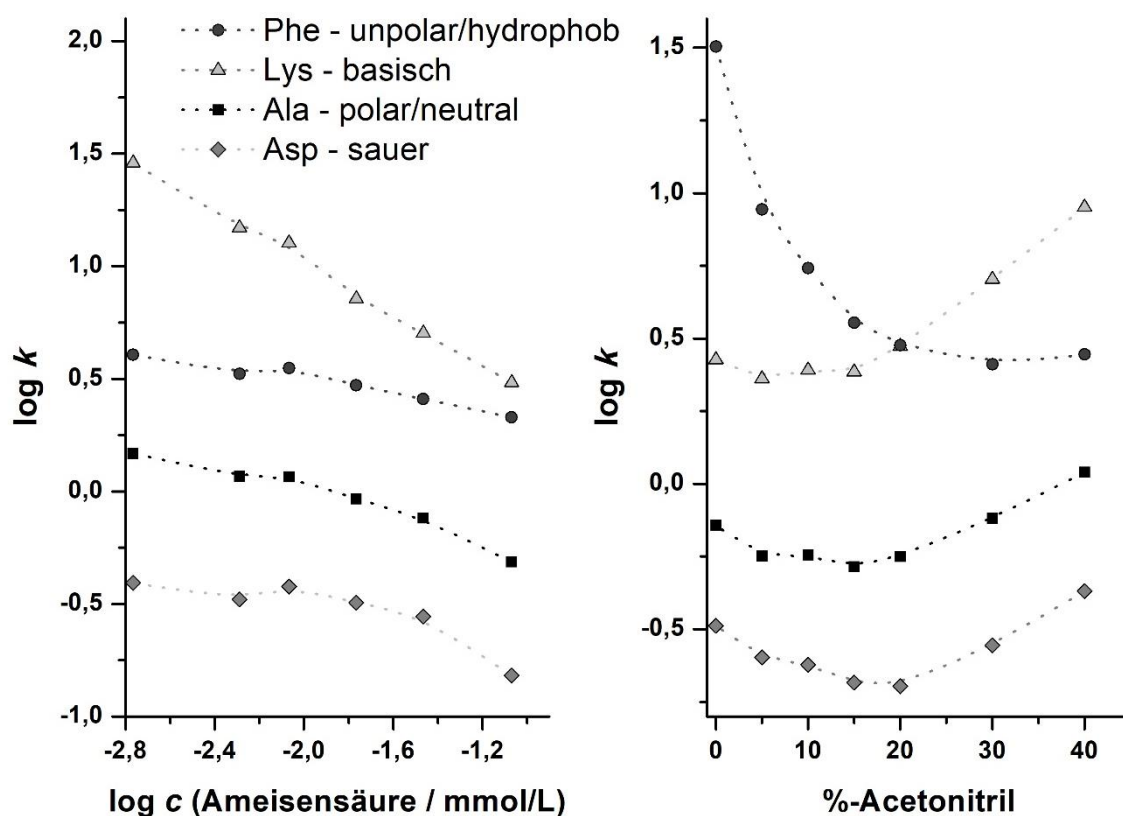


**Abbildung 9:** Einfluss der Säulenzusammensetzung auf die Trennung von exemplarischen Aminosäuren unterschiedlicher Gruppen mit Hilfe stationärer Phasen mit variiertem Sulfonsäureanteil.

Die Eluentzusammensetzung bietet darüber hinaus eine Möglichkeit zur weiteren Optimierung der Trennung entsprechend des zugrundeliegenden Trennproblems (Abb. 10). Als Elutionssystem wurde eine Mischung von Wasser, Acetonitril und Ameisensäure verwendet, die sich durch eine vollständige Flüchtigkeit auszeichnet und sich daher für die direkte Kopplung der Kationenaustauschchromatographie mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) eignet. Entsprechend des Retentionsmodells für die Ionenaustauschchromatographie wurden hochgeladene Analyten durch die Veränderung der Säurekonzentration stark beeinflusst. Für schwächer geladene Analyten hingegen wurde eine Unstetigkeit des Kurvenverlaufs für geringe Säurekonzentrationen beobachtet, die mit dem multivarianten Zusammenspiel von Analyt, Eluent und Austauscherguppen mit vergleichbaren pKs-Werten beschrieben werden kann.

Analog dazu wurde der Anteil des organischen Modifiers im Eluenten variiert und es wurden Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Grundpolymer der stationären Phase als weiterer Beitrag zur Retention identifiziert. Dem Modell entsprechend verringert sich die Retention mit

steigendem Acetonitrilanteil im Eluenten. Die Inversion des Kurvenverlaufs kann durch den Einfluss hoher Acetonitrilanteile auf die Hydrathülle und Dissoziation der Austauscherguppen sowie die zunehmende Ausbildung einer wasserreichen Schicht an der Oberfläche der stationären Phase erklärt werden. Mit steigendem Sulfonierungsgrad lag dieser Inversionspunkt bei geringeren Acetonitrilanteilen. Die zusätzlichen Beiträge nicht-ionischer, sekundärer Wechselwirkungen für gemischt-funktionale Kationenaustauscher sind eine interessante Möglichkeit zur Anpassung der Trenneigenschaften.

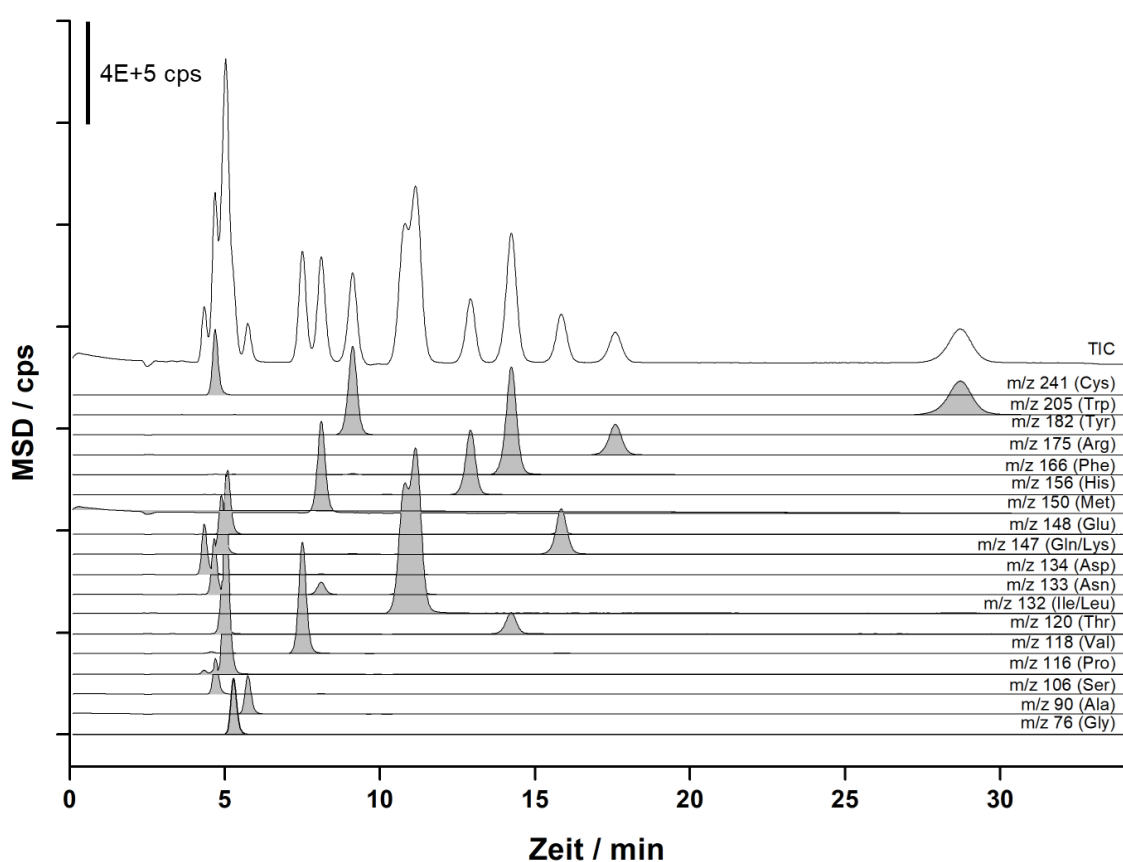


**Abbildung 10:** Einfluss der Eluentzusammensetzung auf die Retention unterschiedlicher Gruppen von Aminosäuren.

Ausgehend von diesen Zusammenhängen wurden Trennsäule und Eluentzusammensetzung für die Trennung von 20 kanonischen Aminosäuren unter isokratischen Bedingungen optimiert. Innerhalb von 30 Minuten wurde eine vollständige Trennung der neutral-hydrophoben und basischen Aminosäuren erzielt, wobei hier die Anpassung der Selektivität durch die Säulenchemie eine besondere Rolle spielte (Abb. 11). Die neutral-polaren und sauren Aminosäuren wurden teilweise getrennt, eluieren außerhalb des Totvolumens und können durch die zusätzliche Dimension des Massenspektrometers anhand der Masse des protonierten Moleküls unterschieden werden. Im Vergleich zu kommerziell erhältlichen schwach oder stark sauren Austauschern wurden neue chromatographische Eigenschaften beobachtet. Dadurch wurde einerseits die partielle Trennung der Isomere Leucin und Isoleucin ermöglicht.

Andererseits konnten saure und basische Aminosäuren, die unter den Bedingungen des Kationenaustauschs stark unterschiedliche Ladungen aufweisen in einem isokratischen Lauf getrennt werden.

Die Eignung der Säulenchemie zur quantitativen Analyse wurde durch die Bestimmung von Nachweisgrenzen (4-64 nM) der Kalibriergeradenmethode und der modifizierten Leerwertmethode nach EPA gezeigt.<sup>[148,149]</sup> Die Richtigkeit wurde durch Vergleich mit einem zertifizierten Referenzstandard gezeigt, wobei erwartungsgemäß die höchsten Übereinstimmungen für vollständig getrennte Analyten erhalten wurden.



**Abbildung 11:** Trennung der 20 kanonischen Aminosäuren mittels optimierter gemischt-funktionaler Trennsäule und ESI-MS Detektion. Eluent: 85/15 % v/v (Wasser/Acetonitril) + 0,05 % Ameisensäure.

In der beschriebenen Studie wurde gezeigt, dass die Mischung von stark und schwach sauren Austauschergruppen zu neuen Trenneigenschaften der resultierenden Kationenaustauschersäulen führt. Dabei kann das Verhältnis der beiden funktionellen Gruppen durch die modularen Reaktionsschritte unabhängig voneinander eingestellt werden. Sulfonsäuregruppen im Austauschermaterial beeinflussen dabei insbesondere hochgeladene Analyten, wohingegen Carbonsäuregruppen für die Retention schwach geladener Analyten verantwortlich sind. Gemischt-funktionale Materialien erlauben daher die Analyse einer

größeren Bandbreite an Analyten in einer Messung. Die erhaltene Säulenchemie wurde für die direkte quantitative Analyse von Aminosäuren mittels IC-ESI-MS angewendet.

### **Erklärung des Eigenanteils**

Die Konzeption und Methodik des Manuskripts stammen von mir. Alle neu entwickelten Kationenaustauscher wurden von mir hergestellt und charakterisiert. M. Egorycheva führte Teile der Experimente zur Optimierung der Eluentzusammensetzung durch. A. Seubert unterstützte bei experimentellen Arbeiten zur Bestimmung quantitativer Leistungsparameter. Die quantitative Analyse wurde von mir ausgewertet und interpretiert. Weiterhin wurde der erste Entwurf des Manuskripts von mir erstellt und von A. Seubert editiert sowie eingereicht.



### 3.2 Einflussfaktoren auf das *mixed-mode* Retentionsverhalten von Kationenaustauschern als stationäre Phasen

M. Schmitt, M. Egorycheva, D. Frerichs, S. Fiedler, P. L. Graumann, A. Seubert

*Factors affecting mixed-mode retention properties of cation-exchange stationary phases*

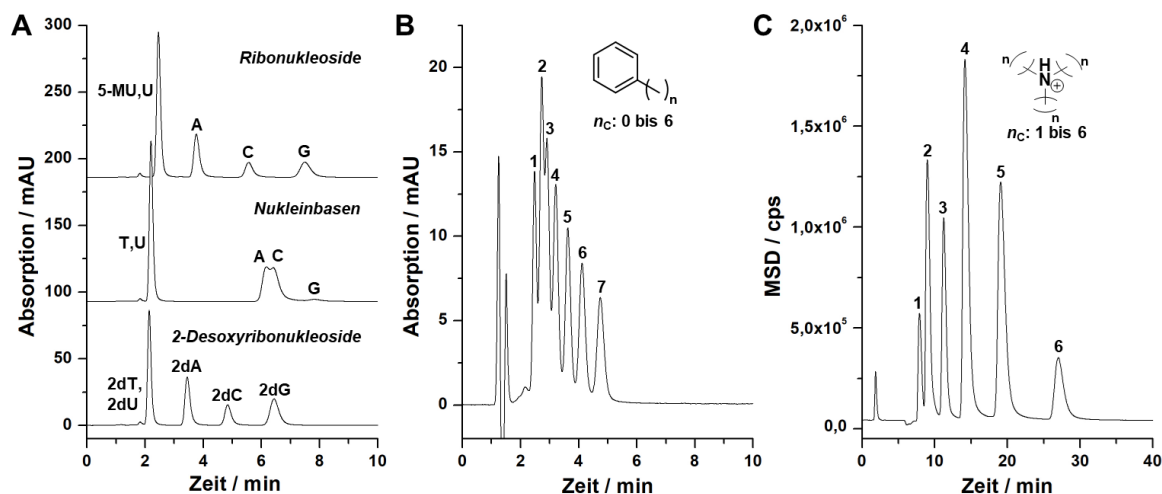
Journal of Chromatography A, **2023**, 1695, 463934.

Die in der vorausgegangenen Veröffentlichung entwickelten Materialien wurden in dieser Arbeit hinsichtlich der vorliegenden Retentionsmechanismen genauer untersucht. Da gezeigt wurde, dass die Trennung organischer Kationen neben dem Ionenaustausch auch durch sekundäre Wechselwirkungen maßgeblich beeinflusst wird, ist die genauere Identifizierung der verschiedenen Beiträge zur Gesamtretention von Interesse. Außerdem sind strukturelle Einflussgrößen des Säulenmaterials auf diese *mixed-mode* Mechanismen kaum erforscht. Dies gilt insbesondere für Ionenaustauscher, obwohl die Möglichkeiten zur Modifikation der Materialeigenschaften sehr vielfältig sind und Methoden zur Charakterisierung von Retentionsmechanismen entwickelt wurden.<sup>[4,77–79,150]</sup>

Zunächst wurde die Anwendbarkeit der entwickelten Säulenchemie in den drei wesentlichen chromatographischen Modi RPLC, HILIC und IC unter standardisierten Bedingungen untersucht. Die hergestellten Kationenaustauscher zeigten Retention in allen Modellexperimenten, wobei die IC- und RPLC-Anteile im Vergleich zur HILIC stärker ausgeprägt sind (Abb. 12). Dies wurde anhand numerischer Selektivitätsparameter<sup>[78,104,110]</sup> bestätigt, die aus der Retention standardisierter gut charakterisierter Modellsubstanzen ermittelt wurden und für die umfangreiche Vergleichsdaten vorliegen (Tabelle 3). Neben den von TANAKA und Mitarbeitern vorgeschlagenen Testsubstanzen wurden zusätzlich homologe Reihen von Alkylbenzolen (AB) und Trialkylaminen (TAA) mit variierter Kettenlänge verwendet.

Die Möglichkeit zur Verwendung kommerziell verfügbarer Ionenaustauscher als *mixed-mode* Materialien wurde an exemplarischen Materialien verdeutlicht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die große Bandbreite an verfügbaren Materialien auch in der Vielseitigkeit der chromatographischen Eigenschaften widerspiegelt. Je nach Polymersubstrat und

Funktionalisierung hat neben dem Ionenaustausch entweder der HILIC- oder der RPLC-Modus einen wesentlichen Einfluss auf die Retention.



**Abbildung 12:** Chromatogramme eines gemischt-funktionalen Kationenaustauschers unter (A) HILIC-, (B) RPLC- und (C) IC-Bedingungen mit entsprechenden Testsubstanzen.

**Tabelle 3:** Selektivitätsparameter für unterschiedliche Kationenaustauscher in RPLC (A) und HILIC-Modus (B). Trennsäulen: Metrosep C6, gemischt-funktionale Trennsäule M1, PRP X-200. Mobile Phase: 30/70 % (v/v) 100 mM Ameisensäure/Acetonitril (A), 10/90 % (v/v) 20 mM Ammoniumacetat (pH = 4,8)/Acetonitril (B).

**A) Methylselektivität ( $n_c \geq 3$ ) und Beitrag des Kationenaustauschs**

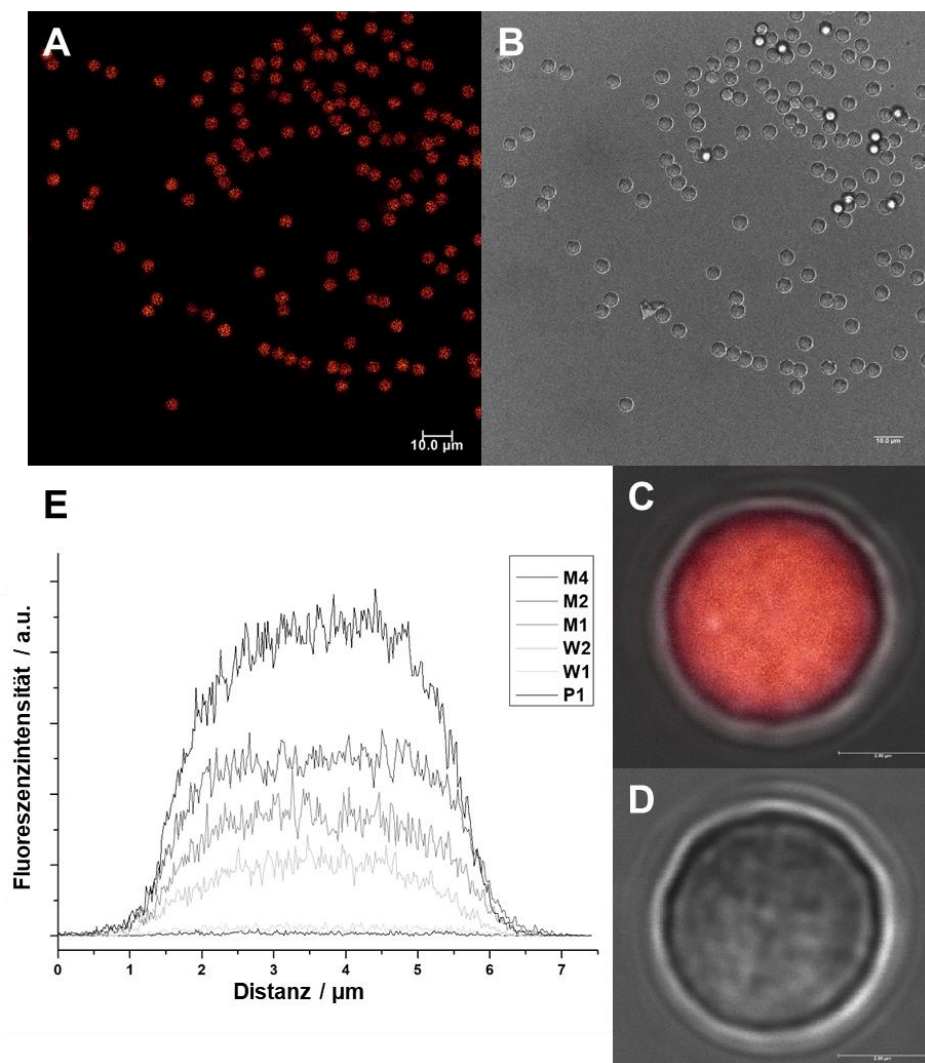
Säule	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{Tanaka}}$	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{AB}}$	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{TAA}}$	$k(\text{Rb}^+)$
C6	-	-	-0,20	21,77
M1	1,22	0,09	0,13	0,92
PRP	1,45	0,17	-	51,54

**B) Hydrophile TANAKA Test Parameter**

Säule	$k(\text{U})$	$\alpha(\text{CH}_2)$	$\alpha(\text{OH})$	$\alpha(\text{V/A})$	$\alpha(2\text{dG}/3\text{dG})$	$\alpha(\text{AX})$	$\alpha(\text{CX})$	$\alpha(\text{Tb/Tp})$
C6	3,27	1,56	2,40	1,19	1,16	-0,02	14,77	1,34
M1	0,73	1,05	1,45	1,11	1,07	-0,39	85,38	0,84
PRP	0,09	-	-	-	-	-	-	-

Nachdem die generelle Eignung von Kationenaustauschern zur Verwendung als *mixed-mode* Phasen gezeigt wurde, sollten Strukturmerkmale identifiziert werden, die diese Eigenschaften bestimmen. Zur Überprüfung der Hypothese, dass ionische und damit hydratisierte funktionelle Gruppen für die Ausbildung einer wasserreichen Schicht im Material sorgen und folglich für die Retention unter HILIC-Bedingungen verantwortlich sind, wurde die räumliche Verteilung der Austauschergruppen mittels einer neu entwickelten konfokalen Fluoreszenzmikroskopie-

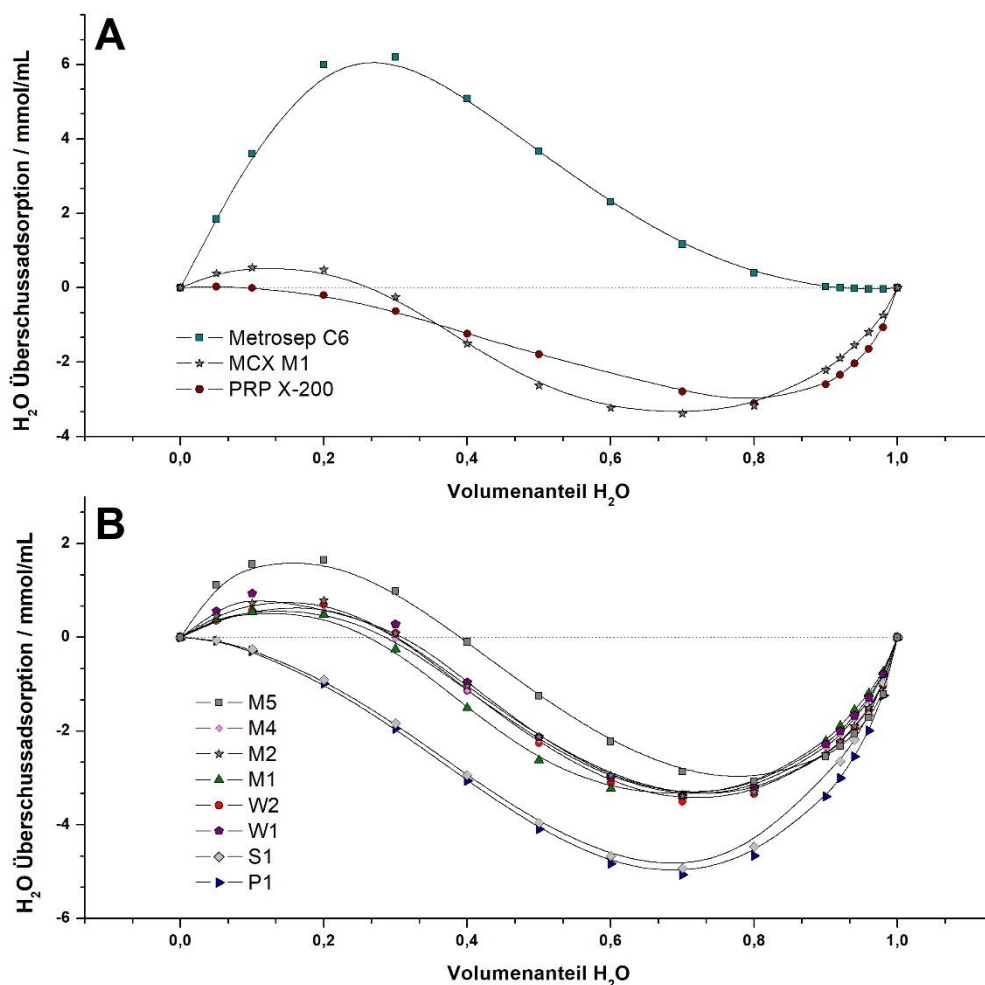
Methode untersucht. Dabei wurden die Kationenaustauscher mit Rhodamin 123 als kationischem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Für Carboxylierung und Sulfonierung wurde eine homogene Verteilung der Austauschergruppen im gesamten Polymerpartikel beobachtet, während unfunktionalisiertes PS/DVB nach Anwendung des identischen Markierungsprotokolls nicht fluoreszierte. Die Fluoreszenzintensität nahm mit dem Funktionalisierungsgrad zu (Abb. 13).



**Abbildung 13:** Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin 123-markierten Kationenaustauschern: (A) STED-Aufnahme von gemischt-funktionalisierten Partikeln (Skala: 10 μm), (B) analoges Durchlichtbild; Überlagerung von Durchlicht und STED-Aufnahme für Kationenaustauscher (C) und unfunktionalisiertes Partikel (Skala: 10 μm) (D); Fluoreszenzintensität im Partikelquerschnitt in Abhängigkeit von der Materialfunktionalisierung (Skala: 10 μm) (E).

Die gleichmäßige Verteilung der funktionellen Gruppen im Material kann auf die Verwendung von Kleinmolekülreaktionen im Gegensatz zu Oberflächenpolymerisierungen zurückgeführt werden.

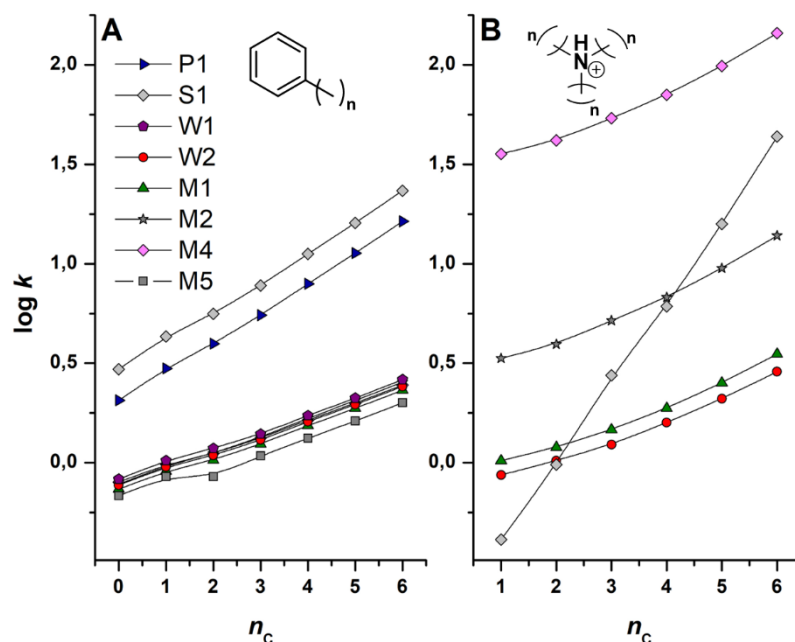
Zur Bestätigung dieses qualitativen Befunds und zur Abschätzung der Auswirkung der hydratisierten funktionellen Gruppen auf Materialpolarität wurden Überschussadsorptionsisothermen der Materialien bestimmt. Diese beschreiben die Zusammensetzung der Grenzschicht zwischen Partikel und Eluent relativ zum Eluenten. Dazu wurde die Methode der geringfügigen Störung des Gleichgewichts (*engl.* minor disturbance method) angewendet. Durch den Vergleich von zwei kommerziell erhältlichen Trennsäulen mit einem exemplarischen gemischt-funktionalen Kationenaustauscher (Abb. 14A) wurden die zuvor ermittelten Selektivitätsparameter bestätigt. Das gemischt-funktionale Material zeigte dabei die Besonderheit, dass die Grenzschicht je nach Zusammensetzung der mobilen Phase einen Überschuss an Wasser oder Acetonitril aufwies. Während bei hohen Wasseranteilen in der mobilen Phase Acetonitril an der Oberfläche angereichert wurde, lag eine Überschussadsorption von Wasser bei geringen Wasseranteilen in der mobilen Phase vor. Dies erklärt die Möglichkeit, diese Trennsäulen sowohl im RPLC- als auch HILIC-Modus zu betreiben. Die ausgewählten kommerziellen stationären Phasen hingegen zeigten entsprechend ihrer Polarität jeweils eine Überschussadsorption von Wasser oder Acetonitril für alle Eluentzusammensetzungen. Durch den Vergleich der Materialbibliothek mit systematisch variiertes Funktionalisierung wurde die Carboxylierung als dominierender Parameter für die hydrophilen Eigenschaften identifiziert (Abb. 14B). Im Gegensatz dazu beeinflussten geringfügige Unterschiede im Sulfonierungsgrad (0,09 bis 0,27 % *w/w* Schwefel), wie sie zur Steuerung der Retention von Kationen verwendet werden, die Materialeigenschaften nicht wesentlich. Nur hohe Sulfonierungsgrade (ab 1,6 % *w/w* Schwefel) sorgten für signifikante Unterschiede in der Materialpolarität, wodurch die molare Anzahl an hydrophilen funktionellen Gruppen im Gegensatz zu deren Ladungszustand als wesentlicher Grund für die Fähigkeit zur Ausbildung einer Wasserschicht identifiziert werden konnte. Bei diesen hohen Sulfonierungsgraden binden Kationen allerdings so stark, dass ein Einsatz in der Kationenaustauschchromatographie nicht mehr möglich wäre.



**Abbildung 14:** Überschussadsorptionsisotherme von Wasser: (A) auf kommerziell erhältlichen Kationenaustauschersäulen mit stark unterschiedlichen Eigenschaften und exemplarischem gemischt-funktionalisiertem Material, (B) der homologen Reihe an polymerbasierten Kationenaustauschern mit unterschiedlicher Funktionalisierung.

Abschließend wurde untersucht, wie mittels dieser Eigenschaften die Trennung von multifunktionalen Analyten beeinflusst werden kann. Dazu wurden Selektivitätsparameter für die gesamte Reihe an Trennsäulen ermittelt und Methylenselektivitäten bestimmt (Abb. 15). Mit Hilfe der ungeladenen, hydrophoben Alkylbenzole wurde gezeigt, dass Unterschiede in der Sulfonierung (M1-5) keinen wesentlichen Einfluss auf die Retention haben. Im Gegensatz dazu sank nach Carboxylierung die Methylenselektivität als Maß für die Polarität des Materials. Weisen die Modellanalyten, hier Trialkylammoniumionen, zusätzlich eine Ladung auf, wurde der starke Einfluss der Sulfonsäuregruppen auf deren Retention deutlich. Aufgrund der Stärke elektrostatischer Wechselwirkungen wurde die Gesamtretention vom Sulfonierungsgrad bestimmt, wohingegen die Selektivität, ausgedrückt durch die Steigung der Auftragung, innerhalb der homologen Reihe an Analyten unverändert blieb. Auf diese Weise werden die Beiträge der Materialpolarität und des Ionenaustauschs als dominierende Einflussfaktoren für die Retention auf gemischt-funktionalen Kationenaustauschern durch Carboxylierung und

Sulfonierung unabhängig voneinander beeinflusst. Dadurch ist es möglich, optimierte Trennsäulen mit an die Analyten angepassten Eigenschaften zu erhalten.



**Abbildung 15:** Effekt der Polymerfunktionalisierung auf die Retention homologer Reihen von Alkylbenzolen (A) und Trialkylaminen (B) unterschiedlicher Kettenlänge.

In der vorgestellten Studie wurden die chromatographischen Eigenschaften gemischt-funktionaler Trennsäulen anhand der vorherrschenden Retentionsmechanismen beschrieben. Dazu wurden materialchemische und physikalisch-chemische Methoden für die Untersuchung von Kationenaustauschern adaptiert und mit einer chromatographischen Charakterisierung der entsprechenden Trennsäulen kombiniert. Auf diese Weise wurden die *mixed-mode* Eigenschaften von Kationenaustauschern identifiziert und der unterschiedliche Einfluss von Carboxylierung und Sulfonierung auf Verteilung und Ionenaustausch gezeigt.

### Erklärung des Eigenanteils

Die Konzeption und Methodik des Manuskripts stammen von mir. M. Egorycheva führte die Bestimmung der Selektivitätsparameter für einige der Trennsäulen durch. Die Bestimmung von Überschussadsorptionsisothermen wurde teilweise von D. Frerichs übernommen. Messungen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurden von S. Fiedler durchgeführt und ausgewertet. Die Methode zur Probenvorbereitung wurde von mir entwickelt, die Messmethodik stammt von S. Fiedler und P. L. Graumann. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von mir verfasst. S. Fiedler und P. L. Graumann editierten den Abschnitt zur Mikroskopie. A. Seubert editierte das Manuskript und übernahm die Einreichung.

### **3.3 Charakterisierung metall-markierter Ionenaustauscher mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie im Einzelpartikelmodus**

M. Schmitt, Z. Zhou, E. Meiers, L. Schipplick, D. Beauchemin A. Seubert

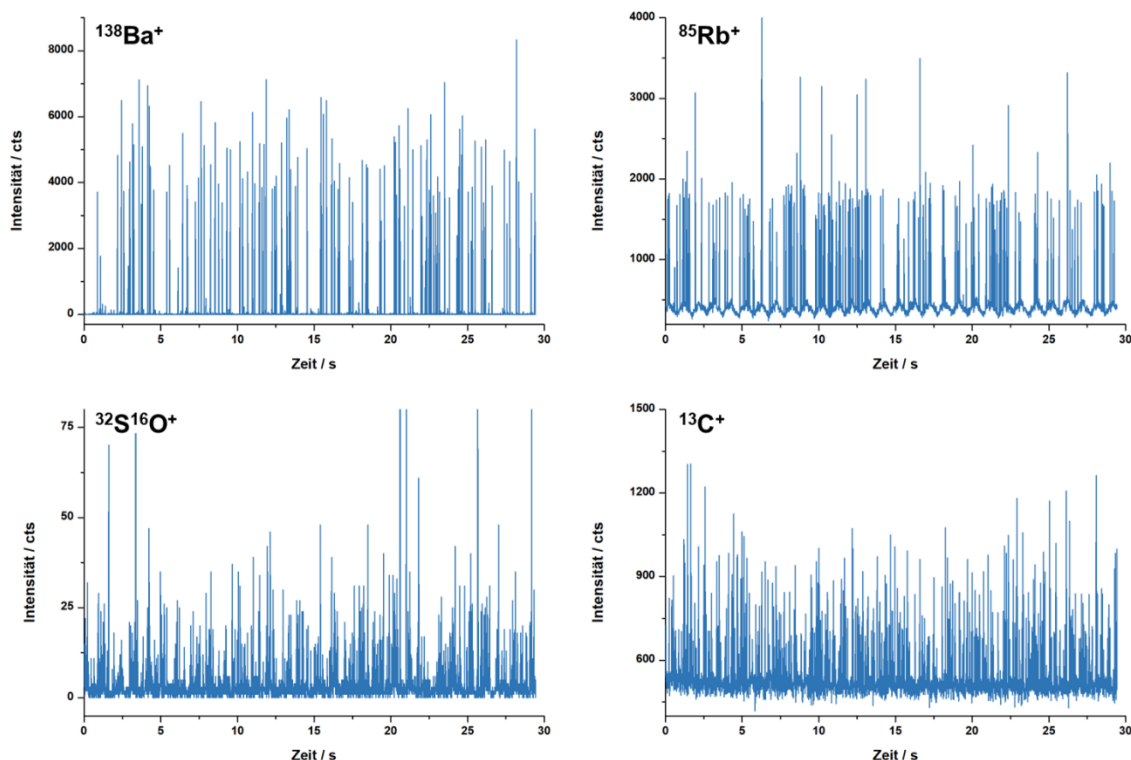
*Characterization of metal-labeled ion-exchange microparticles using single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry*

eingereicht bei Journal of Analytical Atomic Spectrometry am 28.11.2023

In dieser Veröffentlichung wurden die entwickelten Ionenaustauscher auf Einzelpartikelebene charakterisiert. Im Gegensatz zu den im vorherigen Kapitel vorgestellten chromatographischen Charakterisierungsmethoden wurden Informationen über einzelne Partikel, deren Funktionalisierung und Homogenität erhalten. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit und Robustheit im Vergleich zu bestehenden Methoden<sup>[125,140,159,151–158]</sup> werden in dieser Studie Techniken zum Probeneintrag aus dem Bereich der Nanopartikelanalyse adaptiert<sup>[160,161]</sup> und ein Verfahren zur elektrostatischen Markierung der Polymerpartikel mit Metallkationen vorgestellt und validiert. Ziel ist es, bereits anhand von kleinen Probemengen zentrale Eigenschaften eines Kationenaustauschers zu bestimmen und damit die Entwicklung neuer Funktionalisierungsmethoden zu vereinfachen. Außerdem sollen die erhaltenen Bodenzahlen der entwickelten Materialien mit ihrer Interpartikelhomogenität verglichen werden.

Zunächst wurden mögliche Strategien zur Detektion von funktionalisierten Polymerpartikeln mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie im Einzelpartikelmodus (sp-ICP-MS) verglichen (Abb. 16). Die direkte Messung des <sup>13</sup>C-Isotopes des Kohlenstoffs ermöglicht die Identifikation der Polymerpartikel. Allerdings wird keine Information über die Funktionalisierung erhalten. Zusätzlich ist die Verringerung des Untergrundsignals insbesondere in Realproben eine Herausforderung und der Einsatz von Detergenzien zur Stabilisierung der Partikelsuspensionen ist nicht möglich. Die Detektion des Molekülions <sup>32</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup> ermöglicht eine untergrundarme Bestimmung des Schwefel Heteroatoms, wobei die Empfindlichkeit jedoch gering ist. Höhere Signal-Rausch-Verhältnisse werden für die elektrostatische Markierung des Materials mit Alkali- und Erdalkalimetallkationen erhalten, wobei der Metallüberschuss durch wiederholtes Extrahieren erfolgreich entfernt wurde. Beim

Vergleich von einfach und zweifach geladenen Metallkationen haben Dikationen den Vorteil einer stärkeren Bindung und damit sowohl höhere Signal-Rausch-Verhältnisse als auch einer hohen Toleranz gegenüber Kationen in der Probenmatrix. Im Vergleich zu bekannten Markierungstechniken,<sup>[151,154,159]</sup> bei denen zumeist Metallnanopartikel zur Markierung verwendet werden, wird die chemische Information des Polymerpartikels erhalten und trotzdem eine zur Detektion ausreichende Menge an Metallatomen fixiert.



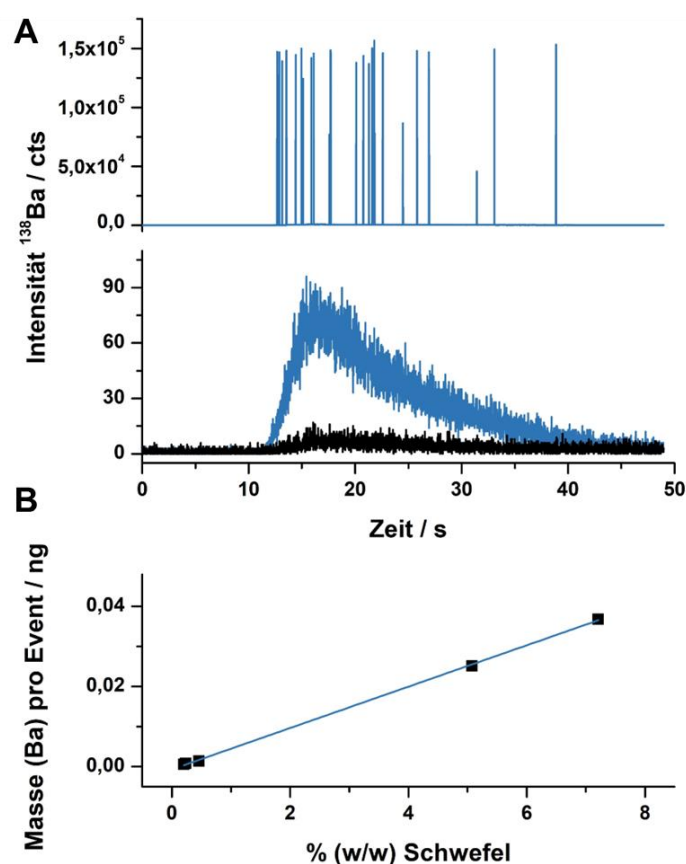
**Abbildung 16:** Vergleich unterschiedlicher Detektionsstrategien für sulfonierte Kationenaustauscher auf Polymerbasis: indirekte Detektion nach Beladung mit Metallkationen (*oben*) und direkte Detektion (*unten*) von Schwefel Heteroatomen oder dem Kohlenstoffgrundgerüst.

Zur automatisierten Charakterisierung der entwickelten Kationenaustauscher wurde die Probe anstelle einer kontinuierlichen Zuführung mittels Schlauchpumpe als definierte Menge über ein Schaltventil mit Probenschleife aufgegeben. Dieses Verfahren wird auch als Fließinjektion (FI) bezeichnet. Mittels FI werden Kalibration und Probenmessung vereinfacht und Fehlerquellen reduziert. Anstelle einer durchschnittlichen Intensität kann das zeitaufgelöste Signal von Probe und Standard (Abb. 17A) integriert und die Menge des Metallmarkers bestimmt werden. Die Aussagekraft des indirekten Partikelnachweises über elektrostatisch gebundene Kationen wurde über eine Reihe von sulfonierten Polymerpartikeln mit steigendem Funktionalisierungsgrad untersucht. Die Methode führte zu semi-quantitativen Ergebnissen für Schwefelanteile zwischen 0,21 und 7,21 % (w/w), die eine Übereinstimmung mit zuvor ermittelten Durchschnittswerten für Schwefel zeigten (Abb. 17B). Auch carboxylierte



Materialien wurden mit der entwickelten Methode charakterisiert. Da aufgrund des Gleichgewichts von Protonen und Bariumkationen mit der Austauscherguppe ein erhöhter Untergrund vorliegt, wurde eine Untergrundkorrektur durch Peakpassung durchgeführt. Die relative Standardabweichung für zehn Wiederholungsmessungen beträgt bei diesem Vorgehen 7 %.

Die Probenzuführung mittels Probenschleife reduziert zusätzlich den Probenverbrauch und erhöht die Robustheit, indem die Menge an Kohlenstoff aus Partikel und Stabilisierungsdetergenz, die ins Plasma eingetragen wird und dort für Ablagerungen sorgt, minimiert wird.

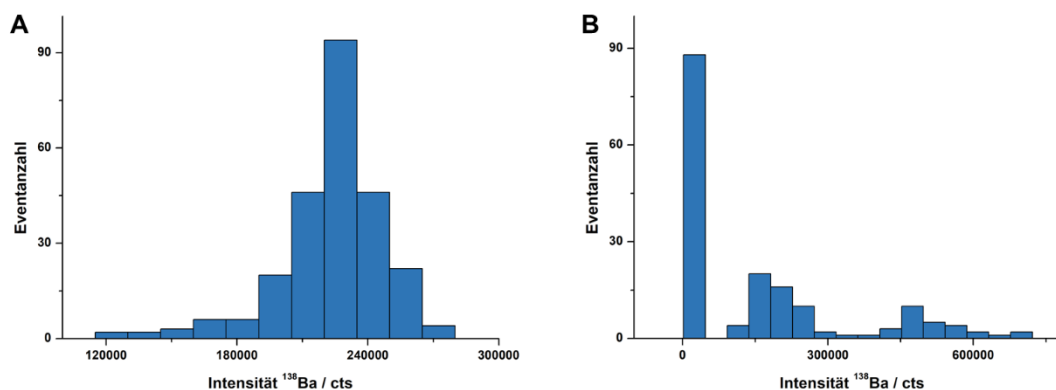


**Abbildung 17:** Semi-quantitative Analyse einer Reihe sulfonierter Polymerpartikel mittels FI-sp-ICP-MS: (A) 10 ppm Ba-markierte Partikelsuspension, 1 ppb gelöster Bariumstandard (*blau*) und 1 mM Triton X-100 (Blindprobe, *schwarz*), (B) Korrelation zwischen Durchschnitts- und Einzelpartikelanalyse.

Neben dem Funktionalisierungsgrad der Partikel, der mit der Kapazität der erhaltenen Trennsäulen korreliert, ist die Homogenität der Partikel von Interesse. Die Interpartikelhomogenität von Größe und Funktionalisierung sind wesentliche Kriterien für die Effizienz einer Trennsäule. Dazu wurden Intensitätsverteilungen verschiedener Partikel bestimmt und mit Mikroskopiedaten verglichen. Die Reihe an selbsthergestellten Materialien

zeigte eine Verteilung um einen Schwerpunkt (Abb. 18A). Die normierte Breite der Anpassung an eine logarithmierte Normalverteilung korrelierte invers mit dem Funktionalisierungsgrad, da kurze Reaktionszeiten zu einer inhomogenen Funktionalisierung führten. Die mittlere Intensität aller detektierter Partikel und der Schwerpunkt der Datenanpassung wiesen eine hohe Übereinstimmung auf.

Im Gegensatz dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Kationenaustauscher mit einer nominalen Partikelgröße von 10  $\mu\text{m}$  untersucht. Diese Probe wies eine heterogene Verteilung der Bariumlabel um drei Schwerpunkte auf, deren Intensitäten aufgrund nicht ganzzahliger Vielfacher nicht Mehrfachevents zuzuordnen sind (Abb. 18B). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen, die drei verschiedene Partikelgrößen innerhalb der Probe zeigen.

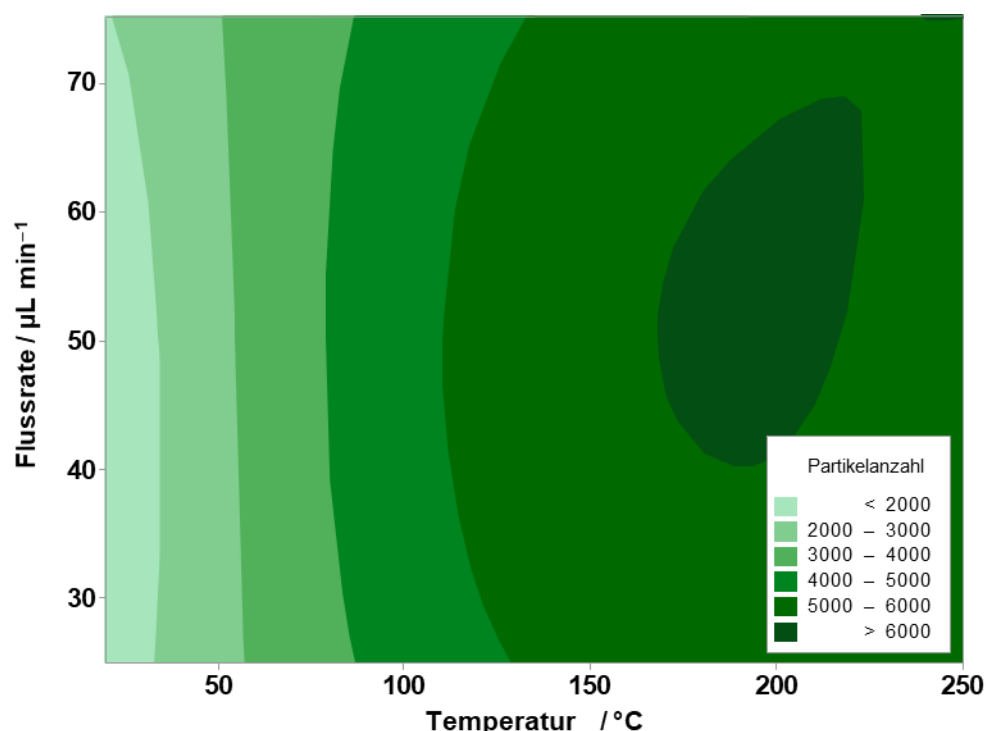


**Abbildung 18:** Histogramme der Bariumintensität verschiedener sulfonierter Kationenaustauscher: (A) exemplarisches selbst hergestelltes Material mit 7,21 % (w/w) Schwefel, (B) Probe mit heterogener Verteilung der funktionellen Gruppen, bestehend aus drei unterschiedlichen Partikeltypen.

Eine Herausforderung bei der Charakterisierung intakter Partikel mittels ICP-MS ist deren Eintrag als Aerosol ins Plasma. Da solche Systeme, bestehend aus einem pneumatischen Zerstäuber und einer Sprühkammer, dafür optimiert wurden, große Tröpfchen herauszufiltern, wird nur ein kleiner Anteil der zerstäubten Probe ionisiert. Daher korreliert die Transporteffizienz als Quotient zwischen der Anzahl injizierter und detektierter Partikel mit der Partikelgröße.<sup>[136,140]</sup> Für die verwendeten Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 4,5  $\mu\text{m}$  wurde eine Transporteffizienz von  $0,22 \pm 0,06$  % erhalten, indem die Partikelkonzentration der Suspension in einer Zählkammer nach NEUMANN bestimmt wurde. Dieser Wert sinkt für Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  auf  $0,06 \pm 0,02$  % ab. Bei diesen geringen Probeneintragsraten ist von einer Diskriminierung unterschiedlich großer und verschieden funktionalisierter Partikel auszugehen, wodurch ermittelte

Histogramme für heterogene Proben eine Unsicherheit bezüglich der Verteilung der ursprünglichen Suspension aufweisen.

Zur Lösung dieses Problems wurde der Prototyp eines neuen Probeneintragssystems, das in der Arbeitsgruppe um BEAUCHEMIN entwickelt wurde, auf die zu untersuchenden Partikel angewendet.<sup>[161]</sup> Dabei wird eine modifizierte Zyklonsprühkammer verwendet, bei der ein Heizelement in den Durchgang der Sprühkammer integriert ist und auch die Verbindungsstücke zum Plasma mit Infrarot-Elementen auf bis zu 350 °C beheizt werden können.<sup>[161]</sup> Mithilfe eines statistischen Versuchsplans wurden Experimente zur Optimierung der Transporteffizienz konzipiert, wobei die Temperatur des Probeneintragssystems und die Flussrate der Probensuspension als Variablen verwendet wurden. Während die Flussrate keinen wesentlichen Einfluss auf die Transporteffizienz zeigte, konnte mit einer erhöhten Temperatur ein Eintrag von  $60 \pm 7 \%$  der zerstäubten Partikel erhalten werden (Abb. 19). Dabei wurde der größte Einfluss bis zu einer Temperatur von 135 °C ermittelt. Für 10 µm Partikel wurde in ersten Testmessungen eine Transporteffizienz von 40 % bestimmt, wodurch im Vergleich zum Standardprobeneintrag deutlich wird, dass die Größendiskriminierung durch erhöhte Temperaturen verringert werden konnte.



**Abbildung 19:** Konturdiagramm der normierten Anzahl detektierter Ba<sup>2+</sup>-markierter Partikel gegen die Probenaufnahme rate und die Temperatur des Probeneintragssystems.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass aus der Analyse von Nanomaterialien bekannte Techniken zum Partikeleintrag ins Plasma auch für die Analyse von polymerbasierten Mikropartikeln

anwendbar sind. In Kombination mit der stöchiometrischen und stabilen Markierung mittels Erdalkalimetallkationen konnten semi-quantitative Informationen über die Funktionalisierung und Homogenität der Partikel erhalten werden. Die Ionenaustauscher können mit der entwickelten Methode schnell und direkt charakterisiert werden, ohne dass größere Materialmengen zum Herstellen einer Trennsäule oder Informationen über die chemischen Eigenschaften benötigt werden.

### **Erklärung des Eigenanteils**

Die Konzeption des Manuskripts stammt von mir. Die Methodik zur Markierung und Messung von Polymerpartikeln wurde von mir entwickelt. Z. Zhou führte die Messungen mit beheiztem Probeneintragssystem durch und entwickelte die Methodik sowie statistische Versuchsplanung dazu. E. Meiers unterstützte bei der Messung von gemischt-funktionalisierten Materialien, Anionenaustauschern und bei der Bestimmung von Transporteffizienzen. Alle weiteren Messungen wurden von mir durchgeführt und ausgewertet. Die verwendeten Modellmaterialien wurden von L. Schipplick nach von mir bereitgestellten Vorschriften hergestellt und charakterisiert. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von mir verfasst. Z. Zhou unterstützte bei der Überarbeitung des Manuskripts. D. Beauchemin und A. Seubert editierten das Manuskript. A. Seubert reichte das Manuskript ein.

### 3.4 Eine einfache Methode zur Analyse von Aminosäuren in Bier mittels Ionenchromatographie-Massenspektrometrie

M. Schmitt, F. Fillsack, A. Seubert

*A simple ion chromatography-mass spectrometry method for amino acid analysis in beer*

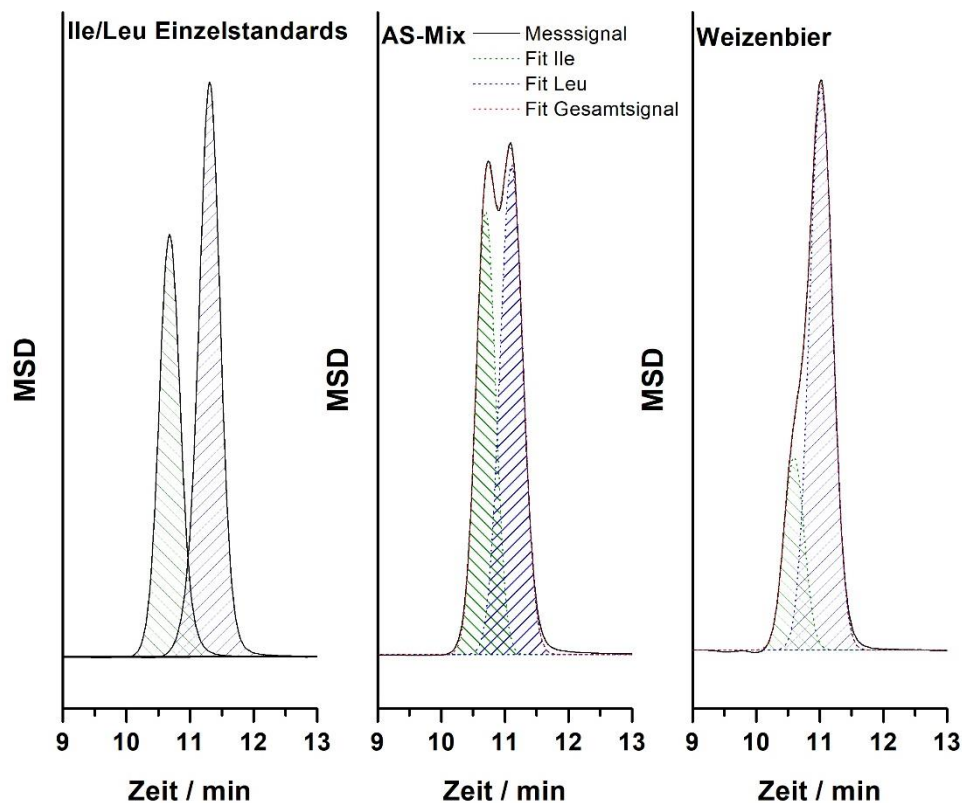
Journal of Separation Science, **2023**, *46*, 2300106.

In der abschließenden Anwendungsstudie wird die entwickelte und charakterisierte Säulenchemie zur Quantifizierung von Aminosäuren in Realproben angewendet. Die schnelle, robuste und empfindliche Analyse von Realproben mittels LC-MS ist dabei eine Herausforderung. Bestehende Methoden zur Aminosäureanalyse benötigen häufig aufwendige Derivatisierungen der Analyten oder verwenden wenig robuste Trenntechniken oder Trennsäulen, die nur mit wenigen Eluenten kompatibel sind.<sup>[12,31,32,35–37,162,163]</sup> Dies gilt auch für den Ionenaustausch, wobei hier bei der Kopplung von Ionenchromatographie und Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie nicht flüchtige Bestandteile der mobilen Phase durch komplexe und fehleranfällige Suppressortechnik entfernt werden müssen.<sup>[6,19,164]</sup> Für die Analyse von amphoteren Verbindungen wie Aminosäuren besteht zusätzlich das Problem, dass diese teilweise mit den Elutionen aus dem System entfernt werden.<sup>[20,30,165–169]</sup>

In dieser Veröffentlichung wurde daher die Robustheit der entwickelten gemischt-funktionalen Säulenchemie gegenüber komplexen Probenmatrices untersucht. Als Folge des multimodalen Retentionsmechanismus war es möglich, die Trennung ohne Anwendung eines Gradienten durchzuführen, da die unterschiedlichen Gruppen von Analyten wie in Kapitel 3.1 beschrieben durch das Verhältnis der Austauschergruppen und die Eluentzusammensetzung gesteuert werden konnten. Der isokratische Betriebsmodus ist dabei für eine robuste Detektion mittels Massenspektrometrie von besonderem Interesse, da die Ionisierung bei konstanten Bedingungen stattfindet und keine Equilibrierungsschritte zwischen verschiedenen Läufen notwendig sind. Die niedrig-kapazitive Trennsäule konnte zusätzlich mit einem Eluenten bestehend aus Wasser und Acetonitril (85/15 % v/v) mit 0,05 % Ameisensäure als Protonenquelle für den Kationenaustauschmechanismus betrieben werden. Diese vollständig flüchtige mobile Phase ermöglicht die direkte Kopplung mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie.

Optimierte Methoden für eine angepasste gemischt-funktionale Trennsäule sowie zwei kommerziell erhältliche Kationenaustauscher zeigten die Vorteile der entwickelten stationären Phase. Im Vergleich zu einem schwach sauren Kationenaustauscher auf Silicabasis (Metrosep C6, METROHM, Herisau, Schweiz) konnten die Isomere Leucin und Isoleucin teilweise aufgelöst werden. Im Gegensatz zu einem stark sauren Kationenaustauscher auf PS/DVB-Basis konnten auch basische Aminosäuren unter isokratischen Bedingungen analysiert werden und die Retentionszeiten für hydrophobe Analyten wurden von 80 auf 30 Minuten verringert.

Eine wesentliche Herausforderung bei der Analyse von Aminosäuren ist die Trennung der Konstitutionsisomere Leucin und Isoleucin, die aufgrund gleicher  $m/z$ -Verhältnisse nicht mittels *single-Quadrupol* Massenspektrometrie aufgelöst werden können. Die vollständige Kompatibilität der entwickelten Säulenchemie mit organischen Lösungsmitteln und das Verständnis der vorliegenden Retentionsmechanismen ermöglicht hier eine Optimierung der Auflösung. Durch Verringerung des organischen Anteils in der mobilen Phase wirkt sich der Polaritätsunterschied zwischen den Isomeren stärker auf die Trennung aus, wodurch bei einem rein wässrigen Eluenten eine Basislinientrennung der Isomere erhalten wird. Aufgrund der stark steigenden Retention für hydrophobe Analyten ist eine isokratische Trennung aller 20 Aminosäuren mit diesem Eluenten nicht möglich. Bei äquimolaren Proben wurde aufgrund der hohen Symmetrie der Signale eine vertikale Peaktrennung als einfache und richtige Methode identifiziert. Für exemplarische Bierproben wurde eine Anpassung der überlagerten Signale durch zwei GAUß-förmige Peaks als geeignete Auswertemethode gefunden (Abb. 20). Mit der optimierten Eluentzusammensetzung und der entsprechenden Auflösung der Isomere von 0,85 konnte so der bis zu vierfache Überschuss eines Isomers bestimmt werden.

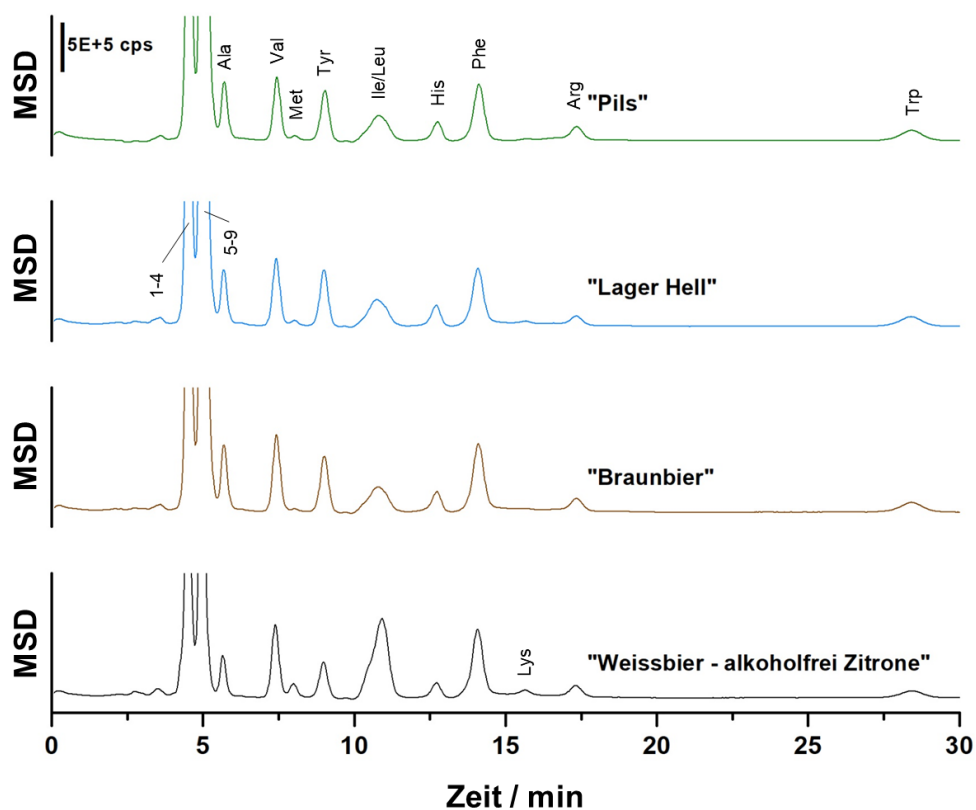


**Abbildung 20:** Methode zur Auswertung teilweise aufgelöster Isomere durch Anpassung an GAUß-Peaks.

Es wurde eine externe Kalibration im Spuren- ( $\mu\text{M}$ ) und Standardarbeitsbereich ( $\text{mM}$ ) durchgeführt, wobei Bestimmtheitsmaße von  $\geq 0,9996$  und eine relative Standardabweichung der ermittelten Peakflächen von weniger als 8 % ( $n = 10$ ) erhalten wurden. Der Effekt der Ionen-Suppression wurde untersucht, indem gestaffelte Standards, in denen alle Analyten vollständig voneinander getrennt werden konnten, mit einer Mischung aller Zielanalyten verglichen wurden. Dabei wurde für 15 der 20 untersuchten Aminosäuren eine Wiederfindung von  $100 \pm 15$  % erhalten. Ein starker Einfluss koeluiender Analyten auf die Ionisierung in der Elektrosprayquelle wurde hingegen für die Komponenten mit geringen Retentionszeiten erhalten. Im Vergleich zur photometrischen Detektion konnte gezeigt werden, dass die massenspektrometrische Detektion Vorteile in Bezug auf das Signal-Rausch-Verhältnis und die Richtigkeit der Ergebnisse hat. Außerdem wiesen nur fünf der untersuchten Aminosäuren eine ausreichende Absorption bei 195 nm auf.

Mit Hilfe dieser Methode wurde das Aminosäureprofil verschiedener Biersorten quantitativ bestimmt. Die erhaltenen Peakformen im Gesamt- und Einzelionenchromatogramm sowie die Stabilität der Retentionszeiten im Vergleich zu einem Aminosäurestandardgemisch zeigt die hohe Matrixkompatibilität der entwickelten Methode (Abb. 21). Prolin lag mit einer mittleren Konzentration von 3,25 mM in der höchsten Menge vor, gefolgt von Alanin (0,79 mM). In

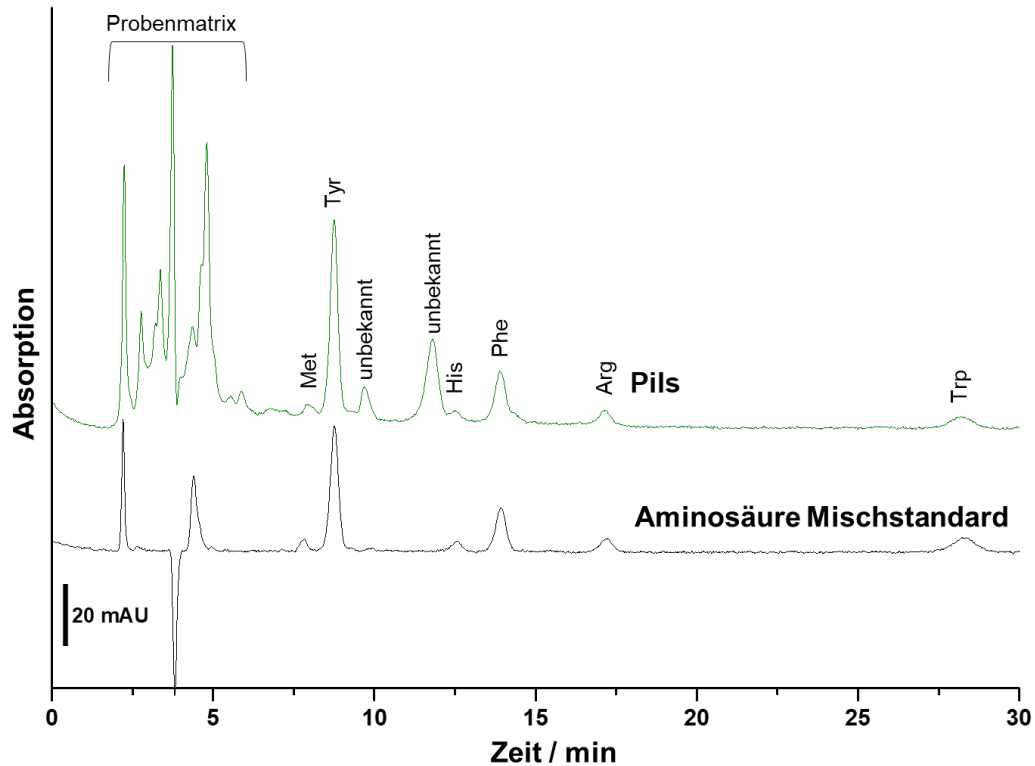
einem beispielhaften Biermischgetränk mit einem Bieranteil von 50 % wurde ein geringerer Gesamtgehalt an Aminosäuren identifiziert, wobei die Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Aminosäuren geringer waren. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten eine hohe Übereinstimmung mit Vergleichsmethoden.<sup>[33,43,45,46,170]</sup> Im Rahmen von regelmäßigen Anwendungen der Methode für Quantifizierungen in Realproben wurde die Stabilität der Retentionszeiten über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren nachgewiesen.



**Abbildung 21:** Analyse verschiedener Bierproben mittels IC-ESI-MS.

Die Fähigkeit der Methode, Matrixbestandteile von den Zielanalyten zu trennen, wurde mittels photometrischer Detektion untersucht, um einen Einblick über die Gesamtheit der simultan eluierenden Substanzen zu erhalten. Beim Vergleich einer Standardlösung mit einer Realprobe konnte eine Vielzahl zusätzlicher Signale identifiziert werden (Abb. 22). Koelutionen mit den zu quantifizierenden Analyten wurden allerdings nur für schwach retardierte Aminosäuren beobachtet, da die meisten Matrixbestandteile entweder im Totvolumen oder innerhalb der ersten fünf Minuten des Laufs eluierten.





**Abbildung 22:** Trennung von Analyten und Matrix am Beispiel einer Bierprobe und Nachweis mittels photometrischer Detektion.

Die entwickelte Methode ist dazu geeignet, 20 kanonische Aminosäuren im typischen Konzentrationsprofil einer Bierprobe und in Gegenwart einer komplexen Probenmatrix zu quantifizieren. Durch die orthogonale Selektivität zu bestehenden Methoden und die geringen instrumentellen Anforderungen ergibt sich eine Eignung für Routineanalysen und die Validierung bestehender Verfahren.

### Erklärung des Eigenanteils

Konzeption und Methodik des Manuskripts stammen von mir. Qualitative Messungen wurden von mir durchgeführt. A. Seubert unterstützte bei der Aufnahme der quantitativen Messdaten. Die quantitative Studie wurde von mir ausgewertet und interpretiert. Zusammen mit F. Fillsack wurde die Analyse überlagernder Signale durchgeführt und visualisiert. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von mir verfasst. A. Seubert editierte das Manuskript und übernahm die Einreichung.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des vorliegenden Promotionsprojektes wurden polymerbasierte Kationenaustauscher entwickelt, die als stationäre Phase zur Trennung organischer Kationen verwendet und direkt mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie gekoppelt werden können. Die Ergebnisse gliedern sich in ein modulares Funktionalisierungskonzept zur Herstellung stationärer Phasen, materialchemische und chromatographische Methoden zur Charakterisierung ihrer Eigenschaften sowie die Herstellung angepasster Trennsäulen und deren Anwendung auf aktuelle Trennprobleme.

Dazu wurde eine Reihe von Kationenaustauschern auf Basis makroporöser Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymerpartikel (PS/DVB) synthetisiert, die sich in der Anzahl von schwach sauren Carbonsäuregruppen und stark sauren Sulfonsäuregruppen unterscheiden. Mithilfe modular kombinierter Kleinmolekülreaktionen wurde der Funktionalisierungsgrad für beide Typen von Austauschergruppen unabhängig voneinander eingestellt. Diese gemischt-funktionalen Materialien vereinen Charakteristika beider Austauschergruppen, die beide signifikant zu den elektrostatischen Wechselwirkungen des Materials mit ionischen Analyten beitragen. Dies wurde durch die Abhängigkeit der Retention von Kaliumkationen vom pH-Wert der mobilen Phase bestätigt.

Am Beispiel der kanonischen Aminosäuren wurde gezeigt, dass die unterschiedlichen Austauschergruppen auf verschiedene Eigenschaften der Analyten ansprechen. Durch eine geringfügige Veränderung des Sulfonierungsgrades konnte sowohl die Gesamtretention gesteuert als auch die Selektivität zwischen neutralen und hochgeladenen basischen Aminosäuren eingestellt werden. Aufgrund von Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Trägermaterial konnte außerdem die Retention der hydrophoben Aminosäuren durch Anpassung der organischen Komponente in der mobilen Phase selektiv gesteuert werden. Die Kombination aus dieser neuen Säulenchemie mit optimiertem Verhältnis von stark zu schwach sauren Austauschergruppen und einer angepassten mobilen Phase ermöglichte die Trennung von 20 underivatisierten, kanonischen Aminosäuren unter isokratischen Bedingungen in 30 Minuten.

Um den Einfluss des Trägermaterials auf den Retentionsmechanismus detaillierter zu charakterisieren, wurde die Retention von Modellsubstanzen unter standardisierten Bedingungen unter Verwendung binärer mobiler Phasen von Wasser und Acetonitril charakterisiert. Diese chromatographischen Tests zeigten für einen exemplarischen gemischt-

funktionalen Kationenaustauscher neben dem erwarteten Kationenaustausch (CEX) auch typische Merkmale von Verteilungschromatographie. Je nach Polarität der mobilen Phase konnten ungeladene Alkylbenzole entsprechend dem Mechanismus der Umkehrphasenchromatographie (RPLC) oder Nukleosidderivate entsprechend der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) getrennt werden. Anhand der ermittelten Selektivitätsparameter wurden erstmals multimodale Eigenschaften (RPLC/CEX/HILIC) polymerbasierter Kationenaustauscher beschrieben.

Zur Erklärung dieses Verhaltens wurde die räumliche Verteilung der unterschiedlichen funktionellen Gruppen innerhalb des Materials mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bestimmt, indem die ionischen Austauschergruppen mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 selektiv markiert wurden. Die beobachtete homogene Verteilung beider polarer Gruppen in den Partikeln sorgt für die Hydrophilisierung des Materials und ermöglicht die Anreicherung von Wasser auf der Oberfläche.

Die Bestimmung von Überschussadsorptionsisothermen ermöglichte die systematische Untersuchung der Lösungsmittelanreicherung sowie ihre Abhängigkeit vom Funktionalisierungsgrad des Materials. Mittels der *minor disturbance* Methode wurde für die gemischt-funktionalisierte stationäre Phase abhängig von der Zusammensetzung der mobilen Phase eine Anreicherung von Wasser oder Acetonitril auf der Materialoberfläche nachgewiesen. Dieses Verhalten ist typisch für multimodale Materialien und bestätigt das beobachtete Retentionsverhalten der Modellanalyten fundamental. Innerhalb der untersuchten Reihe gemischt-funktionalisierter Kationenaustauscher wurden mit steigendem Sulfonierungsgrad (bis 0,27 % w/w Schwefel) keine signifikanten Änderungen der Adsorptionsisothermen beobachtet, die ein Indikator für die Polarität des Materials sind. Stattdessen wurde durch den Vergleich mit unfunktionalisiertem und nur sulfoniertem PS/DVB die Carboxylierung als entscheidender Schritt zur Erhöhung der Hydrophilie identifiziert. Grund dafür ist die stark unterschiedliche Anzahl beider funktioneller Gruppen im gemischt-funktionalisierten Material. Kleine Mengen an Sulfonsäuregruppen haben daher kaum Einfluss auf die Materialpolarität, wohingegen elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund der vollständigen Dissoziation stark beeinflusst werden. Das modulare Funktionalisierungskonzept ermöglicht somit die Herstellung multimodaler Säulen mit einstellbaren Eigenschaften, da die Gewichtung von Verteilungs- und Ionenaustauschmechanismus unabhängig voneinander steuerbar ist. Dies wurde durch die Erweiterung der durchgeführten Selektivitätstests auf die gesamte Materialbibliothek bestätigt.

Neben dem Einfluss auf den Retentionsmechanismus wurde untersucht, wie die Funktionalisierung die Homogenität des Packungsmaterials beeinflusst. Dies ist ein wesentliches Kriterium für die Effizienz und Signalsymmetrie einer Trennsäule. Dazu wurden die Austauschergruppen mit Bariumkationen markiert und stark verdünnte Partikelsuspensionen mittels induktiv gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS) im Einzelpartikelmodus (sp) untersucht. Anhand der Masse von Bariummarkern in einzelnen Partikeln wurde die Interpartikelhomogenität bestimmt. Die Korrelation einer Durchschnittsanalyse von Schwefel mit den Einzelpartikeldaten der Bariummarker bestätigte die Aussagekraft dieser indirekten Methode zur Kontrolle der Materialfunktionalisierung. Die entwickelten Kationenaustauscher zeichneten sich durch eine homogene Intensitätsverteilung aus, die durch Mikroskopiedaten der Partikel bestätigt wurde. Außerdem konnte die Heterogenität einer Referenzprobe in Bezug auf Partikelgrößenverteilung und Funktionalisierung mit der sp-ICP-MS Methode nachgewiesen werden. Die ermittelte Heterogenität der Materialien korrelierte zusätzlich mit der Effizienz von Beispieltrennungen, die anhand der Bodenzahlen bestimmt wurde. Methodisch wurde für diese Untersuchung ein automatisiertes Fließinjektionsverfahren eingeführt und ein neuartiges beheiztes Probeneintragssystem erstmals an Mikropartikeln getestet, womit einerseits die Robustheit erhöht und andererseits die Effizienz des Probeneintrags von weniger als 1 % auf 60 % gesteigert werden konnte.

Das vorgestellte Funktionalisierungskonzept und das erlangte Verständnis der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen wurden abschließend zur quantitativen Bestimmung der 20 kanonischen Aminosäuren in Bierproben angewendet. Die für das Trennproblem optimierte stationäre Phase wurde mit einer mobilen Phase betrieben, die eine direkte Kopplung mit Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) ermöglicht. Alle Analyten konnten im Spuren- ( $\mu\text{M}$ ) und Standardarbeitsbereich (mM) kalibriert und quantifiziert werden. Die optimierte Selektivität ermöglichte eine derivatisierungsfreie Analyse, die eine hohe Toleranz gegenüber komplexen Probenmatrices zeigte. Die teilweise Auflösung des kritischen Isomerenpaares Leucin und Isoleucin ermöglichte deren Bestimmung durch vertikale Peaktrennung oder Anpassung an GAUß-Funktionen ohne die Verwendung von MS/MS-Detektoren.

Durch das Design eines simplen und modularen Materialsystems wurde somit das Verständnis fundamentaler Prozesse an Kationenaustauschern verbessert, da eine große Bandbreite unterschiedlicher Experimente miteinander in Bezug gesetzt werden konnte. Durch die systematische Variation von einzelnen Säulenparametern, Analyt- und Eluenteigenschaften

wurden Zusammenhänge zwischen dem Aufbau und den Trenneigenschaften der Kationenaustauscher hergeleitet. Dieses Wissen wurde genutzt, um das Potential polymerbasierter Kationenaustauscher für die Analyse organischer Kationen mit multimodalem Retentionsmechanismus unter Verwendung von MS-Detektion am Beispiel von Aminosäuren zu zeigen. Die vorgestellten Materialien zeichnen sich durch die besondere Stabilität und die Steuerbarkeit der Selektivität aus.

## **Ausblick**

Der Anwendungsbereich der entwickelten Säulenchemie wurde in studentischen Forschungsprojekten in die Bereiche Lebensmittel-, Umwelt- und Elementspeziesanalyse erweitert. Hierbei konnten kationische Pestizide, Triazine und Nitrosamine in hochionischen Matrices analysiert werden. Außerdem wurde eine Methode zur Analyse von Arsen- und Selenspezies entwickelt. Die für die jeweiligen Analyten optimierten Trennsäulen wurden dabei mit MS/MS- und ICP-MS-Detektion gekoppelt. Die Anwendung und Validierung dieser Methoden auf ein Set relevanter Realproben stellt einen Anknüpfungspunkt an die Ergebnisse dieser Arbeit dar.

Auf methodischer Seite ist die weitere Optimierung der Einzelpartikelanalyse mittels ICP-MS für unterschiedliche funktionelle Gruppen wie beispielsweise Anionenaustauscher sowie des beheizten Probeneintragssystems von Interesse. Außerdem könnte die sp-ICP-MS Methode angewendet werden, um bromhaltige Initiatoren und Reste von Kupferkatalysatoren in mittels radikalischer Atomtransferpolymerisation hergestellten Materialien zu bestimmen.

Um die Wechselwirkungen der pH-Wert-abhängigen funktionellen Gruppen untereinander genauer zu beschreiben, ist zusätzlich eine pH-Wert abhängige Durchführung der chromatographischen Charakterisierungsmethoden, Kapazitätsbestimmungen und Überschussadsorptionsisothermen denkbar.

Während die relative Einfachheit des Materialsystems in der vorliegenden Arbeit die Etablierung neuer Methodiken und Konzepte ermöglichte, ist die schrittweise Erweiterung der Säulenchemie um weitere modulare Komponenten von Interesse. Basierend auf der durchgeführten Variation der Austauschergruppen können in Folgearbeiten zusätzlich Phosphonsäuren und Dicarbonsäuren mit einem Abstand von zwei Kohlenstoffatomen genutzt werden, um den Einfluss des  $pK_s$ -Wertes der Austauschergruppe genauer zu untersuchen. Mit den vorgeschlagenen funktionellen Gruppen würde die große Lücke in der Azidität der in dieser Arbeit verwendeten Austauschergruppen geschlossen und im Idealfall eine nach Art, Anzahl

und  $pK_s$ -Wert der funktionellen Gruppen quasi-kontinuierlich modifizierbare Materialplattform entwickelt werden. Dazu sind allerdings neue Funktionalisierungsmethoden zur Einführung dieser Gruppen notwendig, die mit den bisher verwendeten Reaktionen kompatibel sind und eine Variation des Funktionalisierungsgrades erlauben. Aussichtsreiche Reaktionen dafür bietet beispielsweise die Click-Chemie. An dieser Stelle ist auch ein zusätzlicher Einbau von zwitterionischen Gruppen oder Anionenaustauschern denkbar, um die multimodalen Eigenschaften weiter zu untersuchen.

Eine weitere Dimension, in der die vorgestellte Materialchemie erweitert werden kann, ist die Polarität des Substrats durch die Anwendung einer in der Arbeitsgruppe SEUBERT bereits etablierten Technik zur Hydrophilisierung von PS/DVB. Durch die kombinierte Variation von Substrat und Austauschergruppen kann ein breiterer Bereich möglicher Material- und Trenneigenschaften abgedeckt werden, während die hohe Stabilität des Polymersubstrats erhalten bleibt. Die Variierbarkeit könnte zusätzlich durch die Steuerung von Materialkapazität, lokaler Ladungsdichte und dem Ort der Funktionalisierung durch die Anwendung von Kettenpolymerisierungen erhöht werden.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2016**.
- [2] P. R. Haddad, P. N. Nesterenko, W. Buchberger, *Recent developments and emerging directions in ion chromatography*, *Journal of Chromatography A*, **2008**, *1184*, 456–473.
- [3] J. Pang, Y. Huang, Y. Liu, W. Huang, *Applications of ion chromatography in urine analysis: A review*, *Journal of Chromatography A*, **2023**, *1706*, 464231.
- [4] X. Liu, Y. Wang, H. Cong, Y. Shen, B. Yu, *A review of the design of packing materials for ion chromatography*, *Journal of Chromatography A*, **2021**, *1653*, 462313.
- [5] A. V. Zatirakha, A. D. Smolenkov, O. A. Shpigun, *Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: A review*, *Analytica Chimica Acta*, **2016**, *904*, 33–50.
- [6] C. Bruggink, D. Jensen, *Combining ion chromatography with mass spectrometry and inductively coupled plasma-mass spectrometry: Annual review 2020*, *Analytical Science Advances*, **2021**, *2*, 238–249.
- [7] D. I. S. Kolberg, D. MacK, M. Anastassiades, M. T. Hetmanski, R. J. Fussell, T. Meijer, H. G. J. Mol, *Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**, *404*, 2465–2474.
- [8] D. Li, W. Huang, R. Huang, *Analysis of environmental pollutants using ion chromatography coupled with mass spectrometry: A review*, *Journal of Hazardous Materials*, **2023**, *458*, 131952.
- [9] H. S. A. Yates, J. F. Carter, N. L. Hungerford, M. T. Fletcher, *Ion chromatography and ion chromatography / mass spectrometry as a complementary analysis technique for amino acid analysis in food, a review*, *Food Chemistry Advances*, **2023**, *3*, 100415.
- [10] S. Knoll, T. Rösch, C. Huhn, *Trends in sample preparation and separation methods for the analysis of very polar and ionic compounds in environmental water and biota samples*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2020**, *412*, 6149–6165.
- [11] G. Marrubini, P. Appelblad, M. Maietta, A. Papetti, *Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review*, *Food Chemistry*, **2018**, *257*, 53–66.

- [12] S. Ferré, V. González-Ruiz, D. Guillarme, S. Rudaz, *Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends*, *Journal of Chromatography B*, **2019**, *1132*, 121819.
- [13] P. Krumpochova, B. Bruyneel, D. Molenaar, A. Koukou, M. Wuhrer, W. M. A. Niessen, M. Giera, *Amino acid analysis using chromatography-mass spectrometry: An inter platform comparison study*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2015**, *114*, 398–407.
- [14] A. A. Kazarian, M. R. Taylor, P. R. Haddad, P. N. Nesterenko, B. Paull, *Ion-exchange and hydrophobic interactions affecting selectivity for neutral and charged solutes on three structurally similar agglomerated ion-exchange and mixed-mode stationary phases*, *Analytica Chimica Acta*, **2013**, *803*, 143–153.
- [15] D. V. McCalley, *A study of column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography*, *Journal of Chromatography A*, **2018**, *1554*, 61–70.
- [16] A. P. Vilches, S. H. Norström, D. Bylund, *Direct analysis of free amino acids by mixed-mode chromatography with tandem mass spectrometry*, *Journal of Separation Science*, **2017**, *40*, 1482–1492.
- [17] S. Wernisch, S. Pennathur, *Evaluation of coverage, retention patterns, and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, *408*, 6079–6091.
- [18] M. Lämmerhofer, M. Richter, J. Wu, R. Nogueira, W. Bicker, W. Lindner, *Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes*, *Journal of Separation Science*, **2008**, *31*, 2572–2588.
- [19] J. B. Ngere, K. H. Ebrahimi, R. Williams, E. Pires, J. Walsby-Tickle, J. S. O. McCullagh, *Ion-Exchange Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Life Science, Environmental, and Medical Research*, *Analytical Chemistry*, **2023**, *95*, 152–166.
- [20] J. Walsby-Tickle, J. Gannon, I. Hvinden, C. Bardella, M. I. Abboud, A. Nazeer, D. Hauton, E. Pires, T. Cadoux-Hudson, C. J. Schofield, et al., *Anion-exchange chromatography mass spectrometry provides extensive coverage of primary metabolic pathways revealing altered metabolism in IDH1 mutant cells*, *Communications Biology*, **2020**, *3*, 1–12.



- [21] A. Le, J. Mak, T. M. Cowan, *Metabolic profiling by reversed-phase/ion-exchange mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2020**, *1143*, 122072.
- [22] K. Nakatani, Y. Izumi, M. Takahashi, T. Bamba, *Unified-Hydrophilic-Interaction/Anion-Exchange Liquid Chromatography Mass Spectrometry (Unified-HILIC/AEX/MS): A Single-Run Method for Comprehensive and Simultaneous Analysis of Polar Metabolome*, *Analytical Chemistry*, **2022**, *94*, 16877–16886.
- [23] GESTIS Stoffdatenbank, <https://gestis.dguv.de/>, zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [24] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 96. Auflage, CRC Press, Boca Raton, **2016**
- [25] D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids*, *Analytical Chemistry*, **1958**, *30*, 1190–1206.
- [26] Hitachi, *AminoSAAYA product manual*, [https://www.hitachi-hightech.com/global/product\\_detail/?pn=ana-la8080](https://www.hitachi-hightech.com/global/product_detail/?pn=ana-la8080), zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [27] S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein, *Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system*, *Analytical Chemistry*, **1958**, *30*, 1185–1190.
- [28] Metrohm AG, *Amino acid analyzer - Automated analysis of amino acids*, **2020**, <https://www.metrohm.com/en/documents/89435001>, zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [29] C.-N. Mais, L. Hermann, F. Altegoer, A. Seubert, A. A. Richter, I. Wernersbach, L. Czech, E. Bremer, G. Bange, *Degradation of the microbial stress protectants and chemical chaperones ectoine and hydroxyectoine by a bacterial hydrolase-deacetylase complex*, *Journal of Biological Chemistry*, **2020**, *295*, 9087–9104.
- [30] R. Michalski, M. Balcerzak, J. Mattusch, K. Fischer, K. Kosaka, A. K. Jagielski, M. Usarek, J. Gandhi, W. Frenzel, *Applications of IC-MS and IC-ICP-MS in environmental research*, 1. Auflage, Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2016**.
- [31] S. M. Rutherford, G. S. Gilani, *Amino Acid Analysis*, *Current Protocols in Protein Science*, **2009**, *11*, 1–37.
- [32] G. Sharma, S. V. Attri, B. Behra, S. Bhisikar, P. Kumar, M. Tajeja, S. Sharda, P. Singhi, S. Singhi, *Analysis of 26 amino acids in human plasma by HPLC using AQC as derivatizing agent and its application in metabolic laboratory*, *Amino Acids*, **2014**, *46*,

- 1253–1263.
- [33] B. Bollig, G. J. Schad, R. Ludwig, B. T. Erxleben, *Fast and Simple Determination of Free Amino Acids in Beer*, *The Column*, **2015**, *10*, 16–20.
- [34] E. de J. Zapata Flores, K. Herodes, I. Leito, *Comparison of the ionisation mode in the determination of free amino acids in beers by Liquid Chromatography tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, **2022**, 1677.
- [35] L. Sonnenschein, A. Seubert, *Separation of  $\alpha$ -amino acids using a series of zwitterionic sulfobetaine exchangers*, *Journal of Chromatographic Science*, **2011**, *49*, 589–595.
- [36] M. Kato, H. Kato, S. Eyama, A. Takatsu, *Application of amino acid analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with isotope dilution mass spectrometry for peptide and protein quantification*, *Journal of Chromatography B*, **2009**, *877*, 3059–3064.
- [37] Z.-Y. Wu, J. Liu, H. Shi, P. J. Marriott, *The retention behaviour of amino acids in hydrophilic interaction liquid chromatography on zwitterionic stationary phases*, *Journal of Separation Science*, **2013**, *36*, 2217–2222.
- [38] Y. Pan, J. Li, X. Li, J. Chen, G. Bai, *Determination of free amino acids in *isatidis radix* by HILIC-UPLC-MS/MS*, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2014**, *35*, 197–203.
- [39] Q. Zhao, X. Bian, C. Shan, J. Cheng, C. Wang, Y. Xu, M. Xu, H. Yan, D. Qian, J. Duan, *Quantitative analysis of nutrients for nucleosides, nucleobases, and amino acids hidden behind five distinct regions-derived *Poria cocos* using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole linear ion-trap tandem mass spectrometry*, *Journal of Separation Science*, **2022**, *45*, 4039–4051.
- [40] A. Periat, I. S. Krull, D. Guillarme, *Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins*, *Journal of Separation Science*, **2015**, *38*, 357–367.
- [41] J. Gao, R. Helmus, C. Cerli, B. Jansen, X. Wang, K. Kalbitz, *Robust analysis of underivatized free amino acids in soil by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, **2016**, *1449*, 78–88.
- [42] H. C. M. T. Prinsen, B. G. M. Schiebergen-Bronkhorst, M. W. Roeleveld, J. J. M. Jans,

- M. G. M. de Sain-van der Velden, G. Visser, P. M. van Hasselt, N. M. Verhoeven-Duif, *Rapid quantification of underivatized amino acids in plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled with tandem mass-spectrometry*, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **2016**, *39*, 651–660.
- [43] I. Kabelová, M. Dvořáková, H. Čížková, P. Dostálek, K. Melzoch, *Determination of free amino acids in beers: A comparison of Czech and foreign brands*, *Journal of Food Composition and Analysis*, **2008**, *21*, 736–741.
- [44] S. Gómez-Alonso, I. Hermosín-Gutiérrez, E. García-Romero, *Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, *55*, 608–613.
- [45] M. E. Benvenuti, P. Hong, *Determination of amino acids in beers using the UPLC amino acid analysis solution*, *Waters Application Note*, **2007**, <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002158en.pdf>, zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [46] B. Redruello, V. Ladero, B. del Rio, M. Fernández, M. C. Martín, M. A. Alvarez, *A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer*, *Food Chemistry*, **2017**, *217*, 117–124.
- [47] H. M. Bettenhausen, L. Barr, C. D. Broeckling, J. M. Chaparro, C. Holbrook, D. Sedin, A. L. Heuberger, *Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability*, *Food Research International*, **2018**, *113*, 487–504.
- [48] H. E. Anderson, T. Liden, B. K. Berger, K. A. Schug, *Target profiling of beer styles by their iso- $\alpha$ -acid and phenolic content using liquid chromatography–quadrupole time-of-flight–mass spectrometry*, *Journal of Separation Science*, **2021**, *44*, 2764–2772.
- [49] K. Nalazek-Rudnicka, P. Kubica, A. Wasik, *Discrepancies in determination of biogenic amines in beer samples by reversed phase and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, *Microchemical Journal*, **2020**, *159*, 105574.
- [50] T. H. Walter, B. A. Alden, K. Berthelette, J. A. Field, N. L. Lawrence, J. McLaughlin, A. V. Patel, *Characterization of a highly stable zwitterionic hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on hybrid organic–inorganic particles*, *Journal*

- of Separation Science, **2022**, *45*, 1389–1399.
- [51] A. A. Loshin, A. D. Smolenkov, O. A. Shpigun, *Porous Polymeric Substrates Based on a Styrene–Divinylbenzene Copolymer for Reversed-Phase and Ion Chromatography*, Moscow University Chemistry Bulletin, **2022**, *77*, 68–89.
- [52] K. Qian, Z. Yang, F. Zhang, B. Yang, P. K. Dasgupta, *Low-Bleed Silica-Based Stationary Phase for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, Analytical Chemistry, **2018**, *90*, 8750–8755.
- [53] P. J. Dumont, J. S. Fritz, *Ion chromatographic separation of alkali metals in organic solvents*, Journal of Chromatography A, **1995**, *706*, 149–158.
- [54] T. K. Chambers, J. S. Fritz, *Effect of polystyrene-divinylbenzene resin sulfonation on solute retention in high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **1998**, *797*, 139–147.
- [55] A. Seubert, J. S. Tripp, R. Aeschlimann, M. Ott, *Method for Generating a Hydrophilic Surface on PS/DVB Copolymer Particles*, Patent WO2020208026A1, **2020**.
- [56] Y. Shen, H. Geng, F. Zhang, Z. Li, B. Yang, *A polyethyleneimine-functionalized polymer substrate polar stationary phase*, Journal of Chromatography A, **2022**, 463711.
- [57] A. S. Popov, K. A. Spiridonov, A. S. Uzhel, A. D. Smolenkov, A. V. Chernobrovkina, A. V. Zatirakha, *Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly(styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography*, Journal of Chromatography A, **2021**, *1642*, 462010.
- [58] H. Geng, Z. Wang, F. Zhang, Z. Li, B. Yang, *A hyperbranched polyglycerol-functionalized polymer polar stationary phase*, Journal of Chromatography A, **2022**, *1670*, 462946.
- [59] Z. Li, S. Li, F. Zhang, H. Geng, B. Yang, *A hydrolytically stable amide polar stationary phase for hydrophilic interaction chromatography*, Talanta, **2021**, *231*, 122340.
- [60] X. Liu, Y. Jiang, F. Zhang, Z. Li, B. Yang, *Preparation and evaluation of a polymer-based sulfobetaine zwitterionic stationary phase*, Journal of Chromatography A, **2021**, *1649*, 462229.
- [61] A. S. Rasheed, B. A. Al-Phalahy, A. Seubert, *Studies on behaviors of interactions between new polymer-based ZIC-HILIC stationary phases and carboxylic acids*, Journal

- of Chromatographic Science, **2017**, *55*, 52–59.
- [62] L. Sonnenschein, A. Seubert, *Separation of inorganic anions using a series of sulfobetaine exchangers*, Journal of Chromatography A, **2011**, *1218*, 1185–1194.
- [63] P. E. Jackson, C. A. Pohl, *Advances in stationary phase development in suppressed ion chromatography*, Trends in Analytical Chemistry, **1997**, *16*, 393–400.
- [64] A. K. Rieß, *Entwicklung stationärer Phasen für die Kationenchromatographie zur Analyse mono- und divalenter Kationen*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2009**.
- [65] B. M. De Borba, C. M. Kinchin, D. Sherman, T. K. Cook, P. K. Dasgupta, K. Srinivasan, C. A. Pohl, *Ion chromatographic determination of acidity*, Analytical Chemistry, **2000**, *72*, 96–100.
- [66] Y. Yokoyama, A. Yokokawa, K. Noguchi, T. Tanabe, *Polyfunctional low-capacity cation-exchange packing material for the separation of underivatized amino acids*, Talanta, **2013**, *103*, 245–251.
- [67] B. Yang, M. Takeuchi, P. K. Dasgupta, T. Umemura, Y. Ueki, K. I. Tsunoda, *Tailoring elution of tetraalkylammonium ions. Ideal electrostatic selectivity elution order on a polymeric ion exchanger*, Analytical Chemistry, **2007**, *79*, 769–772.
- [68] Thermo Fisher, *Specification Sheet: IonPac CS12A Cation-Exchange Column*, **2010**, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/4230-DS-IonPac-CS12A-20Apr2010-0643-12-R2.pdf>, zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [69] M. A. Rey, C. A. Pohl, *Novel cation-exchange stationary phase for the separation of amines and of six common inorganic cations*, Journal of Chromatography A, **1996**, *739*, 87–97.
- [70] Thermo Fisher, *Unique column chemistry for challenging amine separations*, **2018**, <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCMD%2FSpecification-Sheets%2Fps-72595-ionpac-cs20-cation-exchange-columns-ps72595-en.pdf>, zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [71] M. Jayaraman, C. A. Pohl, C. Saini, *Ion Exchange Chromatography Column, Method, and System Thereof*, Patent US11448626B2, **2022**.

- [72] C. A. Pohl, *Charge Reversible Ion Exchange Resins, Chromatography Column, Method, and System Thereof*, Patent US10379090B2, **2019**.
- [73] A. A. Zagorodni, *Ion Exchange Materials: Properties and Applications*, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, **2007**.
- [74] J. S. Fritz, *Factors affecting selectivity in ion chromatography*, Journal of Chromatography A, **2005**, 1085, 8–17.
- [75] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, *On the Effect of Organic Solvent Composition on the pH of Buffered HPLC Mobile Phases and the pKa of Analytes - A Review*, Separation & Purification Reviews, **2007**, 36.
- [76] A. S. Rasheed, *Influence of capacity on the retention characteristics in Zwitter Ion Chromatography (ZIC) and ZIC-Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) on four different sulfobetaine stationary phases*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2014**.
- [77] C. Liang, C. A. Lucy, *Characterization of ion chromatography columns based on hydrophobicity and hydroxide eluent strength*, Journal of Chromatography A, **2010**, 1217, 8154–8160.
- [78] P. N. Nesterenko, E. P. Nesterenko, *Hydrophobicity of polymer based anion-exchange columns for ion chromatography*, Heliyon, **2021**, 7, e07290.
- [79] S. Noga, S. Bocian, B. Buszewski, *Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods*, Journal of Chromatography A, **2013**, 1278, 89–97.
- [80] L. S. Ettre, *Nomenclature for Chromatography*, Pure and Applied Chemistry, **1993**, 65, 819–872.
- [81] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5. Auflage, John Wiley & Sons Inc, Chichester, **2010**.
- [82] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Nelson Education, Scarborough, **2013**.
- [83] A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, *A new form of chromatogram employing two liquid phases*, Biochemical Journal, **1941**, 35, 1358–1368.
- [84] P. Atkins, J. de Paula, *Physical Chemistry*, 9. Auflage. Auflage, Oxford University Press,

- New York, **2010**.
- [85] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, 3. Auflage. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [86] J. S. Fritz, D. T. Gjerde, *Ion Chromatography*, 4. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**.
- [87] M. Kolb, A. Seubert, K. H. Viehweger, C. Eith, *Praktikum der Ionenchromatographie*, Metrohm Monographie, **2003**.
- [88] P. R. Haddad, R. C. Foley, *Modelling of cation retention in ion chromatography using fixed-site and dynamically coated ion-exchange columns*, Journal of Chromatography A, **1990**, 500, 301–312.
- [89] A. Vailaya, C. Horváth, *Retention in reversed-phase chromatography: Partition or adsorption?*, Journal of Chromatography A, **1998**, 829, 1–27.
- [90] P. J. Schoenmakers, N. Mackie, R. M. L. Marques, *Optimizing separations in reversed-phase liquid chromatography by varying pH and solvent composition*, Chromatographia, **1993**, 35, 18–32.
- [91] H. A. Claessens, M. A. Van Straten, *Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **2004**, 1060, 23–41.
- [92] K. Lungfiel, A. Seubert, *Applying hydrophilicity to PS/DVB-beads via introduction of protected comonomers*, Chromatographia, **2016**, 79, 5–17.
- [93] P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet, L. Galan, *Systematic study of ternary solvent behavior in reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography, **1981**, 14, 261–284.
- [94] A. J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*, Journal of Chromatography A, **1990**, 499, 177–196.
- [95] D. V. McCalley, *Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **2017**, 1523, 49–71.
- [96] N. P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, *Water uptake on polar stationary phases under conditions for hydrophilic interaction chromatography and its relation to solute*

- retention*, Journal of Chromatography A, **2013**, 1320, 33–47.
- [97] B. Buszewski, S. Noga, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2012**, 402, 231–247.
- [98] Y. Guo, *Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)*, Analyst, **2015**, 140, 6452–6466.
- [99] P. Jandera, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review*, Analytica Chimica Acta, **2011**, 692, 1–25.
- [100] P. Jandera, P. Janás, *Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review*, Analytica Chimica Acta, **2017**, 967, 12–32.
- [101] Y. Guo, *A survey of polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography and recent progress in understanding retention and selectivity*, Biomedical Chromatography, **2022**, 36, 1–25.
- [102] Y. Guo, B. Fattal, *Relative significance of hydrophilic partitioning and surface adsorption to the retention of polar compounds in hydrophilic interaction chromatography*, Analytica Chimica Acta, **2021**, 1184, 339025.
- [103] S. M. Melnikov, A. Höltzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, *Evaluation of aqueous and nonaqueous binary solvent mixtures as mobile phase alternatives to water-acetonitrile mixtures for hydrophilic interaction liquid chromatography by molecular dynamics simulations*, Journal of Physical Chemistry C, **2015**, 119, 512–523.
- [104] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, *Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency*, Journal of Chromatography A, **2011**, 1218, 5903–5919.
- [105] J. León, E. Reubsaet, K. Jinno, *Characterisation of important interactions controlling retention behaviour of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography*, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, **1998**, 17, 157–166.
- [106] A. E. Karatapanis, Y. C. Fiamegos, C. D. Stalikas, *Study of the behavior of water-soluble vitamins in HILIC on a diol column*, Chromatographia, **2010**, 71, 751–759.



- [107] H. A. Claessens, M. A. Van Straten, C. A. Cramers, M. Jezierska, B. Buszewski, *Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **1998**, 826, 135–156.
- [108] J. L. E. Reubsæet, R. Vieskar, *Characterisation of  $\pi$ - $\pi$  interactions which determine retention of aromatic compounds in reversed-phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **1999**, 841, 147–154.
- [109] N. P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, *Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A, **2011**, 1218, 5880–5891.
- [110] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, *Chromatographic characterization of silica C18 packing materials. correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase*, Journal of Chromatographic Science, **1989**, 27, 721–728.
- [111] N. Y. Chikurova, D. S. Prosuntsova, A. N. Stavrianidi, S. M. Staroverov, I. A. Ananieva, A. D. Smolenkov, A. V. Chernobrovkina, *Novel Mixed-Mode Adsorbents for HPLC Based on Different Substrates Modified with Eremomycin*, Journal of Analytical Chemistry, **2023**, 78, 592–604.
- [112] M. Ferri, S. Bäurer, A. Carotti, M. Wolter, B. Alshaar, J. Theiner, T. Ikegami, C. West, M. Lämmerhofer, *Fragment-based Design of Zwitterionic, Strong Cation- and Weak Anion-Exchange Type Mixed-mode Liquid Chromatography Ligands and their Chromatographic Exploration*, Journal of Chromatography A, **2020**, 1621, 17–19.
- [113] A. Tchaplá, H. Colin, G. Guiochon, *Linearity of Homologous Series Retention Plots in Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Analytical Chemistry, **1984**, 56, 621–625.
- [114] A. Steinhoff, A. Hölzel, N. Trebel, U. Tallarek, *Mobile-Phase Contributions to Organic-Solvent Excess Adsorption and Surface Diffusion in Reversed-Phase Liquid Chromatography*, Journal of Physical Chemistry B, **2022**, 126, 10554–10568.
- [115] P. Vajda, A. Felinger, G. Guiochon, *Evaluation of surface excess isotherms in liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **2013**, 1291, 41–47.
- [116] P. Vajda, A. Felinger, A. Cavazzini, *Adsorption equilibria of proline in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A, **2010**, 1217, 5965–5970.
- [117] F. Gritti, G. Guiochon, *Adsorption behaviors of neutral and ionizable compounds on*

- hybrid stationary phases in the absence (BEH-C18) and the presence (CSH-C18) of immobile surface charges*, Journal of Chromatography A, **2013**, 1282, 58–71.
- [118] F. Gritti, G. Guiochon, *Effects of the surface concentration of fixed charges in C18-bonded stationary phases on the adsorption process and on the preparative chromatography of small ionizable compounds*, Journal of Chromatography A, **2014**, 1372, 42–54.
- [119] F. Gritti, Y. V. Kazakevich, G. Guiochon, *Effect of the surface coverage of endcapped C18-silica on the excess adsorption isotherms of commonly used organic solvents from water in reversed phase liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **2007**, 1169, 111–124.
- [120] F. Gritti, G. Guiochon, *Adsorption mechanism in RPLC. Effect of the nature of the organic modifier*, Analytical Chemistry, **2005**, 77, 4257–4272.
- [121] J. H. Knox, R. Kaliszan, *Theory of solvent disturbance peaks and experimental determination of thermodynamic dead-volume in column liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, **1985**, 349, 211–234.
- [122] J. Adolphs, M. J. Setzer, *A model to describe adsorption isotherms*, Journal of Colloid and Interface Science, **1996**, 180, 70–76.
- [123] D. Beauchemin, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, Analytical Chemistry, **2008**, 80, 4455–4486.
- [124] C. Agatemor, D. Beauchemin, *Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: A review*, Analytica Chimica Acta, **2011**, 706, 66–83.
- [125] M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, A. Bazo, E. Bolea-Fernandez, F. Vanhaecke, *Living in a transient world: ICP-MS reinvented via time-resolved analysis for monitoring single events*, Chemical Science, **2022**.
- [126] D. Beauchemin, *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, **2020**.
- [127] J. L. Todolí, J. M. Mermet, *Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS*, Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy, **2006**, 61, 239–283.
- [128] J. Mora, S. Maestre, V. Hernandis, J. L. Todolí, *Liquid-sample introduction in plasma*

- spectrometry*, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, **2003**, 22, 123–132.
- [129] T. Van Acker, S. Theiner, E. Bolea-Fernandez, F. Vanhaecke, G. Koellensperger, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, Nature Reviews Methods Primers, **2023**, 3.
- [130] J. Giner Martínez-Sierra, O. Galilea San Blas, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso, *Sulfur analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A review*, Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy, **2015**, 108, 35–52.
- [131] D. Schlegel, J. Mattusch, K. Dittrich, *Speciation of arsenic and selenium compounds by ion chromatography with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry detection using the hydride technique*, Journal of Chromatography A, **1994**, 683, 261–267.
- [132] Agilent Technologies, *Agilent 7500 Series ICP-MS*, Hardware Manual, **2008**.
- [133] S. Maher, S. U. Syed, D. M. Hughes, J. R. Gibson, S. Taylor, *Mapping the stability diagram of a quadrupole mass spectrometer with a static transverse magnetic field applied*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, **2013**, 24, 1307–1314.
- [134] P. H. Dawson, *Quadrupole mass analyzers: Performance, design and some recent applications*, Mass Spectrometry Reviews, **1986**, 5, 1–37.
- [135] J. A. Broekaert, *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*, 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [136] F. Laborda, E. Bolea, J. Jimenez-Lamana, *Singel Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis*, Analytical chemistry, **2014**, 86, 2270–2278.
- [137] D. Mozhayeva, C. Engelhard, *A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry-A step towards an ideal method for nanomaterial characterization*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, **2020**, 35, 1740–1783.
- [138] T. E. Lockwood, R. Gonzalez De Vega, D. Clases, *An interactive Python-based data processing platform for single particle and single cell ICP-MS*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, **2021**, 36, 2536–2544.
- [139] F. Laborda, C. Trujillo, R. Lobinski, *Analysis of microplastics in consumer products by single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry using the carbon-13*

- isotope*, *Talanta*, **2021**, *221*, 121486.
- [140] M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, *Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: Current developments and remaining challenges*, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **2020**, *132*, 116042.
- [141] M. Velimirovic, K. Tirez, S. Verstraelen, E. Frijns, S. Remy, G. Koppen, A. Rotander, E. Bolea-Fernandez, F. Vanhaecke, *Mass spectrometry as a powerful analytical tool for the characterization of indoor airborne microplastics and nanoplastics*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2021**, *36*, 695–705.
- [142] Mitsubishi Chemicals, *Ion Exchange Resins*, [https://www.diaion.com/en/products/hplc\\_packed\\_columns\\_and\\_packing\\_media/packed\\_columns/column\\_list/index.html](https://www.diaion.com/en/products/hplc_packed_columns_and_packing_media/packed_columns/column_list/index.html), zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [143] Thermo Fisher, *Dionex Ion Chromatography Columns*, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/chromatography/ion-chromatography-ic/ion-chromatography-columns.html>, zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [144] Metrohm AG, *Das Säulenprogramm*, **2021**, <https://www.metrohm.com/de-de/documents/80005347>, zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [145] Y. Li, P. Nesterenko, R. Stanley, B. Paull, M. Macka, *Comparison of cation-exchange capillary columns used for ion chromatographic separation of biogenic amines*, *Journal of Chromatography A*, **2018**, *1571*, 193–200.
- [146] K. Lungfiel, A. Seubert, *Varying the porous structure of polystyrene/divinylbenzene beads prepared by Ugelstads activated swelling technique and examining its reversed phase HPLC properties*, *Journal of Chromatography A*, **2014**, *1358*, 117–127.
- [147] United States Environmental Protection Agency, *Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit*, Revision 2, **2016**, [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure\\_rev2\\_12-13-2016.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure_rev2_12-13-2016.pdf), zuletzt abgerufen: 06.12.2023.
- [148] Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsche Institut für Normung e.V., *DIN 38402 Teil 51 - Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analysenergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen*, Beuth Verlag, Berlin, **1986**.

- [149] O. I. Shchukina, A. V. Zatirakha, A. D. Smolenkov, P. N. Nesterenko, O. A. Shpigun, *Anion exchangers with branched functional ion exchange layers of different hydrophilicity for ion chromatography*, *Journal of Chromatography A*, **2015**, *1408*, 78–86.
- [150] J. Jiménez-Lamana, L. Marigliano, J. Allouche, B. Grassl, J. Szpunar, S. Reynaud, *A Novel Strategy for the Detection and Quantification of Nanoplastics by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)*, *Analytical Chemistry*, **2020**, *92*, 11664–11672.
- [151] L. Marigliano, B. Grassl, J. Szpunar, S. Reynaud, J. Jiménez-Lamana, *Nanoplastic labelling with metal probes: Analytical strategies for their sensitive detection and quantification by icp mass spectrometry*, *Molecules*, **2021**, *26*.
- [152] E. Bolea-Fernandez, A. Rua-Ibarz, M. Velimirovic, K. Tirez, F. Vanhaecke, *Detection of microplastics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) operated in single-event mode*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2020**, *35*, 455–460.
- [153] Q. Li, Y. Lai, P. Li, X. Liu, Z. Yao, J. Liu, S. Yu, *Evaluating the Occurrence of Polystyrene Nanoparticles in Environmental Waters by Agglomeration with Alkylated Ferroferric Oxide Followed by Micropore Membrane Filtration Collection and Py-GC/MS Analysis*, *Environmental Science and Technology*, **2022**, *56*, 8255–8265.
- [154] Y. Lai, L. Dong, Q. Li, P. Li, Z. Hao, S. Yu, J. Liu, *Counting Nanoplastics in Environmental Waters by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy after Cloud-Point Extraction and in Situ Labeling of Gold Nanoparticles*, *Environmental Science and Technology*, **2021**, *55*, 4783–4791.
- [155] T. Van Acker, A. Rua-Ibarz, F. Vanhaecke, E. Bolea-Fernandez, *Laser Ablation for Nondestructive Sampling of Microplastics in Single-Particle ICP-Mass Spectrometry*, *Analytical Chemistry*, **2023**, accepted.
- [156] C. Trujillo, J. Pérez-Arantegui, R. Lobinski, F. Laborda, *Improving the Detectability of Microplastics in River Waters by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Nanomaterials*, **2023**, *13*, 1–16.
- [157] R. Gonzalez de Vega, S. Goyen, T. E. Lockwood, P. A. Doble, E. F. Camp, D. Clases, *Characterisation of microplastics and unicellular algae in seawater by targeting carbon*

- via single particle and single cell ICP-MS*, *Analytica Chimica Acta*, **2021**, *1174*, 338737.
- [158] F. Gelman, M. Muszyńska, J. Karasiński, O. Lev, L. Halicz, *Detection of PTFE microparticles by ICP-qMS operated in single-particle mode*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2022**, *37*, 2282–2285.
- [159] A. Williams, D. Beauchemin, *Integrating Instead of Averaging Signal Intensity to Simplify Nanoparticle Mass Measurement by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, *Analytical Chemistry*, **2020**, *92*, 12778–12782.
- [160] Z. Zhou, A. Al Hejami, M. J. Burgener, J. Burgener, D. Beauchemin, *A total consumption infrared heated sample introduction system for nanoparticle measurement using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **2022**, *37*, 1450–1454.
- [161] K. Zhang, X. Liu, *Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2016**, *130*, 19–34.
- [162] L. Zhang, Q. Dai, X. Qiao, C. Yu, X. Qin, H. Yan, *Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography*, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **2016**, *82*, 143–163.
- [163] J. E. Madden, A. Blank, C. Saini, Y. Liu, A. Zahirakha, T. F. Scientific, T. Way, *Ion Chromatography Mass Spectrometry methods for cationic polar pesticides analysis*, **2022**, 94085.
- [164] L. Barron, E. Gilchrist, *Ion chromatography-mass spectrometry: A review of recent technologies and applications in forensic and environmental explosives analysis*, *Analytica Chimica Acta*, **2014**, *806*, 27–54.
- [165] M. Jansons, I. Pugajeva, V. Bartkevics, *Evaluation of selected buffers for simultaneous determination of ionic and acidic pesticides including glyphosate using anion exchange chromatography with mass spectrometric detection*, *Journal of Separation Science*, **2019**, *42*, 3077–3085.
- [166] T. Christison, J. E. Madden, J. Rohrer, *Determination of Cationic Polar Pesticides in Homogenized Fruit and Vegetable Samples Using IC-HRAM MS*, *Dionex Application Note No. 72908*, **2019**.

- [167] R. B. Geerdink, M. Hassing, N. Ayarza, C. Bruggink, M. Wielheesen, J. Claassen, O. J. Epema, *Analysis of glyphosate, AMPA, Glufosinate and MPPA with Ion chromatography tandem mass spectrometry using A membrane suppressor in the ammonium form application to surface water of low to moderate salinity*, *Analytica Chimica Acta*, **2020**, *1133*, 66–76.
- [168] L. Zhao, Y. Lu, F. Zhang, B. Yang, *A bipolar membrane-based cation electrolytic membrane suppressor for ion chromatography*, *Journal of Chromatography A*, **2019**, *1603*, 422–425.
- [169] V. Gökmen, A. Serpen, B. A. Mogol, *Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**, *403*, 2915–2922.

## 6 Publikationen und Manuskripte

Im Folgenden sind die Publikationen und Manuskripte, die Grundlage dieser Arbeit sind, mit den jeweils veröffentlichten ergänzenden Informationen beigelegt. Für die Arbeiten I, II und IV sind die Artikel in Originalfassung angehängt. Für Publikation III wurde das Manuskript beigelegt, da der Veröffentlichungsprozess zum Zeitpunkt der Abgabe noch nicht abgeschlossen war.

- (I) M. Schmitt, M. Egorycheva, A. Seubert, *Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids*, Journal of Chromatography A, **2022**, 1664, 462790.
  
- (II) M. Schmitt, M. Egorycheva, D. Frerichs, S. Fiedler, P. L. Graumann, A. Seubert, *Factors affecting mixed-mode retention properties of cation-exchange stationary phases*, Journal of Chromatography A, **2023**, 1695, 463934.
  
- (III) M. Schmitt, Z. Zhou, E. Meiers, L. Schipplick, D. Beauchemin A. Seubert, *Characterization of metal-labeled ion-exchange microparticles using single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry*, eingereicht bei Journal of Analytical Atomic Spectrometry (28.11.2023).
  
- (IV) M. Schmitt, F. Fillsack, A. Seubert, *A simple ion chromatography-mass spectrometry method for amino acid analysis in beer*, Journal of Separation Science, **2023**, 46, 2300106.





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids

Matthias Schmitt, Marina Egorycheva, Andreas Seubert\*

Faculty of Chemistry, Analytical Chemistry, University of Marburg, Hans-Meerwein-Str. 4, 35043 Marburg, Germany



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 October 2021

Revised 17 December 2021

Accepted 25 December 2021

Available online 27 December 2021

#### Keywords:

Ion chromatography

Cation-exchange resin

Polymer functionalization

Amino acids

IC-ESI-MS

### ABSTRACT

Mixed-acidic cation-exchange (MCX) columns with both strongly (SCX) and weakly (WCX) acidic functional groups were developed for the separation of standard amino acids. The resins were prepared by carboxylation of highly crosslinked monodisperse poly(styrene-divinylbenzene) copolymer particles with performic acid and subsequent sulfonation with sulfuric acid. The degree of functionalization was varied independently for each processing step and controlled by measuring pH dependent retention of the obtained resins. A series of mixed-acidic resins with different SCX/WCX-ratios was chromatographically characterized by variation of formic acid and acetonitrile concentration in the aqueous eluent. The overall cation-exchange capacity was varied from 33 to 68  $\mu\text{mol/mL}$ . The comparison with two commercial columns (Metrohm Metrosep C6, WCX and Hamilton PRP X-200, SCX) revealed the additive character of the different functional group properties within MCX columns and a unique selectivity which can be adjusted by both eluent composition and SCX/WCX-ratio of the resin. The retention window between neutral and basic amino acids was altered by varying the amount of sulfonic acid groups attached to the polymer. Orthogonality plots demonstrated constant selectivity for neutral amino acids. Correlating the retention data with  $\log P$  data demonstrated the influence of non-ionic hydrophobic and  $\pi$ - $\pi$ -interactions for the separation of amino acids on PS/DVB-based cation-exchangers. An isocratic IC-ESI-MS method was developed to separate and quantitate 20 underivatized standard amino acids within 30 min. Limits of detection were between 4 and 64  $\text{nmol L}^{-1}$  and a high linearity of calibration curves was obtained for all analytes. The method was validated by comparing a certified reference standard with external calibration data.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ion chromatography (IC) is a widespread technique for the separation and quantification of charged analytes. Since modern IC was introduced in 1975 [1] a variety of commercially available stationary phases were developed to fulfill the requirements of specific applications [2–6]. The rapid progress in instrumentation [7–9] allowed IC to become a dominating method for the analysis of inorganic ions. Today's research in IC has a focus on the extension of the technique to more complex biologically active analytes such as amino acids. The separation of such multifunctional analytes requires optimized selectivity and a better understanding of the mixed-mode separation properties of IC columns. Therefore, new stationary phase chemistries operated with ESI-MS compatible elution systems must be developed and characterized, as presented in this work.

The analysis of standard amino acids is still dominantly performed with cation-exchange chromatography. Since the initial introduction of an automated process by Moore, Spackman and Stein in 1958, run times were reduced from around 24 h to less than one hour by continuous technical progress [10–12]. Today, commercial setups use sulfonated high capacity resins in combination with lithium citrate eluents in a complex multi-step gradient program. Photometric detection is carried out after post-column derivatization with ninhydrin [11,13]. These systems are often limited to the specific application the elution program was designed for. Furthermore, coupling with mass spectrometry is not practical due to the high concentration of non-volatile compounds in the eluent [14] but necessary for studies in biochemical and environmental research [15,16].

Reversed-phase (RP) chromatography addresses some of these drawbacks and provides sufficient and adjustable selectivity through mobile phase additives such as ion-pair reagents [17]. For the separation of amino acids a common procedure is pre-column derivatization with AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate) [18]. However, these separation methods are still prob-

\* Corresponding author.

E-mail address: [seubert@staff.uni-marburg.de](mailto:seubert@staff.uni-marburg.de) (A. Seubert).

lematic when coupled to mass-spectrometry. Additionally, there is a lack of accuracy and robustness in comparison to the analysis of underivatized amino acids due to matrix effects. Alternative strategies for amino acid separations are special stationary phase chemistries like hydrophilic interaction chromatography (HILIC) or zwitterion chromatography (ZIC) columns [19–21].

Mixed-mode chromatography is an alternative strategy to solve such special selectivity issues. Different types of functionalization are combined in one column to simultaneously offering several mechanisms of interaction (e.g. ion exchange - both anion and cation, hydrophobic, hydrophilic). Such stationary phases enable the separation of analytes with diverging properties in one chromatographic run as well as the adjustment of retention behavior for multifunctional compounds. Unfortunately, the disadvantages of each functionalization method were often combined, as well [22,23]. Recent studies describe the importance of non-ionic interactions for the separation of amino acids and other polar charged analytes in IC [24,25]. The contribution of mixed-mode effects (e.g. hydrophobic, hydrogen bonding and ion-exchange interactions) to the retention of amino acids and biogenic amines was demonstrated by Li et al. for different cation-exchange resins [25]. Popov et al. demonstrated the use of a hyperbranched PS/DVB-based anion-exchange resin in IC, RP and HILIC separation mode. Analyte properties were reported to be the dominating reason for retention and even allowed for the separation of non-charged compounds with a typical IC column [24].

Besides the growing interest and rapid progress in mixing different types of functionalization and chromatography modes the mixture of different cation-exchange sites within a resin is rarely used. Optimized selectivity and a better understanding of the mechanisms determining the separation of polar, cationic organic compounds are expected from further studies of this construction principle.

### 1.1. Cation-exchange resins with different types of functional groups

The influence of the cation-exchange functionality towards the separation of alkali and alkaline earth metal cations is well-known and is basis of the common classification into strongly and weakly acidic resins [26,27]. The combination of different exchange sites in cation-exchange chromatography, however, is an interesting, but barely described concept. Mixed-acidic functionalization with both carboxylic and sulfonic acid groups was first reported as a sulfonation byproduct by De Borba et al. in 2000 [28]. IonPac CS12A (Dionex Corporation) contains both carboxylic and phosphonic acids and was developed for the simultaneous analysis of inorganic cations and aliphatic amines [29,30].

Recently, Dionex Corporation introduced an IonPac CS20 column with carboxylic, phosphonic and sulfonic acid groups grafted to the polymer. The broad range of exchanger  $pK_a$  was utilized for the separation of amines with different organic backbones and high charge as well as inorganic cations [31]. A variation of the functional groups proportion was evaluated and determined to be a key factor for influencing the retention between different groups of analytes [32,33].

Yokoyama et al. presented a polyfunctional column material containing carboxylic acid and sulfonic acid groups for the analysis of 16 underivatized amino acids using a gradient elution program with post-column fluorescence detection. Depending on the amino acids' properties, different retention mechanisms were determined, which provide information on the separation properties of multifunctional polar cations using mixed-acidic cation-exchange resins for the first time [34].

However, combining investigations on the influence of column and eluent composition towards the separation of multifunctional

polar analytes with ESI-MS detection offers a promising tool for the study of mixed-acidic materials.

In this work, a homologous series of cation-exchange resins with different SCX/WCX-ratio was prepared, characterized and applied to the separation of amino acids to achieve further understanding of the underestimated MCX construction principle.

### 1.2. Characteristics of mixed-acidic cation-exchange (MCX) resins

Mixed-acidic cation-exchange (MCX) resins were expected to combine the high resolution of similarly charged compounds on sulfo-functionalized materials with the possibility to elute analytes with high charge differences within one chromatographic run as typical for carboxylated resins. The combination of different chemical properties of the exchange sites and their variability depending on eluent composition creates a multi-variant system with various cross-dependencies.

Firstly, the exchange sites possess different chemical properties like charge density, polarizability and hydration sphere character. These properties have been proven to significantly influence ion-exchange properties [3,35,36]. Secondly, local charge density (local capacity) varies for both types of functional groups. This very likely influences separation properties as shown by Kaltz et al. [37] for grafted anion exchange resins. Thirdly, the eluent composition has a crucial impact on the exchange group properties as eluent pH varies with both acid and organic modifier concentration along with the hydronium activity change [38]. For the outcome of the ion chromatographic experiment the eluent pH is a central property due to its impact on stationary phase capacity and analyte charge. Consequently, the IC system under investigation is characterized by the interaction between three different types of weakly acidic components (mixed-acidic column, formic acid eluent, amino acid analyte).

As the named effects take place simultaneously and are influenced by both eluent and column composition, they create the multi-variant system described. This interdependence of chromatographically relevant parameters leads to new column properties which make the ESI-MS compatible setup a promising candidate for current separation issues. The aim of this study was to demonstrate the prospects of mixed-acidic cation-exchange resins in IC for the analysis of polar, charged analytes.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and materials

The PS/DVB particles used as supporting material have 55% crosslinking and were prepared according to the procedure described by Lungfiel et al. [39,40]. The polymer particles used were highly monodisperse and had an average diameter of 4.1  $\mu\text{m}$  with a specific surface area  $A_s$  of 1100  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$  and a mean pore size  $\varphi_{50}$  of 44 nm.

Ultrapure water from a MilliQ-system (Merck-Millipore Billerica, MA, USA) was used for all experiments. Sulfuric acid (Th. Geyer, Renningen, Germany), acetic acid (Fisher Scientific, Loughborough, UK), sodium hydroxide (30% in water, Merck, Darmstadt, Germany), hydrochloric acid (VWR Chemicals, Leuven Belgium), hydrogen peroxide (35%, Carl Roth, Karlsruhe, Germany), lithium aluminum hydride pellets (reagent grade, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and ethanol (Honeywell, Mücke, Germany) were used as received. Formic acid (VWR Chemicals, Leuven, Belgium) and acetonitrile (Honeywell, Mücke, Germany) were used as received for the preparation of the ESI-MS compatible eluents. For the preparation of tetramethylammonium eluents TMA-OH (25% in water, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) was converted to its chloride form with hydrochloric acid. The eluent pH was measured us-

ing a 914 pH/Conductometer (Metrohm, Herisau, Switzerland). If not otherwise indicated, all chemicals were purchased in analytical quality.

A set of amino acids was purchased in chromatographically pure quality from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany): DL-Alanine (Ala), L-arginine (Arg), L-asparagine (Asn), DL-aspartic acid (Asp), L-cystine (Cys), L-glutamine (Gln), L-glutamic acid (Glu), L-glycine (Gly), L-histidine (His), L-isoleucine (Ile), L-leucine (Leu), L-lysine (Lys), DL-methionine (Met), DL-phenylalanine (Phe), L-proline (Pro), DL-serine (Ser), DL-threonine (Thr), DL-tryptophan (Trp), L-tyrosine (Tyr), DL-valine (Val). Amino acid standards were prepared in 4 mM HCl. A certified reference material containing 17 amino acids (Supelco®, No. 79,248, Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) was used for the determination of limits of detection (LOD). Log *P* values referring to the zwitterionic form of the amino acids were obtained from GESTIS database [41]. *pI* and *pK<sub>a</sub>* data were used from [42].

## 2.2. Preparation of the cation-exchanger

19.5 g PS/DVB were suspended and homogenized in 150 mL formic acid with a mechanical stirrer. 43 mL hydrogen peroxide (35%) were added dropwise under thermostatted conditions at 15 °C. The mixture was subsequently stirred for 65 h. After adding 200 mL water to the yellowish suspension, the polymer was filtered and washed with water. For the partial removal of carboxyl groups, a second optional step was performed, as follows. The water-free polymer powder was suspended in 200 mL dry diethyl ether and 3.5 g LiAlH<sub>4</sub> were added at 0 °C under an inert gas atmosphere. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature and was then heated for 6 h under reflux. After cooling to 0 °C the reaction was stopped by the stepwise addition of 50 mL diethyl ether, 10 mL ethyl acetate and 10 mL deionized water. The reaction mixture was suspended and subsequently filtered in each 15 mL sulfuric acid with 200 mL water, 100 mL 5% NaOH, water and 200 mL 10% acetic acid. After washing with water and acetone the functionalized polymer was dried at 60 °C [43]. As LiAlH<sub>4</sub> is a moisture sensitive compound that reacts violently with water and can be easily ignited, temperature control and inert conditions have to be applied properly. Further advice in handling LiAlH<sub>4</sub> should be taken from the material safety data sheet.

1.70 g of oxidized PS/DVB were suspended in acetic acid at room temperature. 0.1–2 mL of precooled concentrated sulfuric acid were added and the homogeneous mixture was stirred for 30 s. The reaction mixture was immediately filtered and quenched with 50 mL 3.9 M HCl. After washing and suspending the filtrate with each water, ethanol, 1.9 M NaOH, water, 1.1 M HCl and water (50 mL) the polymer was refluxed for 1 h in 150 mL water. Finally, the material was filtered and dried at 60 °C [44,45].

The functionalized polymer was slurry-packed from a diluted nitric acid suspension at 500 bar into 2 mm i.d. PEEK columns of different length (100 mm, 150 mm and 250 mm) using water as the packing solution. After 150 mL water passed through the column, PTFE frits and PEEK fittings were used to fix the packed bed.

## 2.3. Ion chromatographic characterization

**IC-ESI-MS** The amino acid separations were performed on a HPLC system coupled with an 1100 series ESI-MSD (G1946D, Agilent, Waldbronn, Germany) electrospray ionization mass spectrometer. The 1100 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) consists of a binary gradient pump (G1312A), an autosampler (G1313A), a column oven (G1316A) and a diode array detector (G1315A). Chromatographic data was processed with ChemStation version B.04.03 using statistical moments. Efficiencies were automatically calculated from ESI-MS data using the variance method.

Peak symmetry was obtained as a pseudomoment and was converted into asymmetry factors by inversion [46]. If not indicated differently, 0.2 mL/min eluent flow rate was used for all 2 mm i.d. columns.

**IC-ICP-MS** To study the separation of alkali and alkaline earth metal cations under high ionic strength elution conditions, an HPLC system was coupled to a 7900 ICP-MS (Agilent, Waldbronn, Germany) mass spectrometer. The 1260 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) was equipped with an Infinity Iso Pump (G1310B), an ALS (G1329A) autosampler and an Infinity TCC (G1316A) column oven.

## 2.4. Polymer characterization

The dry polymer was characterized by IR spectroscopy using the ATR-IR unit of a Perkin Elmer Spectrum two IR spectrometer. Elemental analysis was carried out using a vario MICRO cube (Elementar, Langenselbold, Germany) for carbon, hydrogen and nitrogen and a rapid OXY cube for oxygen. Sulfur was quantified by Schoeniger combustion with subsequent anion-chromatographic determination as sulfate from an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing absorber solution.

Cation-exchange capacity was determined by the alternated loading and displacing of hydronium ions with subsequent potentiometric titration. The automated procedure was carried out on a Merck Hitachi L-6200 (Chiyoda, Japan) quaternary pump coupled with a 709 Sampling Unit (Metrohm, Herisau, Switzerland). Potentiometric titrations were performed with an 809 Titrand using 801 stirrer and a 800 Dosino (Metrohm, Herisau, Switzerland). A recommended protocol for 2 mm i.d. columns is as follows: The column was placed between the pump and the sampling unit (used as a programmable valve). 0.1 M HCl (0.01 M HNO<sub>3</sub> for C6 column), water and 0.1 M KCl were rinsed through the column with a flow of 0.2 mL/min for 60 minutes each. The effluent was collected during the rinsing with KCl solution and was subsequently titrated against 5 mM NaOH. The column capacity was calculated under the assumption that all exchange sites were occupied with H<sup>+</sup> which were fully displaced afterwards. Results were normalized using the column inner volume.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Determination of mixed-acidic character

#### 3.1.1. FTIR spectroscopy

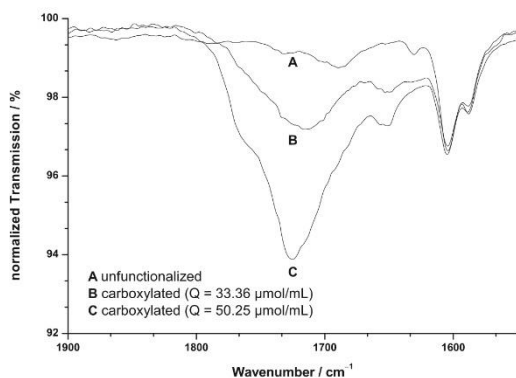
The carboxylation of the PS/DVB beads was monitored by FTIR spectroscopy using the carbonyl stretching vibration at  $\tilde{\nu} = 1725 \text{ cm}^{-1}$  [47]. Fig. 1 shows the spectra at different levels of functionalization in comparison to the unfunctionalized raw material. The cation-exchange character of these functional groups was demonstrated by the displacement of H<sup>+</sup> with K<sup>+</sup> and subsequent potentiometric titration as described in Section 2.4. FTIR transmission showed a good correlation with the measured capacities in the system under investigation.

#### 3.1.2. Resin composition

A series of cation-exchange resins based on the same batch of PS/DVB particles was prepared using two functionalization reactions that are easy to handle, adjustable and can be applied independently of each other. The degree of sulfonation was varied by changing the sulfuric acid concentration and monitored by elemental analysis of sulfur content by Schoeniger combustion with subsequent IC quantification (Table 1). The amount of carboxylic acid attached to the polymer was controlled by changing the reaction time with performic acid or additional reduction with LiAlH<sub>4</sub>.

**Table 1**  
Composition and characteristics of the cation-exchange resins.

Name	Mode	Support	Capacity / $\mu\text{mol/mL}$	Sulfonation condition (mL $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{mL}$ HAC)	(w/w)% sulfur
<i>Self-constructed columns</i>					
W1	WCX	PS/DVB	$33 \pm 1$	–	0.00
W2	WCX	PS/DVB	$50 \pm 1$	–	0.00
M1	MCX	W2	$51 \pm 3$	0.1/10	$0.09 \pm 0.00_1$
M2	MCX	W2	$52 \pm 3$	1.0/10	$0.12 \pm 0.01$
M3	MCX	W2	$59 \pm 1$	2.0/10	$0.23 \pm 0.01$
M4	MCX	W2	$68 \pm 3$	1.0/5	$0.27 \pm 0.02$
S1	SCX	PS/DVB	$22 \pm 2$	1.0/10	$0.09 \pm 0.01$
<i>Commercial columns</i>					
PRP X-200	SCX	PS/DVB	$27 \pm 2$	–	$0.31 \pm 0.03$
C6	WCX	Silica	$99 \pm 2$	–	–



**Fig. 1.** FTIR spectroscopy of base polymer and carboxylated resins: unfunctionalized PS/DVB resin (A), carboxylated polymers with different levels of functionalization (B:  $Q = 33.36 \mu\text{mol/mL}$ , C:  $Q = 50.25 \mu\text{mol/mL}$ ). The spectra were normalized on C–H stretching vibration at  $\bar{\nu} = 2922 \text{ cm}^{-1}$ .

The global cation-exchange capacity was determined by displacement experiments as described in Section 2.4. Using these reactions and characterization methods, a homologous series of mixed-acidic cation-exchange resins with variable SCX/WCX-ratio was obtained. One batch of carboxylated resin (W2) was used for all mixed-acidic columns to eliminate possible issues due to batch variance.

The presented data for the column characteristics showed only small differences within the order of standard derivation in some cases and no linear relation capacity and sulfur content especially for low degree of sulfonation. Therefore, the correlation of capacity with retention data and sulfonation conditions was used to confirm the determined composition.

In addition, two commercially available cation exchange columns were characterized and used as reference material within this study to demonstrate the novelty of separation properties on MCX columns. Metrohm Metrosep C6 (150×2.0 mm) [48] and Hamilton PRP X-200 (150×2.1 mm) [49] columns represent typical weakly and strongly acidic resins respectively.

### 3.1.3. pH dependent retention

The effect of eluent pH on chromatographic behavior was studied to demonstrate the mixed-acidic character of the chromatography resins. As retention is expected to vary significantly for carboxylic acids attached to the polymer but to remain close to constant for sulfonic acids over a wide range of pH, retention curve should reflect the column composition [3]. Chromatographic titration data is shown in Fig. 2.

Since overall retention is significantly influenced by  $\text{H}^+$  concentration below pH 2.3, data was obtained for a pH range from 2.33 to 4.84. Extensive peak broadening as reported by De Borja et al. for pH higher than five was not observed [28]. Nevertheless, equilibration times became impractically high so that the retention data at pH 4.84 had to be extrapolated with an exponential fit function for all weakly acidic and mixed-acidic cation-exchange resins. A possible explanation of this effect is the involvement of carboxylate and in case of C6 column additionally silanol groups in the chromatographic process at higher pH enabling internal reorganization and a change in accessibility inside the pores.

On the strongly acidic cation-exchange resin PRP X-200 no dependency of overall retention on eluent pH was observed. The slightly reduced retention factors observed at low pH can be explained by the contribution of  $\text{H}^+$  cations as additional eluent ion. Comparable results were obtained on the self-constructed strongly acidic cation resin (S1) indicating that the influence of carboxylation as a side reaction of sulfonation [28] is neglectable in the investigated system. Hence, pH dependency of the resins has to be explained by their mixed-acidic character.

Metrosep C6 as a commercially available weakly acidic cation-exchanger showed the expected sigmoidal curve progression for pH -  $k'$  plots. Increased amounts of weakly acidic exchange sites (W1, W2) enlarged the pH dependency of retention as an indicator for column capacity and influence the curves inflection point. The series of mixed-acidic columns showed a pH dependent retention that is similar to the carboxylated resin (W2) used as starting material. Increasing amounts of sulfonic acid groups led to a constant retention offset over the full pH range under investigation, which is consistent with the column composition (3.1.2). Conclusively, this additive character of the properties of strongly and weakly acidic exchange sites makes MCX columns promising candidates for obtaining novel separation selectivity as column characteristics can be adjusted by both resin composition and eluent pH.

### 3.2. Chromatographic characterization

Organic modifier and formic acid concentration were varied systematically to study and compare fundamental characteristics of the stationary phases. The retention data for Lys, Phe, Ser, Asp-were used as models for basic, neutral-hydrophobic, neutral-hydrophilic and acidic amino acids. The other analytes within group show comparable trends in their chromatographic behavior (supplementary material).

Fig. 3 shows the relation between the retention factor and formic acid concentration in the eluent for the selected mixed-acidic column in comparison to commercially available strongly and weakly acidic cation-exchange resins. Classical ion-exchange model predicts straight lines from which the analyte charge could be determined in comparison to the eluting ion (i.e.  $\text{H}^+$ ) [34,50].

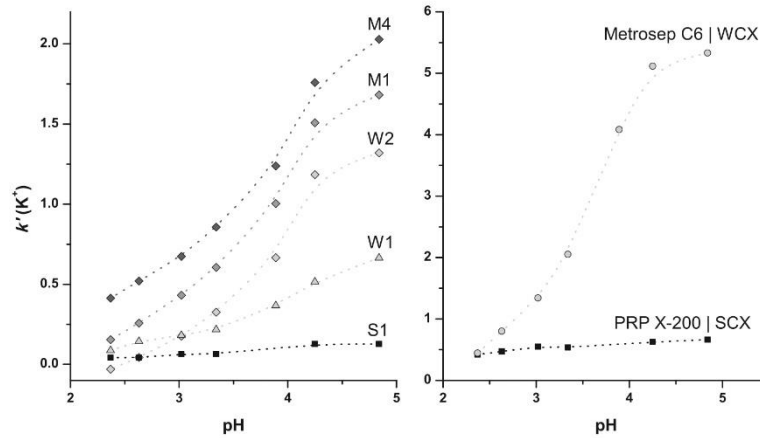


Fig. 2. Retention factor of  $K^+$  as a function of eluent pH on different cation-exchange columns: self-constructed columns (left) (3.1.2); commercial reference columns (right): Hamilton PRP X-200, Metrohm Metrosep C6. Eluent: 20 mM tetramethylammonium hydroxide, pH adjusted with hydrochloric acid; detection: ICP-MS; column temperature: 45 °C.

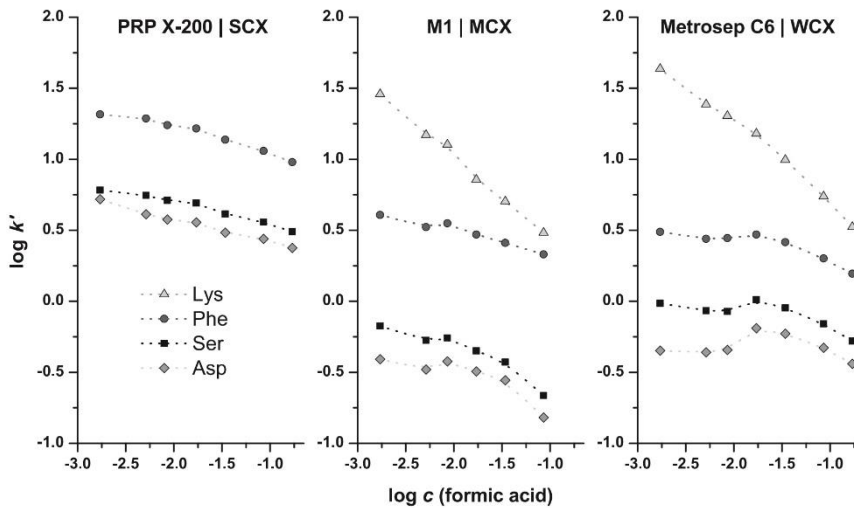


Fig. 3. Log  $k'$  versus  $\log c$  plots obtained with formic acid-based eluent. Eluent: 70/30% v/v (water/acetonitrile), 1–86 mM formic acid, pH 2.23–3.24; detection: ESI-MS; column temperature: 45 °C.

Best fits to a linear behavior were found for the highly charged, basic amino acids. This indicated the strong influence of electrostatic interaction as dominating retention mechanism. A nearly linear trend for neutral and acidic amino acids was only observed on SCX resins. The pronounced influence of electrostatic interactions on this strongly acidic column inhibited the elution of highly charged basic amino acids within an acceptable time frame. The saturation tendency at higher pH can be explained by a decreased analyte charge under this conditions.

A non-linear trend was observed for the columns containing weakly acidic ion-exchange sites (WCX, MCX), especially between  $-2.2$  and  $-1.7 \log c$  (FA) equal to a pH between 2.6 and 3.0 when calibrated with aqueous standards. The intensity of this shape correlated with the analyte  $pI$ . This non-linear behavior was caused

by the complex interdependent interactions of the three different types of weakly acidic components (formic acid eluent, amino acid analytes and carboxylated resin) that have different implications for the separation process (1.3). Therefore, retention was altered according to analyte  $pI$  and further adjusted by the amount of strongly acidic exchange groups.

In analogy to the variation of formic acid in the eluent the influence of organic modifier concentration toward the separation of amino acids was studied for the three types of stationary phases under investigation (Fig. 4). For resins containing carboxylic acid moieties attached to the polymer surface a trend reversal at about 20% v/v acetonitrile in the mobile phase was observed. From this point, the hydration shells of analytes and exchange groups were disturbed resulting in stronger electrostatic interaction and thus

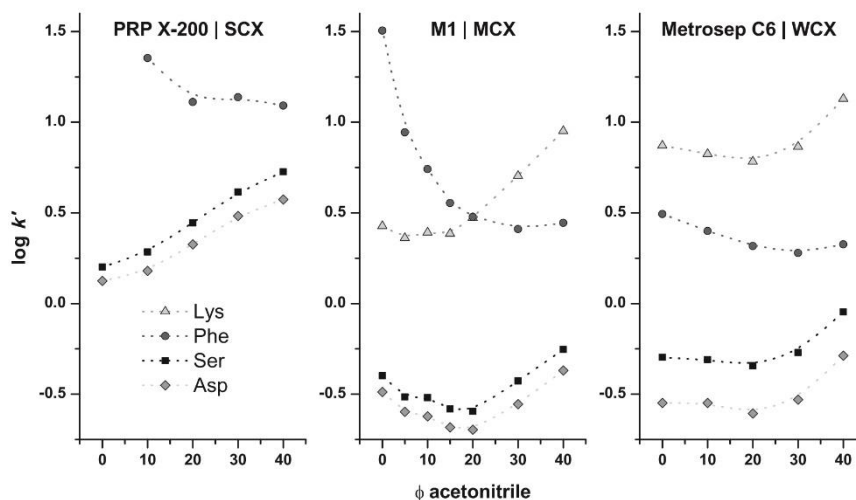


Fig. 4. Influence of acetonitrile as an organic modifier on the separation of amino acids. Eluent: 0–40% v/v acetonitrile in water, 0.2% formic acid, pH 2.43–2.64; detection: ESI-MS; column temperature: 45 °C.

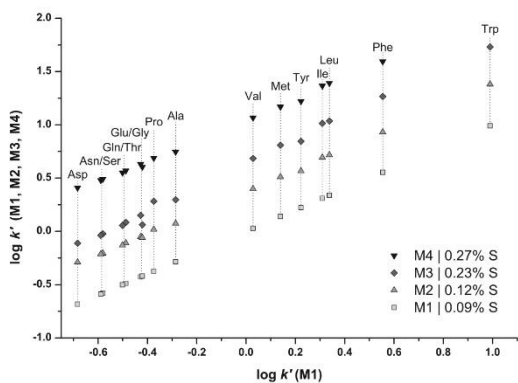


Fig. 5. Orthogonality plot of a series of mixed-acidic cation-exchange (MCX) resins with different SCX/WCX-ratio. Eluent: 85/15% v/v (water/acetonitrile), 0.2% formic acid; detection: ESI-MS; column temperature: 45 °C.

an increase of overall retention. With higher amounts of strongly acidic exchange sites the inflecting point was shifted to lower acetonitrile concentration indicating a more pronounced influence of hydration effects for sulfonic acid groups [36,51]. The dominance of electrostatic interactions on strongly acidic ion-exchange resins was demonstrated on a Hamilton PRP X-200 column, for which no trend reversal was observed [52].

Linear lines with a negative slope of  $\log k'$  over volume fraction  $\phi$  acetonitrile are usually used as an indicator for reversed-phase like partition as the dominant retention mechanism [53,54]. This classical model is not applicable to the separation processes carried out in this study. However, retention decreased as hydrophobic interactions between the amino acid and the stationary phase were reduced. A more detailed look into secondary interactions is provided in Section 3.2.2.

As demonstrated, the observed trends in retention data strongly depend on the analytes properties. Additionally, the discovered ad-

diversity of the exchange sites allowed for the alteration of resin character in the range between the reference materials. This makes MCX columns a promising tool for the separation of polyfunctional analytes and opens opportunities for unique separation selectivity.

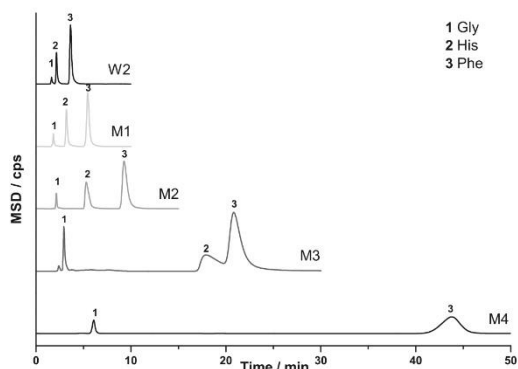
### 3.2.1. Selectivity by column design

The influence of column composition on selectivity was investigated by using a homologous series of columns with different SCX/WCX-ratios (3.1.2). As analyte charge has been proved to be a key property for the retention mechanism, the behavior of highly charged basic amino acids was analyzed separately from poorly charged acidic and neutral amino acids.

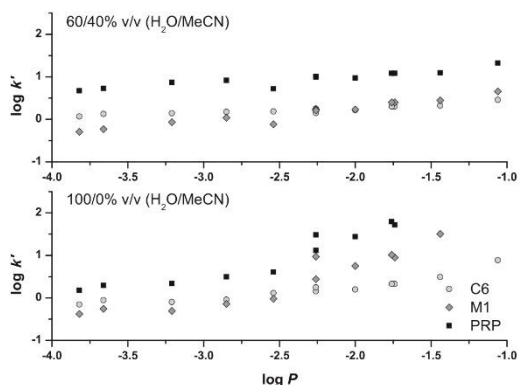
Orthogonality plots of neutral and acidic amino acids on different MCX columns (Fig. 5) showed straight, parallel lines. An increased amount of sulfonic acid groups attached to the resin surface can be used to alter the overall retention of these analytes while the desired selectivity was maintained. The selectivity for this set of amino acids can mainly be altered by eluent composition as demonstrated in Section 3.2.

The SCX/WCX-ratio is expected to influence selectivity between analytes of significantly diverging charge. For inorganic cations (e.g. alkali and alkaline earth metal cations) it is well-known that SCX resins lead to a high resolution within a group of analytes whereas WCX resins are able to separate analytes with strong differences in charge density under isocratic conditions [26]. A similar effect was observed in Section 3.2 for neutral and basic amino acids which could not be eluted on the PRP X-200 resin in one chromatography run. As the exchange site properties were proved to be additive, the retention window between neutral-hydrophobic and basic amino acids can be altered by composition of MCX columns (Fig. 6). Besides the overall increase of retention for all amino acids with growing SCX proportion, interaction of histidine as an example for highly charged basic amino acids increased disproportionately. Using this change in column selectivity, the retention order between phenylalanine and histidine changed between M3 and M4 column.

The series of columns under investigation indicated a continuous trend for the selectivity of amino acids of different charge which enables modulation of the retention window between different groups of analytes. A higher SCX/WCX-ratio provided bet-



**Fig. 6.** Isocratic separation of amino acids on different stationary phases (W2, M1, M2, M3, M4): Shift of basic amino acids with increasing amount of sulfonic acid functional groups. Eluent: 85/15% v/v (water/acetonitrile), 0.2% formic acid; Analytes: (1) Gly, (2) His, (3) Phe; detection: ESI-MS; column temperature: 45 °C.



**Fig. 7.** Log  $k'$  - log  $P$  plots of neutral amino acids for different chromatographic conditions. Eluent: 60/40% v/v (water/acetonitrile), 0.2% formic acid (top); 100/0% v/v (water/acetonitrile), 0.2% formic acid (bottom); detection: ESI-MS; column temperature: 45 °C.

ter resolution for neutral amino acids whereas a low amount of sulfonic acid groups allowed the separation of amino acids with significantly different electrostatic properties. This can be used to adapt column composition via the straightforward synthetic procedure presented in this work to provide sufficient separation for different applications combined with optimized runtimes.

### 3.2.2. Secondary interactions

To evaluate the influence of hydrophobic interactions between the stationary phases and the analytes, retention data was correlated with log  $P$  values for different eluent compositions. The cross-influence of electrostatic interactions which are generally dominant in ion chromatography of inorganic analytes, was minimized by only taking neutral amino acids with similar  $pI$  values into account. Log  $k'$  - log  $P$  plots (Fig. 7) were used to indicate the strength of hydrophobic interactions [25].

Due to the relatively low charge of neutral amino acids at the given pH of 2.64 (60% v/v water) and 2.46 (100% v/v water) the correlation between analyte retention (log  $k'$ ) and hydrophobicity (log  $P$ ) indicates the relevance of hydrophobic interaction. The

**Table 2**

Chromatographic data for 20 standard amino acids on M1 column. Retention time  $t_R$ , retention factor  $k'$ , resolution  $R_s$ , efficiency  $N$  and asymmetry factors  $As$  obtained in isocratic elution mode. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ l; sample size: 0.3 mM per amino acid; eluent: 85/15% v/v (water/acetonitrile), 0.05% formic acid; flow rate: 0–12 min 0.2 mL/min, 12.5–32.5 min 0.25 mL/min, 33–34 min 0.2 mL/min; detection: ESI-MS (SIM-POS [ $M + H$ ] $^+$ ); column temperature: 45 °C; column dimension: 250×2 mm.

Amino acid	$m/z$	$t_R$ / min	$k'$	$R_s (N + 1)$	$N / m^{-1}$	$As$
DL-Asp	134	4.34	0.40	1.65	11000	1.4
L-Asn	133	4.66	0.52	0.16	12000	1.2
L-Cys	241	4.69	0.53	0.05	12000	1.2
DL-Ser	106	4.70	0.53	0.91	12000	1.2
L-Gln	147	4.89	0.60	0.20	11000	1.2
DL-Thr	120	4.93	0.61	0.51	13000	1.2
L-Pro	116	5.03	0.65	0.27	13000	1.2
L-Glu	148	5.09	0.67	0.88	12000	1.1
L-Gly	76	5.28	0.74	2.14	14000	1.2
DL-Ala	90	5.74	0.90	7.16	15000	1.2
DL-Val	118	7.50	1.52	2.22	17000	1.1
DL-Met	150	8.11	1.74	3.38	18000	1.0
L-Tyr	182	9.12	2.10	5.26	19000	1.0
L-Ile	132	10.81	2.70	0.85	17000	1.1
L-Leu	132	11.14	2.82	4.76	17000	1.0
L-His	156	12.92	3.45	3.66	30000	1.0
DL-Phe	166	14.29	3.91	4.22	32000	1.0
L-Lys	147	15.84	4.48	4.09	37000	1.1
L-Arg	175	17.59	5.10	17.00	32000	1.0
DL-Trp	205	28.71	9.05		25000	1.0

backbone material is the key influence on hydrophobic interaction as visible by the slope of 0.31 for the silica-based C6 column compared to 0.77 (M1) and 0.79 (PRP X-200) for PS/DVB-based resins. Only minor changes were observed within the series of MCX columns (supplementary material). A mobile phase of lower polarity reduced the influence of log  $P$  indicating the presence of an RP-like partition mechanism for the separation on all columns under investigation. Meanwhile the relation between the different columns remained the same.

Further details on secondary interactions with the polymer support were provided by investigating exceptions from the trend described in Fig. 7. Generally, the silica based-C6 column showed the best fit to a linear equation under all elution conditions indicating a minimum of further secondary interaction mechanisms for this column. On columns with PS/DVB support, the hydrophilic amino acid tyrosine showed a retention behavior that was more comparable to hydrophobic analytes. As the PS/DVB support is characterized by a high  $\pi$ -electron density, additional  $\pi$ - $\pi$  interactions of aromatic amino acids with the polymer contributed to the overall retention. For aromatic amino acids a significant increase in retention was observed at lower temperatures confirming the hypothesis of  $\pi$ - $\pi$  interactions due to the relatively weak character of these interactions.

The less polar eluent led to less retention for proline than expected from its log  $P$  probably due to steric effects of the secondary amine cation in comparison to the other primary amine analytes.

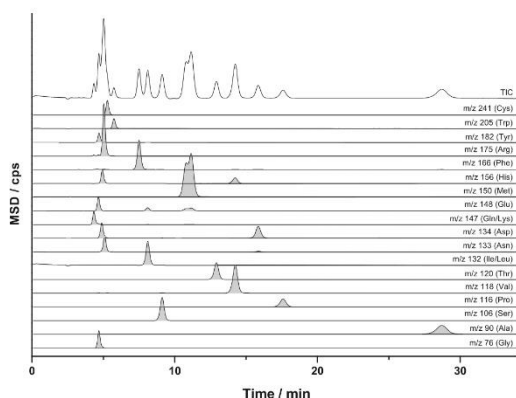
### 3.3. Isocratic separation and quantification of 20 underivatized amino acids

An ESI-MS compatible isocratic separation method was developed on the basis of the multiple interaction mechanisms and opposing trends in retention for different amino acid groups on MCX columns. Selectivity was adjusted by acetonitrile and formic acid concentration, which enabled the analysis of 20 underivatized standard amino acids within 30 min (Fig. 8). The characteristics of the example chromatogram (Table 2) under optimized elution conditions demonstrate the value of MCX columns in amino acid

**Table 3**

Quantitation data for 17 standard amino acids on M1 column with ESI-MS detection. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ L; eluent: 85/15% v/v (water/acetonitrile), 0.05% formic acid; detection: ESI-MS (SIM-POS [ $M + H$ ]<sup>+</sup>); column temperature: 45 °C; column dimension: 250 $\times$ 2 mm.

Amino acid	Test range / $\mu$ M	$t_R$ /%RSD ( $n = 5$ )	Precision of Conc. /%RSD ( $n = 11$ )	Accuracy of Conc. (Cal/Cert) /%	Linearity	LOD (EPA) / $\mu$ M	LOD (DIN) / $\mu$ M	LOQ (DIN) / $\mu$ M
DL-Asp	0.057–2.42	0.23	7.01	103	0.9999	0.012	0.016	0.059
L-Cys	0.028–1.21	0.29	4.96	111	0.9997	0.010	0.011	0.041
DL-Ser	0.057–2.42	0.26	3.32	101	0.9999	0.023	0.016	0.060
DL-Thr	0.057–2.42	0.25	4.35	82.9	0.9999	0.054	0.014	0.052
L-Pro	0.057–2.42	0.26	4.84	101	0.9999	0.004	0.018	0.068
L-Glu	0.057–2.42	0.26	4.27	80.8	0.9999	0.008	0.015	0.054
L-Gly	0.057–2.42	0.32	3.14	90.1	0.9997	0.023	0.028	0.102
DL-Ala	0.057–2.42	0.27	7.64	105	1.0000	0.027	0.011	0.039
DL-Val	0.057–2.43	0.29	6.21	127	0.9999	0.006	0.011	0.040
DL-Met	0.057–2.42	0.26	3.95	107	1.0000	0.026	0.005	0.018
L-Tyr	0.057–2.42	0.29	3.23	103	0.9999	0.007	0.011	0.040
L-Ile	0.058–2.44	0.30	4.56	98.7	0.9996	0.062	0.022	0.080
L-Leu	0.058–2.45	0.33	4.22	103	0.9998	0.028	0.020	0.072
L-His	0.057–2.42	0.38	4.10	104	0.9986	0.012	0.061	0.215
DL-Phe	0.057–2.42	0.23	4.23	107	0.9999	0.008	0.009	0.035
L-Lys	0.057–2.43	0.41	3.36	107	0.9905	0.064	0.111	0.381
L-Arg	0.057–2.42	0.47	5.00	106	0.9923	0.021	0.101	0.347



**Fig. 8.** Chromatogram of 20 standard amino acids with MCX resin M1 using an isocratic elution program. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ L; sample size: 0.3 mM per amino acid; eluent: 85/15% v/v (water/acetonitrile), 0.05% formic acid; flow rate: 0–12 min 0.2 mL/min, 12.5–32.5 min 0.25 mL/min, 33–34 min 0.2 mL/min; detection: ESI-MS (SIM-POS [ $M + H$ ]<sup>+</sup>); column temperature: 45 °C; column dimension: 250 $\times$ 2 mm.

analysis. Efficiencies for all studied analytes were between 11000 and 37000  $N / m^{-1}$  with asymmetry factors from 1.0 to 1.4. Resolution for basic and hydrophobic compounds was superior in comparison to existing commercial columns as baseline separation was achieved under isocratic conditions. The isomers Ile/Leu are a critical pair and are not separable on various columns. Herein, we report a resolution of 0.85 for Ile/Leu—which opens the possibility of partitioning the peak areas by fitting. This possibility is especially worthy as the peaks are highly symmetrical, which was demonstrated by the measurement of single standards. Improved resolution for acidic and neutral-hydrophilic amino acids was obtained with a lower formic acid starting concentration of 0.03% in an aqueous eluent. However, this impedes the use of an isocratic separation method as retention for hydrophobic analytes increases dramatically.

Statistical design of experiments should be applied to use the full potential of the novel column chemistry, as optimization of

this multi-variant system by the one-factor-at-a-time method is a time-consuming process.

In comparison to existing strongly acidic cation-exchange columns (e.g. Hamilton PRP X-200) the presented columns were able to separate neutral and highly charged basic amino acids in a practical time frame. Compared to silica based-WCX columns (e.g. Metrohm Metrosep C6) superior separation properties for hydrophobic analytes were obtained and isomeric pairs could be differentiated. Tailoring the selectivity between hydrophobic and basic analytes by adjusting the proportion of sulfonic acid groups allowed the application of an isocratic elution program in contrast to gradient programs with comparable separation results for existing WCX columns. Especially when coupled with mass spectrometry, the isocratic method shows better reproducibility and robustness due to the constant ionization conditions. Herein, a cation-exchange column operated with ESI-MS detection for the analysis of standard amino acids as examples for polyfunctional charged analytes was presented for the first time.

The suitability of the given chromatographic method for quantitative purposes was demonstrated by evaluating the limits of detection (LOD) and calibration parameters. Therefore, a reference material standard containing 17 amino acids was analyzed with an external calibration using self-prepared standards of the amino acids. Peak areas were determined in selected-ion mode and overlapping isomers Ile/Leu were evaluated by vertical peak partitioning. The area response in the period of the measurement series was corrected using a drift function for the mass spectrometer response.

Quantitation data for the 17 amino acids with MCX columns was precise and accurate (Table 3) within the test range of two orders of magnitude. Retention times were repeatable with RSDs less than 0.5% ( $n = 5$ ) over three days. Concentrations determined from the reference standard in three different dilutions ( $n = 11$ ) with external calibration had an RSD of the determined concentration between 3 and 7%. The accuracy data was obtained by division of the calculated concentrations with the nominal concentrations given in the reference material data sheet. Additionally, quantitative ESI-MS data was verified by photometric detection for Met, His, Phe, Arg, Tyr (supplementary material).

Limits of detection were determined according to the EPA method 40 [55] and DIN 38,402 [56] method from the reference amino acid standard using the standard deviation at the lower edge of the test range and the calibration curves, respectively. Both methods produce similar results except for basic amino acids re-



sulting in higher LOD according to DIN method. An average calibration curve linearity of 0.9988 and detection limits in the 4 to 64 nM area (EPA) demonstrated the suitability of MCX columns coupled to ESI-MS detection for the fast, sensitive and robust analysis of underivatized amino acids.

#### 4. Conclusion

This study demonstrated the potential of PS/DVB-based stationary phases with exchange sites of different acidity for the fast separation and quantitation of underivatized amino acids. A homologous series of low-capacity mixed-acidic cation-exchange (MCX) resins with different amounts of carboxylic and sulfonic acid groups attached to the polymer was prepared. The two modular reactions used were easy to perform and allowed to control the degree of functionalization for both types of exchange sites.

Chromatographic characterization revealed the additive character of the properties of both types of exchange sites as well as secondary interactions caused by the polymeric support. The opposing trends for different analyte types led to a unique selectivity adjustable by SCX/WCX-ratio and eluent composition. An increasing amount of strongly acidic functional groups was used to adjust the retention window between hydrophobic and basic amino acids. This key feature of MCX columns led to optimized run times and the separation as well as ESI-MS quantitation of 20 standard amino acids under isocratic elution conditions with peak symmetries and efficiencies comparable to commercially available columns. Thus, the construction principle described is very promising for novel applications in biochemical and environmental research as it enables the facile production of tailor-made columns. The combination of these variable column properties with adjustable elution conditions can be utilized for the analysis of non-standard amino acids and other multifunctional analytes with ESI-MS detection. Furthermore, the suitability of PS/DVB-based mixed-acidic columns for mixed-mode chromatography (RP, HILIC, IC) is expected and should be investigated.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### CRedit authorship contribution statement

**Matthias Schmitt:** Investigation, Conceptualization, Methodology, Writing – original draft. **Marina Egorycheva:** Investigation. **Andreas Seubert:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Resources, Project administration, Writing – original draft.

#### Acknowledgement

The authors acknowledge Metrohm AG (Herisau, Switzerland) for providing instruments, Metrohm Metrosep C6 columns, polymer support and column packing equipment. The service facility for Elemental Analysis of Philipps-University Marburg is acknowledged for performing Schoeniger combustions. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2021.462790.

#### References

- [1] H. Small, T.S. Stevens, W.C. Bauman, Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection, *Anal. Chem.* 47 (1975) 18014–1809, doi:10.1021/ac60361a017.
- [2] A.V. Zatarakha, A.D. Smolenkov, O.A. Shpigun, Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta.* 904 (2016) 33–50, doi:10.1016/j.aca.2015.11.012.
- [3] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, 4th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2016.
- [4] Mitsubishi chemicals, ion exchange resins, [https://www.diaion.com/en/products/hplc\\_packed\\_columns\\_and\\_packing\\_media/packed\\_columns/column\\_list/index.html](https://www.diaion.com/en/products/hplc_packed_columns_and_packing_media/packed_columns/column_list/index.html) (accessed September 2021).
- [5] Thermo Fisher, Dionex ion chromatography columns, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/chromatography/ion-chromatography-ic/ion-chromatography-columns.html> (accessed September 2021).
- [6] Metrohm, The column program, <https://www.metrohm.com/de-de/documents/80005347> (accessed September 2021).
- [7] D.T. Gjerde, J.S. Fritz, G. Schmuckler, Anion chromatography with low-conductivity eluents, *J. Chromatogr. A.* 186 (1979) 509–519, doi:10.1016/S0021-9673(00)95271-3.
- [8] D.T. Gjerde, G. Schmuckler, J.S. Fritz, Anion Chromatography with low-conductivity eluents, II, *J. Chromatogr. A.* 187 (1980) 35–45, doi:10.1016/S0021-9673(00)87871-1.
- [9] D.T. Gjerde, Principles of detection in single-column ion chromatography, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 27 (1980) 289–304, doi:10.1080/03067318608079822.
- [10] D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore, Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, *Anal. Chem.* 30 (1958) 1190–1206, doi:10.1021/ac60139a006.
- [11] Hitachi, AminoSAAYA product manual, [https://www.hitachi-hightech.com/global/product\\_detail/?pn=ana-la8080](https://www.hitachi-hightech.com/global/product_detail/?pn=ana-la8080) (accessed September 2021), [https://www.hitachi-hightech.com/global/product\\_detail/?pn=ana-la8080](https://www.hitachi-hightech.com/global/product_detail/?pn=ana-la8080).
- [12] S. Moore, D.H. Spackman, W.H. Stein, Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system, *Anal. Chem.* 30 (1958) 1185–1190, doi:10.1021/ac60139a005.
- [13] Metrohm, Automated analysis of amino acids, <https://www.metrohm.com/en/documents/89435001> (accessed September 2021).
- [14] R. Michalski, M. Balcerzak, J. Mattusch, K. Fischer, K. Kosaka, A.K. Jagielski, M. Usarek, J. Gandhi, W. Frenzel, Applications of IC-MS and IC-ICP-MS in Environmental Research, 1st ed., Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2016.
- [15] C.-N. Mais, L. Hermann, F. Altoegoer, A. Seubert, A.A. Richter, I. Wernersbach, L. Czech, E. Bremer, G. Bange, Degradation of the microbial stress protectants and chemical chaperones ectoine and hydroxyectoine by a bacterial hydrolase-deacetylase complex, *J. Biol. Chem.* 295 (2020) 9087–9104, doi:10.1074/jbc.RA120.012722.
- [16] S. Knoll, T. Rösch, C. Huhn, Trends in sample preparation and separation methods for the analysis of very polar and ionic compounds in environmental water and biota samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 6149–6165, doi:10.1007/s00216-020-02811-5.
- [17] S.M. Rutherford, G.S. Gilani, Amino acid analysis, *Curr. Protoc. Protein Sci.* 11 (2009) 1–37, doi:10.1002/0471140864.ps1109s58.
- [18] G. Sharma, S.V. Attri, B. Behra, S. Bhisikar, P. Kumar, M. Tajeja, S. Sharda, P. Singhi, S. Singhi, Analysis of 26 amino acids in human plasma by HPLC using AQC as derivatizing agent and its application in metabolic laboratory, *Amino Acids* 46 (2014) 1253–1263, doi:10.1007/s00726-014-1682-6.
- [19] L. Sonnenschein, A. Seubert, Separation of  $\alpha$ -amino acids using a series of zwitterionic sulfobetaine exchangers, *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011) 589–595, doi:10.1093/chrscl/49.8.589.
- [20] M. Kato, H. Kato, S. Eyama, A. Takatsu, Application of amino acid analysis using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with isotope dilution mass spectrometry for peptide and protein quantification, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 3059–3064, doi:10.1016/j.jchromb.2009.07.027.
- [21] Z.-Y. Wu, J. Liu, H. Shi, P.J. Marriott, The retention behaviour of amino acids in hydrophilic interaction liquid chromatography on zwitterionic stationary phases, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2217–2222, doi:10.1002/jssc.201300143.
- [22] K. Zhang, X. Liu, Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 19–34, doi:10.1016/j.jpba.2016.09.013.
- [23] L. Zhang, Q. Dai, X. Qiao, C. Yu, X. Qin, H. Yan, Mixed-mode chromatographic stationary phases: recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 143–163, doi:10.1016/j.trac.2016.05.011.
- [24] A.S. Popov, K.A. Spiridonov, A.S. Uzhel, A.D. Smolenkov, A.V. Chernobrovkina, A.V. Zatarakha, Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly(styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1642 (2021) 462010, doi:10.1016/j.chroma.2021.462010.
- [25] Y. Li, P. Nesterenko, R. Stanley, B. Paull, M. Macka, Comparison of cation-exchange capillary columns used for ion chromatographic separation of biogenic amines, *J. Chromatogr. A.* 1571 (2018) 193–200, doi:10.1016/j.chroma.2018.08.021.
- [26] P.E. Jackson, C.A. Pohl, Advances in stationary phase development in suppressed ion chromatography, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 393–400, doi:10.1016/S0165-9936(97)00050-2.
- [27] A.K. Rieß, *Entwicklung Stationärer Phasen für die Kationenchromatographie zur Analyse mono- und divalenter Kationen*, Philipps-Universität Marburg, 2009.

- [28] B.M. De Borja, C.M. Kinchin, D. Sherman, T.K. Cook, P.K. Dasgupta, K. Srinivasan, C.A. Pohl, Ion chromatographic determination of acidity, *Anal. Chem.* 72 (2000) 96–100, doi:10.1021/ac9907787.
- [29] Thermo Fisher, Specification sheet: IonPac CS12A cation-exchange column, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Specification-Sheets/4230-D5-IonPac-CS12A-20Apr2010-0643-12-R2.pdf> (accessed September 2021).
- [30] M.A. Rey, C.A. Pohl, Novel cation-exchange stationary phase for the separation of amines and of six common inorganic cations, *J. Chromatogr. A.* 739 (1996) 87–97, doi:10.1016/0021-9673(96)00042-8.
- [31] Thermo Fisher, Unique column chemistry for challenging amine separations, <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FFTS-Assets%2FCMD%2FSpecification-Sheets%2Fps-72595-ionpac-cs20-cation-exchange-columns-ps72595-en.pdf> (accessed September 2021).
- [32] M. Jayaraman, C.A. Pohl, C. Saini, Ion exchange chromatography column, method, and system thereof, US20200264144A1, 2020.
- [33] C.A. Pohl, Charge reversible ion exchange resins, chromatography column, method, and system thereof, US10379090B2, 2019.
- [34] Y. Yokoyama, A. Yokokawa, K. Noguchi, T. Tanabe, Polyfunctional low-capacity cation-exchange packing material for the separation of underivatized amino acids, *Talanta* 103 (2013) 245–251, doi:10.1016/j.talanta.2012.10.039.
- [35] A.A. Zagorodni, *Ion Exchange Materials: Properties and Applications*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [36] J.S. Fritz, Factors affecting selectivity in ion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1085 (2005) 8–17, doi:10.1016/j.chroma.2004.12.087.
- [37] A. Kaltz, L. Bohra, J.S. Tripp, A. Seubert, Investigations on the selectivity of grafted high performance anion exchangers and the underlying graft mechanism, *Anal. Chim. Acta.* 999 (2018) 176–183, doi:10.1016/j.aca.2017.11.030.
- [38] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, On the effect of organic solvent composition on the pH of buffered HPLC mobile phases and the pKa of analytes – a review, *Sep. Purif. Rev.* (2007) 36, doi:10.1080/15422110701539129.
- [39] K. Lungfiel, A. Seubert, Applying hydrophilicity to PS/DVB-beads via introduction of protected comonomers, *Chromatographia* 79 (2016) 5–17, doi:10.1007/s10337-015-3001-0.
- [40] K. Lungfiel, A. Seubert, Varying the porous structure of polystyrene/divinylbenzene beads prepared by Ugelstads activated swelling technique and examining its reversed phase HPLC properties, *J. Chromatogr. A.* 1358 (2014) 117–127, doi:10.1016/j.chroma.2014.06.085.
- [41] GESTIS Database, <https://gestis.dguv.de/> (accessed September 2021).
- [42] D.R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 2016.
- [43] A. Seubert, J.S. Tripp, R. Aeschlimann, M. Ott, Method for generating a hydrophilic surface on PS/DVB copolymer particles, WO2020208026A1, 2019.
- [44] T.K. Chambers, J.S. Fritz, Effect of polystyrene-divinylbenzene resin sulfonation on solute retention in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 797 (1998) 139–147, doi:10.1016/S0021-9673(97)01208-9.
- [45] P.J. Dumont, J.S. Fritz, Ion chromatographic separation of alkali metals in organic solvents, *J. Chromatogr. A.* 706 (1995) 149–158, doi:10.1016/0021-9673(94)01119-Y.
- [46] ChemStation user guide, [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2070-91126\\_Understanding.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2070-91126_Understanding.pdf) (accessed November 2021).
- [47] M. Hesse, H. Meyer, B. Zeh, *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*, 7th ed., Thieme, Stuttgart, 2005.
- [48] Metrohm, C6 Product manual, <https://www.metrohm.com/en/documents/81078050> (accessed September 2021).
- [49] Hamilton, Hamilton, PRP X-200 specification, <https://www.hamiltoncompany.com/de/laboratory-products/hplc-columns/cation-exchange/prp-x200> (accessed September 2021).
- [50] P.R. Haddad, R.C. Foley, Modelling of cation retention in ion chromatography using fixed-site and dynamically coated ion-exchange columns, *J. Chromatogr. A.* 500 (1990) 301–312, doi:10.1016/S0021-9673(00)96073-4.
- [51] W.H. Craig, Modulation of Ion-Exchange Chromatographic Selectivity Through the Addition of Organic Modifiers, Florida State University, 2012.
- [52] S. Cheng, H. Yan, C. Zhao, The synergistic effect between hydrophobic and electrostatic interactions in the uptake of amino acids by strongly acidic cation-exchange resins, *J. Chromatogr. A.* 1108 (2006) 43–49, doi:10.1016/j.chroma.2005.12.101.
- [53] L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Grant, Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems, *J. Chromatogr. A.* 165 (1979) 3–30, doi:10.1016/S0021-9673(00)85726-X.
- [54] Y. Guo, Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC), *Analyst* 140 (2015) 6452–6466.
- [55] United States Environmental Protection Agency, Definition and procedure for the determination of the method detection limit, revision 2, [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure\\_rev2\\_12-13-2016.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure_rev2_12-13-2016.pdf) (accessed December 2021).
- [56] Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsche Institut für Normung e.V. DIN 38402 Teil 51 – Kalibrierung von Analyseverfahren, Auswertung von Analyseergebnissen und Lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen, Beuth Verlag, Berlin, 1986.

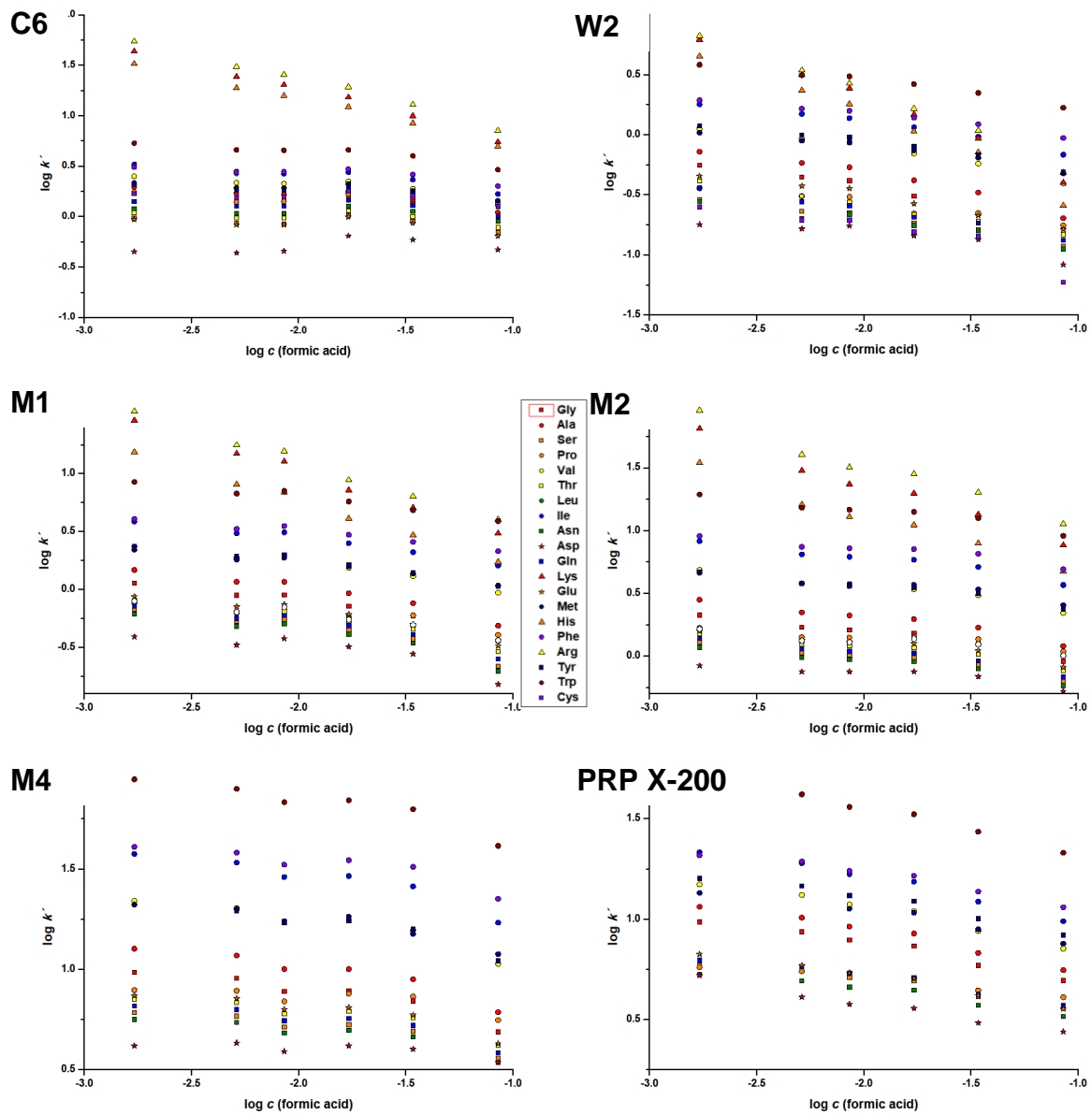
**Supplementary material**

**Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids**

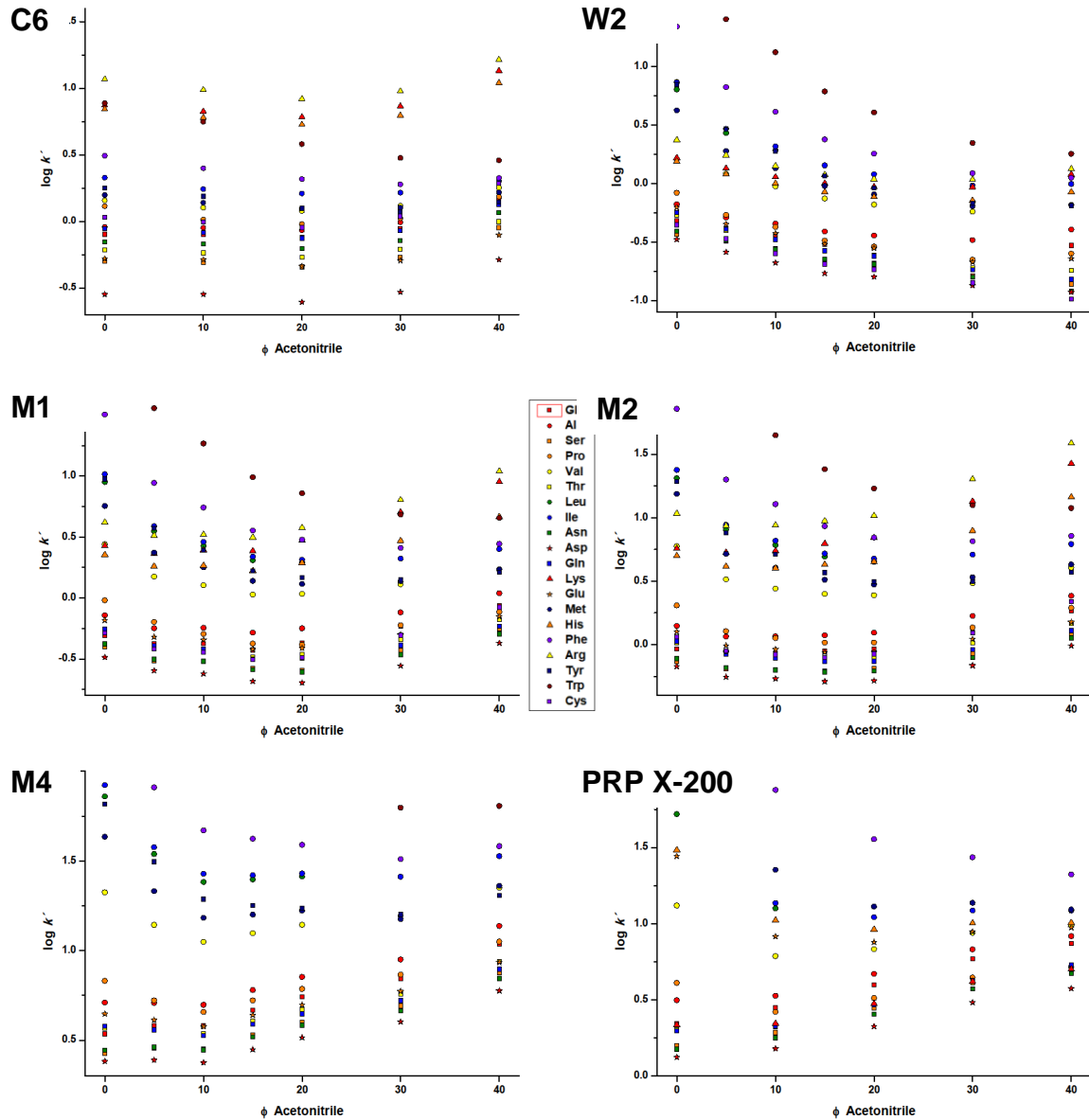
Matthias Schmitt, Marina Egorycheva, Andreas Seubert

University of Marburg, Faculty of Chemistry, Analytical Chemistry, Hans-Meerwein-Str. 4,  
35043 Marburg, Germany

**Fig. S1:** Log  $k'$  versus log  $c$  plots obtained with formic acid-based eluent for 20 standard amino acids with all columns under investigation. Eluent: 70/30% v/v (water/acetonitrile), 1-86 mM formic acid, pH 2.23-3.24; detection: ESI-MS; column temperature: 45 °C.



**Fig. S2:** Influence of acetonitrile as an organic modifier on the separation of 20 standard amino acids with all columns under investigation. Eluent: 0-40% v/v acetonitrile in water, 0.2% formic acid, pH 2.43-2.64; detection: ESI-MS; column temperature: 45 °C.



**Table S1:** Retention and selectivity factors obtained on different MCX resins with increasing strong acidic character. Eluent: 85/15% v/v (water/acetonitrile), 0.2% formic acid. \*histidine retention data on M4 resin was obtained on a column with smaller dimension.

Column	$k'$ (Gly)	$k'$ (Phe)	$k'$ (His)	$\alpha$ (Phe/Gly)	$\alpha$ (Phe/His)
W2	0.30	2.39	0.84	7.97	2.85
M1	0.37	3.58	1.67	9.67	2.14
M2	0.89	8.56	4.27	9.61	2.00
M3	1.41	18.5	15.6	13.1	1.19
M4	4.64	42.0	176.8*	9.05	0.24

**Table S2:** Slope of  $\log k'$  -  $\log P$  plots.

Column	100 0	60 40
C6	0.31 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.02
M1	0.77 $\pm$ 0.10	0.33 $\pm$ 0.03
PRP X-200	0.79 $\pm$ 0.10	0.20 $\pm$ 0.03

**Table S3:** Quantitation data for 5 standard amino acids on M1 column with photometric detection. Chromatographic conditions: injection volume: 2  $\mu$ L; eluent: 85/15% v/v (water/acetonitrile), 0.05% formic acid; detection: UV/Vis 195 nm; column temperature: 45  $^{\circ}$ C; column dimension: 250 x 2 mm.

Amino acid	Test range / $\mu$ M	$t_R$ / %RSD (n=5)	Precision Conc. / %RSD (n=11)	Accuracy Conc. (Cal/Certipur) / %	Linearity
DL-Met	0.061-1.27	0.29	2.92	105	0.9988
L-Tyr	0.065-1.32	0.43	2.97	108	0.9984
L-His	0.063-1.27	0.70	6.07	101	0.9996
DL-Phe	0.067-1.33	0.28	3.80	107	0.9997
L-Arg	0.065-1.33	1.05	4.18	105	0.9999



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Factors affecting mixed-mode retention properties of cation-exchange stationary phases



Matthias Schmitt<sup>a</sup>, Marina Egorycheva<sup>a</sup>, Daniel Frerichs<sup>a</sup>, Svenja Fiedler<sup>a,b</sup>, Peter L. Graumann<sup>a,b</sup>, Andreas Seubert<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Marburg, Faculty of Chemistry, Hans-Meerwein-Str. 4, 35043 Marburg, Germany

<sup>b</sup> SYNMIKRO, LOEWE Center for Synthetic Microbiology, University of Marburg, Hans-Meerwein-Str. 6, 35043 Marburg, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 February 2023

Revised 7 March 2023

Accepted 15 March 2023

Available online 18 March 2023

#### Keywords:

Cation-exchanger

Mixed-mode stationary phase

Polymer functionalization

Excess adsorption isotherms

Confocal laser scanning microscopy

### ABSTRACT

Cation-exchange stationary phases were characterized in different chromatographic modes (HILIC, RPLC, IC) and applied to the separation of non-charged hydrophobic and hydrophilic analytes. The set of columns under investigation included both commercially available cation-exchangers and self-prepared PS/DVB-based columns, the latter consisting of adjustable amounts of carboxylic and sulfonic acid functional groups. The influence of cation-exchange site and polymer substrate on the multimodal properties of cation-exchangers was identified using selectivity parameters, polymer imaging and excess adsorption isotherms. Introducing weakly acidic cation-exchange functional groups to the unmodified PS/DVB-substrate effectively reduced hydrophobic interactions, whilst a low degree of sulfonation (0.09 to 0.27% w/w sulphur) mainly influenced electrostatic interactions. Silica substrate was found to be another important factor for inducing hydrophilic interactions. The presented results demonstrate that cation-exchange resins are suitable for mixed-mode applications and offer versatile selectivity.

© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Today, a variety of stationary phases for ion-exchange chromatography (IC) is available making IC a dominant technique for the analysis of charged analytes in solution [1]. The range of column properties regarding polymer substrate, polarity, and ion-exchange sites is manifold with a huge set of highly robust polymer-based packing materials [2,3]. Current research in IC focuses on extending the application range from small inorganic ions to more complex charged organic analytes. However, the characterization of mixed-mode chromatography properties of typical IC columns is a barely investigated topic.

Mixed-mode chromatography (MMC) columns are an interesting tool to address selectivity issues of complex multifunctional analytes for example in pharmaceutical sciences [4]. Such MMC stationary phases are defined by different retention modes significantly contributing to the overall retention of the analytes. Most of the proposed phases are based on silica, which offers intrinsic hydrophilicity and the possibility of surface functionalization with mixtures of silanes carrying distinct functional groups for different chromatographic modes. The development of new MMC column construction concepts is a current focus in the field due to the var-

ious possibilities of combining structural features and interaction modes [4–6]. Additionally, a huge set of mixed-mode columns is commercially available from various vendors [7–9] and is routinely used in numerous applications. However, the method development can be laborious and the robustness of these types of stationary phases is limited by the narrow operational pH range and the lack of stability [10,11]. Additionally, carry-over effects, undesired interaction with residual non-capped silanol and column bleeding can be problematic [12–14].

#### 1.1. Ion-exchangers in multimodal applications

As an alternative strategy for the development of novel MMC stationary phases Yang et al. suggested the cross-use of existing IC columns based on the variety of available phases and functionalization methods [15]. The proposed strategy contradicted the common understanding that the properties of typical IC phases were dominated by electrostatic interactions, specifically when dealing with charged analytes. All other interactions were typically referred to as secondary interactions and should be either minimized due to a negative impact on peak broadening or could be used for fine tuning of selectivity [16]. However, Popov et al. proved the idea and characterized the mixed-mode properties of a PS/DVB-based hyperbranched anion-exchange column [17]. A broad

\* Corresponding author.

E-mail address: [seubert@staff.uni-marburg.de](mailto:seubert@staff.uni-marburg.de) (A. Seubert).

range of compounds including non-charged analytes was successfully separated using various eluent compositions.

In a few previous reports the utilization of polymer-based phases in chromatographic modes other than IC was evaluated. Fritz et al. demonstrated the use of highly sulfonated PS/DVB loaded with  $H^+$  or  $Ca^{2+}$  for the separation of glycols and sugars in acetonitrile-rich eluents. The same columns were operated in reversed-phase liquid chromatography (RPLC) mode for the separation of hydrophobic aromatic compounds. Retention and the degree of sulfonation correlated inversely for both operating modes. However, the presented material was not applicable in cation-exchange mode due to the high degree of sulfonation ranging from 0.27 to 2.63 mmol/g (0.9 to 8.4% w/w sulphur) [18]. The pioneering idea of using IC stationary phases in multiple modes has not been further investigated for decades, most likely because of the superior performance of silica-based columns and their very strong cation-exchange interactions. For the use of PS/DVB phases in RPLC, Shpigun et al. gave a thorough overview [19]. An increase in retention for inorganic anions in acetonitrile-rich eluents was demonstrated by Gilchrist et al. for a modern anion-exchanger which was most likely caused by an adsorbed water layer on the stationary phases' charged surface [20].

More recently, the design of polymeric phases for HILIC mode separations came into the focus of different researchers. Yang and coworkers prepared GMA/DVB-based HILIC columns by modifying the hydrolysed substrate with either adjustable amounts of hyper-branched polyglycerol or acrylamide [21,22]. Recently, a PS/DVB-based amine column for the application in HILIC and IC mode offering high stability and low bleeding was introduced [23]. Functionalization with zwitterionic functional groups was found another effective approach to introduce hydrophilicity to polymer particles [24–26].

Such polymer-based stationary phases, specifically using PS/DVB substrate, are uniquely stable and inert, which allows for the use of a wide eluent range in terms of organic modifier and pH resulting in materials of low bleeding [17,18,21,23]. Therefore, inverting the synthetic strategy for the development of multimodal stationary phases by introducing polar and charged functional groups into intrinsically hydrophobic substrates is a promising option for MMC column technology.

### 1.2. Characterization of material properties influencing multimodal interactions

In terms of IC column cross-use, the influence of the type of functional group (strongly, weakly acidic), capacity and material substrate towards chromatographic properties are of great interest. Such structure-property-relationships could be utilized to prepare tailor-made columns or to selectively choose from commercially available materials. A major challenge in the characterization of such interactions is the interdependence of different structural features, as the complex functionalization procedures typical for IC phases often change a variety of parameters at a time. Additionally, most characterization studies used commercially available phases with unknown material properties and synthetic procedures. Therefore, several studies developed interesting methodology but were not able to provide a systematic interpretation of structure-property-relationships [27–30].

Typical tools to determine column selectivity in MMC are chromatographic tests with well-defined test solutes [31,32] as the commonly used methylene selectivities for the investigation of hydrophobicity [28,29,33]. Excess adsorption isotherms (EAI) determined by the minor disturbance method are another useful indicator of column polarity. EAI were used to investigate the influence of stationary phases with charged functional groups in the backbone for different RPLC [34,35] and HILIC [25] phases but not yet

for IC columns. Gritti et al. systematically described the influence of different amounts of multifunctional silanes that are characterized by an internal charged functional group on the acetonitrile excess adsorption of these RPLC phases. The authors found that material polarity and electrostatic repulsion were independent parameters, as observed by the limited influence on excess adsorption but pronounced ion-exclusion of cationic compounds on the given stationary phases [36].

Small-molecule, modular functionalization reactions are an ideal tool for the systematic study of factors affecting mixed-mode retention properties. Recently, we introduced mixed-acidic cation-exchange (MCX) materials meeting these requirements [37]. Adjustable sulfonation of the aromatic polymer was performed based on an identical batch of carboxylated PS/DVB and led to a series of stationary phases with a tunable ratio of functional groups with otherwise constant properties.

This study evaluates the performance of a set of cation-exchangers comprising PS/DVB-based phases with different sulfonation and carboxylation degrees and two commercially available columns with orthogonal material properties in HILIC, RPLC and IC mode. Additionally, we describe the influence of stationary phase substrate and cation-exchange site on the mixed-mode retention properties by combining tailored resin preparation, material characterization and typical chromatographic tests.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

The chromatographic separations were performed on an HPLC system coupled with an 1100 series ESI-MSD (G1946D, Agilent, Waldbronn, Germany) electrospray ionization mass spectrometer. Ionization was carried out in positive or negative mode (ESI(+/-)) with the following source settings: capillary voltage 4000 V, nebulizer pressure 55 psi, gas temperature 350 °C, gas flow 12.5 mL/min, fragmentor voltage 70 V. Analytes were detected as  $[M+H]^+$  or  $[M-H]^-$  in selected ion monitoring (SIM) mode. The 1100 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) consisted of a binary gradient pump (G1312A), an autosampler (G1313A), a column oven (G1316A) and a diode array detector (G1315A). If not indicated otherwise, 5  $\mu$ L injection volume were used. Photometric detection was performed at 254 nm.

Minor disturbance experiments were conducted on the same type of HPLC system using a quaternary gradient pump (G1311A) and an additional RI-detector (G1362A). UV-detection was performed at 190 nm. RI-detection was carried out in positive polarity. The extra-column volume between the autosampler and the RI-detector equals 0.216 mL, 1  $\mu$ L injection volume of water or acetonitrile were used.

Chromatographic data was processed using Agilent ChemStation B.04.03. All experiments were performed using an eluent flow rate of 0.2 mL/min and a temperature of 45 °C for the chromatographic systems.

For confocal laser scanning microscopy, a TSC SP8 G-STED microscope (Leica) was used with an 100x oil objective (NA 1.40), a pulsed white light laser for excitation at 500 nm and a depletion laser (592 nm). Gated hybrid detectors were used to detect photons in a range of 535 – 547 nm. All images were taken at a scanning speed of 1000 Hz or 600 Hz for 10x or 0.75x zoom respectively. Processing of the images was done with the LAS X Software (Leica).

### 2.2. Chemicals and materials

PS/DVB-based cation-exchange phases containing both sulfonic and carboxylic acid functional groups covalently attached



**Table 1**  
Characteristics of cation-exchange resins and respective columns.

Name	Functional Group	Support	Particle diameter / $\mu\text{m}$	Capacity <sup>a</sup> / $\mu\text{mol/mL}$	(w/w)% sulphur <sup>b</sup>	Dimension / mm
<i>Self-constructed columns</i> [37]						
P1	–	PS/DVB	4.1	–	–	2.0 × 100
W1	COO <sup>–</sup> /OH	PS/DVB	4.1	33 ± 1	–	2.0 × 100
W2	COO <sup>–</sup> /OH	PS/DVB	4.1	50 ± 1	–	2.0 × 100
M1	SO <sub>3</sub> <sup>–</sup> , COO <sup>–</sup> /OH	PS/DVB	4.1	51 ± 3	0.09 ± 0.00 <sub>1</sub>	2.0 × 100
M2	SO <sub>3</sub> <sup>–</sup> , COO <sup>–</sup> /OH	PS/DVB	4.1	52 ± 3	0.12 ± 0.01	2.0 × 100
M4	SO <sub>3</sub> <sup>–</sup> , COO <sup>–</sup> /OH	PS/DVB	4.1	68 ± 3	0.27 ± 0.02	2.0 × 100
M5	SO <sub>3</sub> <sup>–</sup> , COO <sup>–</sup> /OH	PS/DVB	4.1	314 ± 2	1.56 ± 0.01	2.0 × 100
S1	SO <sub>3</sub> <sup>–</sup>	PS/DVB	4.1	22 ± 2	0.09 ± 0.01	2.0 × 100
<i>Commercial columns</i>						
Metrosep C6 [43]	COO <sup>–</sup>	Silica	5.0	99 ± 2	–	2.0 × 150
PRP X-200 [44]	SO <sub>3</sub> <sup>–</sup>	PS/DVB	10	27 ± 2	0.31 ± 0.03	2.1 × 150

<sup>a</sup> proton capacity [37].

<sup>b</sup> Schoeniger combustion with subsequent SO<sub>4</sub><sup>2–</sup> quantification (IC) [37].

to the polymer substrate were produced in our laboratory according to the previously described procedure [37]. Unfunctionalized, uniform PS/DVB particles (55% crosslinking, 4.1  $\mu\text{m}$  average diameter, dispersity 1.01) were prepared according to Lungfiel et al. [38,39]. Porosity of the fully porous substrate ( $\epsilon_t = \epsilon_{\text{ext}} + \epsilon_{\text{int}} = 30\% + 40\%$ , 1100  $\text{m}^2\text{g}^{-1}$  specific surface area, 44 nm mean pore size  $\varphi_{50}$ ) was determined using inverted size exclusion chromatography with the Halász model and PSS PoroCheck Software (PSS, Mainz, Germany). The obtained resins were slurry-packed into 2 mm i.d. PEEK columns [37]. A silica-based Metrosep C6 column (Metrohm, Herisau, Switzerland) was used as commercially available reference material with hydrophilic properties [40]. PRP X-200 column (Hamilton, Reno, NV, USA) was used as an exemplary hydrophobic, PS/DVB-based strongly acidic cation-exchanger [41]. The characteristics of all columns used in this work are summarized in Table 1. Within the series of self-prepared columns, the letter in the abbreviated name represents the type of cation-exchanger as unfunctionalized (P), weakly acidic (W), strongly acidic (S) and mixed-acidic (M). Attached numbers indicate an increasing degree of functionalization. For the M series one batch of W2 was used as starting material providing a constant amount of carboxylic acid groups. As highly oxidative conditions, namely hydrogen peroxide in formic acid, were applied for self-constructed materials containing carboxylic acid groups, a multifunctional resin surface with additional hydrophilic groups as epoxides, diols or phenols must be considered indicated by OH as functional group.

The void volume  $V_0$  of the columns was calculated using a geometrical factor of 0.36 as significant retention of typical void markers (toluene, uracil, methanol, water) was observed. A major advantage of the geometrical factor, which was empirically determined based on prior experience in our laboratory and data reported in the literature [42], is its independence from the broad range of chromatographic conditions used in this study. The obtained  $V_0$  (0.20 mL - 2.0 × 100 mm; 0.30 mL-2.0 × 150 mm) are in acceptable agreement to the results obtained from minor disturbance experiments (Table S1).

Ultrapure water ( $\Omega \leq 0.054 \mu\text{S}$ ) from a MilliQ-system (Merck-Millipore Billerica, MA, USA) was used for the preparation of eluents and analyte solutions. Acetic acid (Fisher Scientific, Loughborough, UK), sodium hydroxide (Merck), hydrochloric acid (VWR Chemicals, Leuven Belgium), ethanol (Honeywell, Mücke, Germany), formic acid (VWR Chemicals, Leuven Belgium) and acetonitrile (Honeywell, Mücke, Germany) were used as received for the eluent preparation. All analytical test substrates were purchased in analytical quality from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and TCI Chemicals (Tokyo, Japan).

The pH of the mobile phases was measured and adjusted using a 914 pH/Conductometer (Metrohm, Herisau, Switzerland) calibrated with aqueous standard solutions (WTW, Weilheim, Germany) at pH 4.00/7.00 or 7.00/10.0. Buffer concentrations and pH of standard RPLC and HILIC eluents represent the aqueous phase only. Additionally, the eluent pH was measured after the addition of the organic modifier.

### 2.3. Methods

#### 2.3.1. Chromatographic tests

Hydrophobic properties were investigated at three different pH levels using a 30/70% v/v (aqueous buffer/acetonitrile) eluent. The aqueous buffers had a concentration of 100 mM formic acid (FA), ammonium formate (AF) prepared from formic acid and ammonium hydroxide, and ammonium carbonate (AC) with respective pH of 2.25, 4.96 and 9.18. Methylene selectivity  $\alpha(\text{CH}_2)_{\text{Tanaka}}$  was calculated using  $k(\text{pentylbenzene})/k(\text{ethylbenzene})$  [32]. As an additional measure for the material hydrophobicity methylene selectivities for homologous series of trialkylamines (TAA) and alkybenzenes (AB) were determined by the slope of retention factor-carbon number within one alkyl chain ( $n_c$ ) plot using  $n_c \geq 3$  [33].

For the evaluation of HILIC properties of the stationary phases, chromatographic tests were applied as proposed by Tanaka et al. [31]. Fig. S1 shows the structures,  $\text{pK}_a$ , names and abbreviations of the respective analytes used within this study. An acetonitrile/ammonium acetate (AA) buffer eluent (90/10% v/v) with a buffer concentration of 20 mM (pH = 4.81) in the aqueous phase was used as LC-MS compatible eluent.

#### 2.3.2. Confocal laser scanning microscopy

A suspension of 5 mg dried polymer, 0.5 mL DMSO, 0.5 mL 1% formic acid and 50  $\mu\text{L}$  1 mM cationic fluorescent dye Rhodamine-123 ( $\geq 85\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was homogenized and incubated over night at room temperature. The particles were precipitated and extracted three times with 50/50% v/v (ethanol/water) to remove non-specifically binding dye molecules. Prior to analysis, the polymer was allowed to equilibrate for 2 h in 50/50% v/v (DMSO/water). 5  $\mu\text{L}$  of the suspension were fixed on a glass plate using agarose pads (1% w/w in water).

#### 2.3.3. Excess adsorption isotherms

The minor disturbance method (MDM) was applied to measure excess adsorption isotherms of the given stationary phases. The columns were equilibrated for 2 h with a mobile phase of increasing organic modifier concentration (0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100% v/v). The mobile phases were pre-mixed

**Table 2**

Test parameters for cation-exchangers Metrosep C6, MCX M1 and PRP X-200: eluent: (hydrophobic tests) 30/70% v/v (100 mM FA buffer/acetonitrile); (hydrophilic tests) 10/90% v/v (20 mM AA buffer/acetonitrile); detection: ESI-MS, UV.

Methylene selectivity ( $n_C \geq 3$ ) and cation-exchange retention								
Column	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{Tanaka}}$	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{AB}}$	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{TAA}}$	$k^+(\text{Rb}^+)$				
C6	–	–	–0.20	21.77				
M1	1.22	0.09	0.13	0.92				
PRP	1.45	0.17	–	51.54				
Hydrophilic Tanaka test parameters								
Column	$k(\text{U})$	$\alpha(\text{CH}_2)$	$\alpha(\text{OH})$	$\alpha(\text{V/A})$	$\alpha(2\text{dG}/3\text{dG})$	$\alpha(\text{AXE})$	$\alpha(\text{CX})$	$\alpha(\text{Tb/Tp})$
C6	3.27	1.56	2.40	1.19	1.16	–0.02	14.77	1.34
M1	0.73	1.05	1.45	1.11	1.07	–0.39	85.38	0.84
PRP	0.09	–	–	–	–	–	–	–

manually. RI-detection was used for data evaluation. UV-detection provided orthogonal information on system equilibration and disturbance peaks.

Evaluation of the perturbation data of water and acetonitrile was performed as described by Noga et al. [30] using the solvent concentration in mol/L. As different substrates were used and the total surface area data could not be determined, MDM data were normalized to the inner volume of the stationary phase. Each isotherm was determined and validated by six repeated injections of water and acetonitrile with a mean relative standard deviation (%-RSD) of 0.5% for the retention time of water (Table S2).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Application in HILIC, RPLC, and IC mode

Three types of cation-exchangers were studied in terms of mixed-mode retention properties. A self-prepared MCX phase (M1) characterized by the direct covalent bonding of carboxylic and sulfonic acid groups to a hydrophobic PS/DVB substrate was compared to a PRP X-200 SCX and a silica-based Metrosep C6 WCX column. Fig. 1 shows the chromatograms of hydrophilic nucleoside derivatives, alkylbenzenes and trialkylamines for the columns in HILIC, RPLC and IC mode.

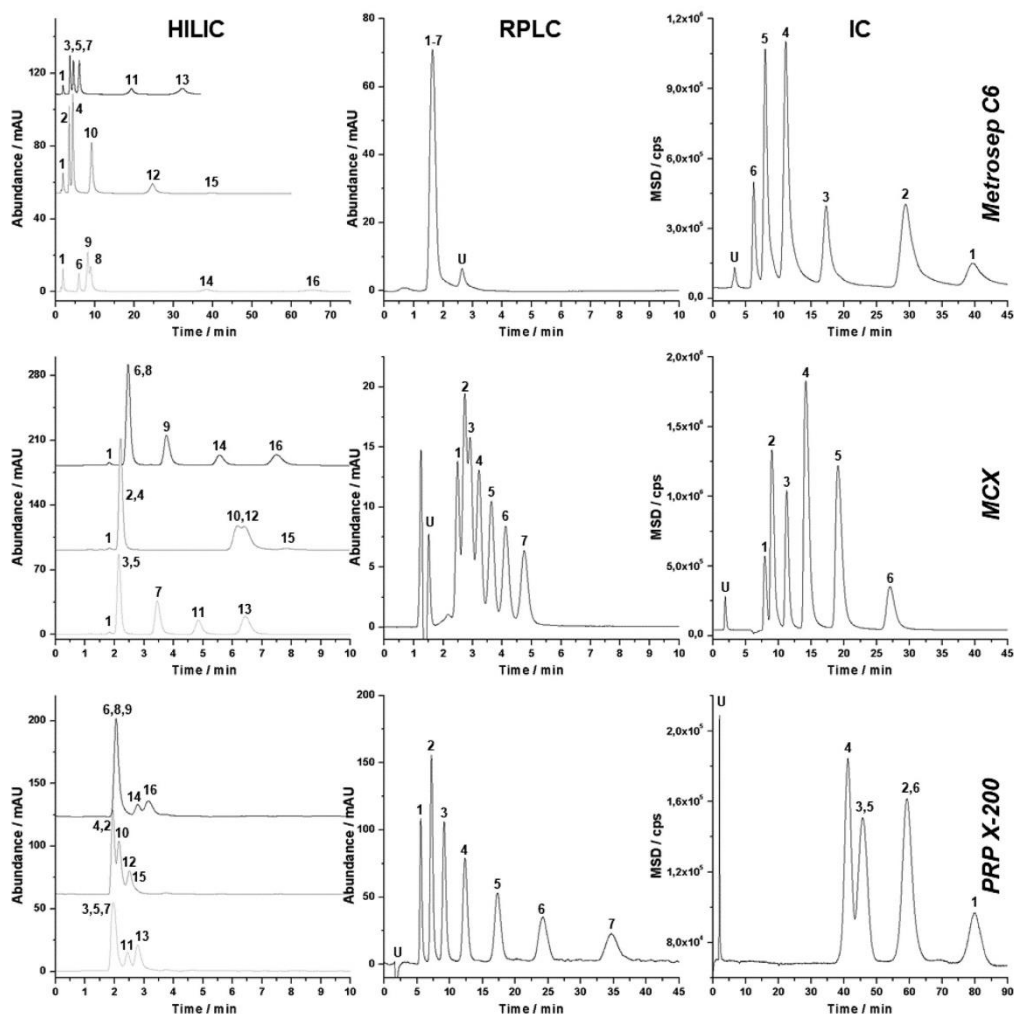
Metrosep C6 and MCX column offered retention factors in the range of typical HILIC columns for uridine ( $k(\text{U})$ ) indicating the hydrophilicity of both given phases (Table 2). In contrast to the highly hydrophilic Metrosep C6 which showed higher retention for all 16 hydrophilic test solutes, the PS/DVB-based M1 column was weakly retentive compared to the initial study set by Tanaka et al. [31]. The high selectivity of both columns on methylene, hydroxide and isomers was shown by the test parameters ( $\alpha(\text{CH}_2)$ ,  $\alpha(\text{OH})$ ,  $\alpha(\text{V/A})$ ,  $\alpha(2\text{dG}/3\text{dG}) > 1$ ). However, selectivity parameters were higher on Metrosep C6. As expected for cation-exchangers ion-exclusion was observed for anionic solutes, whereas cationic compounds were strongly retained on both phases. According to the obtained theobromine/theophylline selectivity, the Metrosep C6 column was assumed to be acidic, whilst the selectivity was inverted for the M1 column. The elution order on Metrosep C6 was comparable to common HILIC phases with T-U-A-C-G for all types of nucleoside derivatives [31,43,44]. Additionally, the 2'-deoxy series was less retained compared to the respective nucleosides, which indicates the effect of the solute's hydroxyl groups on hydrophilic interaction. The same elution order of nucleoside derivatives and the influence of analyte hydroxyl groups was obtained on the MCX M1 column. PS/DVB-based strongly acidic PRP X-200 showed only weak retention for the HILIC test set. As all nucleoside derivatives were eluted close to the column void, selectivity parameters were not calculated.

Acetonitrile concentration in the eluent was varied to estimate the mobile phase operating range for hydrophilic analytes in HILIC

mode (Fig. 2). Depending on the analyte properties the curve minima were between 60 and 30% v/v water in the mobile phase. On all three columns HILIC characteristics were found to be influenced by the hydrophilic nature of the analyte. Highly polar asparagine showed the strongest increase of retention using acetonitrile-rich eluents, whereas the impact on uracil and thymine was significantly lower. The increase in retention for adenine and cytosine in water-rich eluents can be explained by electrostatic interactions due to their lower  $pK_a$  (Fig. S1). This observation is in accordance with the influence of buffer salt concentration on nucleobase retention (Fig. S2). Reduced retention with higher buffer concentration for adenine and cytosine represents the positive effective charge of these compounds and the corresponding ion-exchange interactions. However, increased interactions at higher salt concentrations were obtained for uracil, thymine and guanine, which demonstrates that HILIC interactions are the main reason for nucleoside retention on Metrosep C6 and MCX M1. Metrosep C6 (Fig. S3) offered higher retention factors compared to PS/DVB-based MCX M1 demonstrating its more pronounced HILIC retention characteristics for the full range of eluent compositions (10–95% aqueous buffer). Limited suitability of PRP X-200 for HILIC mode was confirmed with U-Shape plots (Fig. 2).

RPLC mode was evaluated by the analysis of alkylbenzenes, trialkylamines, alkylsulfonic acids and alkanolic acids with growing alkyl chain length ( $n_C$ ) under conditions similar to the hydrophobic Tanaka test procedure [32]. The M1 and PRP X-200 columns showed the separation of alkylbenzenes according to their chain length as expected for RPLC mode (Fig. 1). The selectivity coefficients indicated good selectivity under RPLC conditions (Table 2). Contrarily, the neutral-hydrophobic compounds were not retained on silica-based Metrosep C6, showing that the aromatic and hydrophobic nature of PS/DVB was the reason for the discussed RPLC retention characteristics on M1 and PRP X-200. Alkylsulfonic acids eluted before the void at three different pH levels (pH = 2.25, 4.96, 9.18) due to ion-exclusion effects. This was confirmed by reducing the analyte charge and column capacity with an acidic eluent, which resulted in the elution of alkanolic acids near the column void.

Cation-exchange characteristics of the given phases were evaluated previously for amino acid, alkaline and alkaline earth metal cation separation [37]. Under the hydrophobic Tanaka test conditions, all three stationary phases offered cation-exchange retention as shown by rubidium cation and trialkylamines, which combine hydrophobic and ionic properties. The material substrate was shown to invert the selectivity in IC mode. Hydrophobic interactions determined the selectivity on PS/DVB-based M1, as an increasing  $\log P$  [45] correlated with analyte retention. Unless the same elution order was reported using Metrosep C6 in an pure aqueous mobile phase [40], trialkylamines were subject to hydrophilic interactions in 30/70% v/v aqueous buffer/acetonitrile. Hence retention increased with the hydrated radius as reflected



**Fig. 1.** Chromatograms of Metrosep C6 (150 × 2 mm) and MCX column (M1, 100 × 2 mm, except IC: M2) and PRP X-200 (150 × 2.1 mm). **HILIC (left):** 10/90% v/v (20 mM AA buffer/acetonitrile), analytes (100 ppm each, Tol 1 ppm) (1) toluol, (2) thymine, (3) thymidine, (4) uracil, (5) 2dU, (6) 5-MU, (7) 2dA, (8) uridine, (9) adenosine, (10) adenine, (11) 2dC, (12) cytosine, (13) 2dG, (14) cytidine, (15) guanine, (16) guanosine; detection: UV; **RPLC (centre):** 30/70% v/v (100 mM FA buffer/acetonitrile), analytes (100 ppm each) U – uracil (1 ppm), (1) benzene, (2) toluene, (3) ethylbenzene, (4) propylbenzene, (5) butylbenzene, (6) pentylbenzene, (7) hexylbenzene; detection: UV; **IC (right):** 30/70% v/v (100 mM FA buffer/acetonitrile), analytes (10 ppm each) (1) trimethylamine, (2) triethylamine, (3) tripropylamine, (4) tributylamine, (5) triptylamine, (6) trihexylamine; detection: ESI-MS.

by molar conductivity data [46] for the respective analytes (Fig. 1). The contribution of HILIC interactions may also explain the lower efficiency in comparison to M1 column. The inversion of selectivity by material substrate is in agreement with a previous report about alkylsulfonate separation using different anion-exchangers [47]. Trialkylamine retention on PRP X-200 decreased for analytes with  $n_C$  between one and four due to increasing shielding effects of the amine charge. This effect was overcompensated by hydrophobic interactions for  $n_C \geq 4$ .

Qualitative figures of merit for the exemplary chromatograms are presented in Table S3 and demonstrate the applicability of the

given phases under a broad range of eluent and analyte properties, but a direct comparison of the efficiencies is limited due to differences in retention factor. However, the study set representing a wide range of column properties demonstrated that cation-exchangers are not a universal tool for mixed-mode applications. Whilst silica-based weakly acidic Metrosep C6 was successfully applied in HILIC and IC mode, PS/DVB-based strongly acidic PRP X-200 proved to be well suited for RPLC and IC applications. Only self-prepared MCX M1 column provided sufficient retention in all chromatographic modes demonstrating the versatility of MCX stationary phases. The column chemistries under investigation were

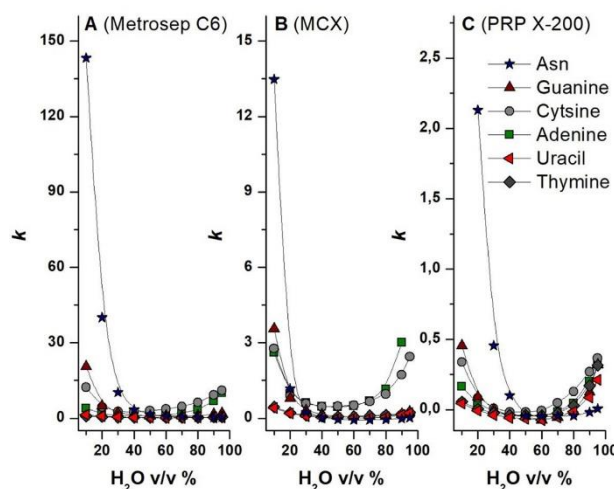


Fig. 2. U-shape plots on Metrosep C6 (A), MCX M1 (B) and PRP X-200 (C) column for asparagine, adenine, cytosine, guanine, thymine and uracil retention factor ( $k$ ); eluent: 10–95% v/v aqueous buffer (20 mM AA) in acetonitrile; detection: ESI-MS.

stable in terms of retention time (%-RSD < 1.3%) and maintained performance for more than one year of operation with switching between different pH and chromatographic modes.

The described multimodal properties make typical cation-exchange materials promising candidates for the application in complex analytical tasks. However, structural features and material properties inducing the mixed-mode character must be identified to enable a systematic selection of commercially available phases or the design of new highly stable cation-exchangers for multimodal applications.

### 3.2. Material characterization

#### 3.2.1. Confocal laser scanning microscopy

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to monitor the spatial distribution of functional groups within the polymer substrate. Fig. 3(A–D) shows the specific labelling of the spherical cation-exchange (CEX) resin particles with the cationic fluorescent dye Rhodamine-123 (Rh-123) without labelling of unfunctionalized PS/DVB substrate. After one week of storage in suspension, no differences and only insignificant background fluorescence were observed, which further indicates the specific binding of Rh-123 to CEX particles.

Labelling was performed in DMSO/1% FA (50/50% v/v) to provide a wetting agent for hydrophobic PS/DVB and a typical hydronium ion concentration used in chromatographic experiments. A dye overload was observed upon labelling using a buffer-free suspension, because the carboxylic acid groups on the resin were highly deprotonated. The self-prepared series of polymer-based MCX materials was investigated using the proposed procedure.

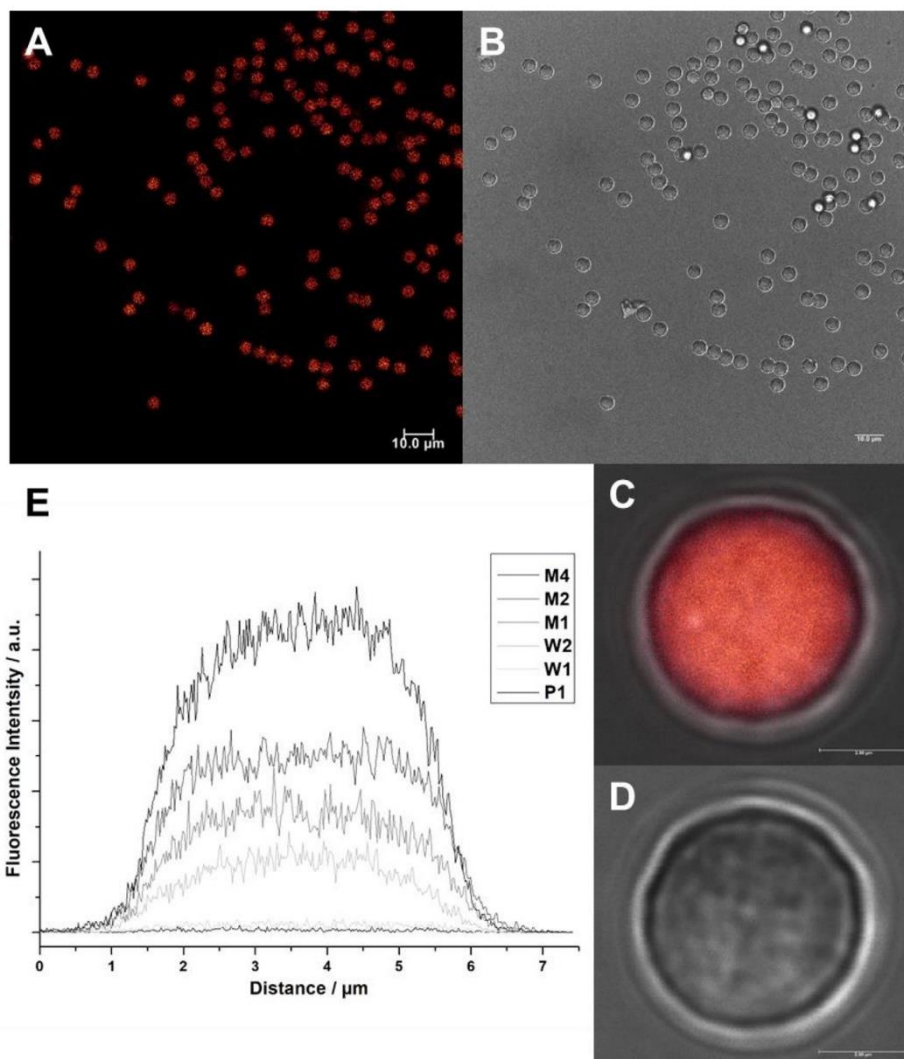
A correlation of material capacity and fluorescence intensity (Fig. 3E) and homogenous labelling of CEX sites (Fig. S4) was found for all particles under investigation. The shape of the intensity plots was comparable to studies on unfunctionalized mesoporous silica loaded with cationic fluorescent dye [48]. Contrarily, selective functionalization on the global particle surface, as typical for more complex polymer functionalization methods, can be monitored using the CLSM method [49,50]. As the STED microscope

used in this work exceeded the resolution of typical CLSM used in previous studies, homogeneous functionalization of the complete particle could be concluded, even though cross-fluorescence of adjacent confocal planes did not allow for the optimal instrument resolution [51]. The homogeneous spatial distribution of cation-exchange sites contradicts various articles claiming functionalization at the global particle surface based on a TEM imaging of a PS/DVB substrate with a significant lower degree of cross-linking (max. 12%) after  $\text{UO}_2^{2+}$ -labelling [52].

Polymer functionalization monitored by CLSM provided a reasonable argument for the ability of MCX columns to be operated under HILIC conditions. Highly hydrophilic carboxylic and sulfonic acid groups are very likely involved in water adsorption and thus alter the overall material polarity. The homogeneity of the full particle demonstrated an advantage of small molecule modification reactions, because the effect of local domains was minimized. The given data suggested that the full column participated in all chromatographic modes. This idea was supported by the similar performance data of RPLC and HILIC mode (Table S4). However, a correlation of functionalization and chromatographic properties as reported by Fritz et al. [18] for highly sulfonated PS/DVB, cannot be concluded from this data. For this, the influence of functionalization on hydrophilicity for low-capacity materials would have to be investigated in more detail.

#### 3.2.2. Excess adsorption isotherms

Excess adsorption isotherms (EAI) of water (Fig. 4) and acetonitrile (Fig. S5) were measured for all columns under investigation. The set of columns covered a broad range of typical curve shapes for RPLC, HILIC and MMC phases. The silica-based Metrosep C6 column (Fig. 4A) offered a strong excess adsorption of water over nearly the full range of eluent compositions. The measured isotherm was comparable to highly hydrophilic amine-functionalized silica-based HILIC columns [30]. The structural features of Metrosep C6 column, that caused water adsorption and consequently material hydrophilicity are the silica substrate as well as the highly polar, ionic carboxylic acid functional groups in the substrate coating. Unfunctionalized PS/DVB P1 column (Fig. 4B)



**Fig. 3.** Fluorescence imaging of fully porous PS/DVB spheres labelled with Rh-123. **A** STED image of labelled MCX M2 particles (scale bar 10  $\mu\text{m}$ ), **B** transmission signal of labelled MCX M2 particles (scale bar 10  $\mu\text{m}$ ), overlay of STED image and transmission signal for **C** single MCX M2 particle (scale bar 2  $\mu\text{m}$ ) and **D** unfunctionalized P1 particle (scale bar 2  $\mu\text{m}$ ). **E** Spatial distribution (x-y axis) of the mean fluorescence intensity ( $n_{\text{particle}} = 2$ ) as a function of functionalization.

and SCX column PRP X-200 showed the opposite effect. An excess of acetonitrile was adsorbed onto the hydrophobic surface under all mobile phase conditions. Curve progression of the isotherms was comparable to typical RPLC phases [34,36]. However, PRP X-200 exhibited less acetonitrile excess adsorption in comparison to unmodified PS/DVB. Due to the limited knowledge about the production process of PRP X-200 further explanations for this column cannot be concluded from the presented data. The series of self-prepared MCX columns with sulfonic and carboxylic acid functional groups offered properties of both types of isotherms

described before. Water and acetonitrile excess on the stationary phase surface changed between 20 and 30% v/v water in the mobile phase. The isotherms obtained for MCX materials were comparable with typical data for RP/CEX-mixed-mode columns (e.g. Obelisc R, SIELC Technologies) [30] but showed a smaller amplitude.

The influence of sulfonation was characterized by using MCX resins with different degrees of sulfonation and directly sulfonated PS/DVB substrate (Fig. 4B). Low-capacity sulfonation, which is typical for IC columns, showed minor effects on curve progression for

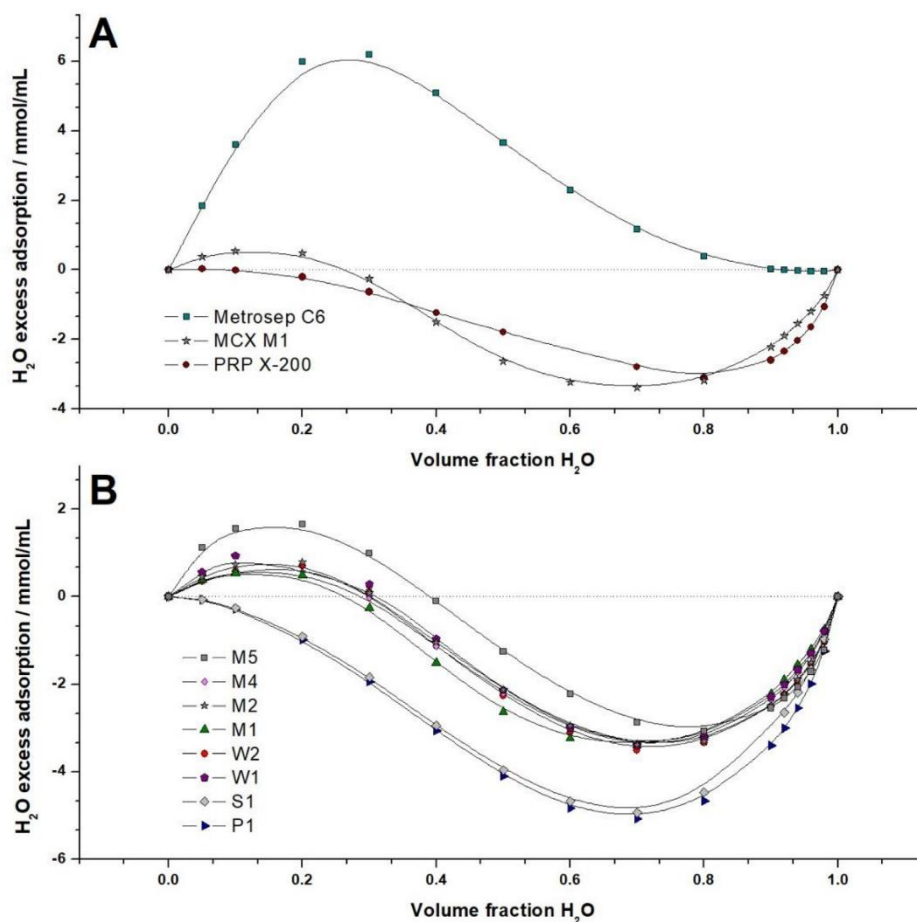


Fig. 4. Excess adsorption isotherms of water: A Metrosep C6, MCX M1, PRP X-200 columns; B homologous series of PS/DVB-based columns comprising unfunctionalized (P1), sulfonated (S1; 0.09% S), carboxylated (W1,2) and mixed-acidic (M1–5; 0.09–1.56% S) material; detection: RI.

the respective MCX resins (M1–4) within the scope of error and a high degree of similarity to the carboxylated materials (W1–2). Additionally, the EAI of directly sulfonated PS/DVB was comparable to the unfunctionalized starting material. Both experiments indicated that typical sulfonation (0.09–0.27% w/w sulphur in this study) does not have a predominant impact on overall material polarity. In contrast, carboxylic acid and hydroxyl functional groups were found to be a promising tool to induce hydrophilicity, probably due to their higher molar quantity compared to sulfonic acid groups. Because of the differences between WCX and SCX functional groups e.g. in acidity ( $pK_a$ ), cation retention was not influenced in the same way. A highly sulfonated MCX material (M5) with 1.56% sulphur was prepared and characterized to investigate the agreement of the findings presented with previous report [18] on such phases. An increase in water excess adsorption was found for M5 (Fig. 4B), which is consistent with the increased retention of glycols observed by Fritz et al. [18]. This finding supports

the idea that polar functional groups need to be present in a high molar number to influence overall material polarity despite permanent ionization of such functional groups.

The equilibration of the columns was shown by the reproducibility of disturbance signals (%-RSD,  $t_R$ ) (Table S2). The robustness of the given phases under both HILIC and RPLC conditions was shown by the lack of correlation between eluent composition and signal stability. However, extended column equilibration time of six hours was required for 20% water in the eluent when switching between both chromatographic modes.

Overall, material substrate and carboxylation reaction were found to be the major factors affecting the polarity of the columns. Contrary to the results of polymer imaging and cation-exchange retention [37] of the given phases, the low degree sulfonation showed only a minor effect on material polarity. The presented data leads to the hypothesis that SCX capacity and hydrophilic properties are independent parameters for low-capacity sulfonated

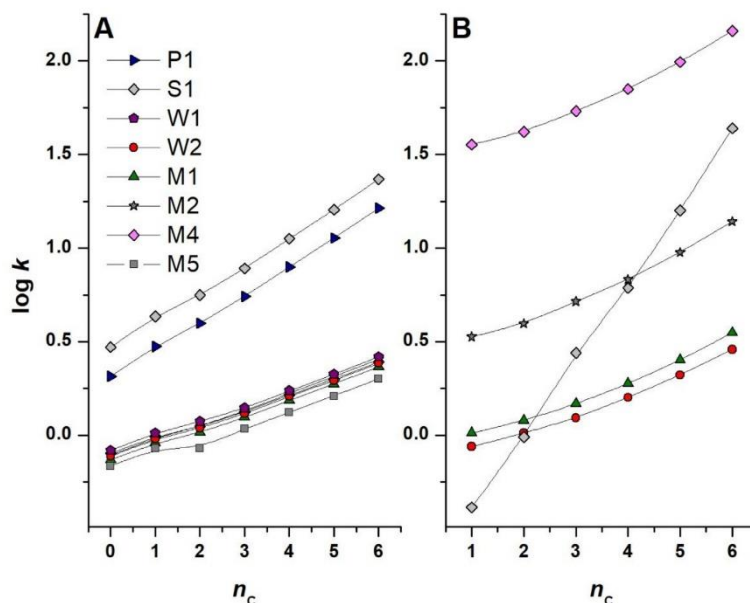


Fig. 5. Effect of polymer functionalization on the retention of a homologous of alkylbenzenes (A) and trialkylamines (B); eluent: 30/70% v/v (100 mM FA buffer/acetonitrile).

Table 3

Effect of polymer functionalization on methylene selectivity  $\alpha(\text{CH}_2)$  obtained for alkylbenzenes and trialkylamines ( $n_c \geq 3$ ), retention factor of rubidium and modified mixed-mode factor  $F_{\text{Rb}^+/\text{AB}}^*$ ; eluent: 30/70% v/v (100 mM FA buffer/acetonitrile).

Column	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{AB}}$	$\alpha(\text{CH}_2)_{\text{TAA}}$	$k(\text{Rb}^+)$	$F_{\text{Rb}^+/\text{AB}}^*$
P1	0.157	–	–	–
S1 (0.09% S)	0.158	0.401	1.14	7.22
W1	0.091	–	–	–
W2	0.089	0.122	0.77	8.65
M1 (0.09% S)	0.090	0.127	0.92	10.2
M2 (0.12% S)	0.092	0.143	3.17	34.5
M4 (0.27% S)	0.088	0.143	34.0	386
M5 (1.56% S)	0.088	–	–	–

resins. This enables the modular combination of substrate hydrophilization techniques and sulfonation to obtain tailor-made RPLC/HILIC/CEX mixed-mode columns.

### 3.3. Chromatographic characterization

This hypothesis was investigated by orthogonal chromatographic characterization of the MCX column series using the tests described in section 2.3.1.

The effect of polymer functionalization on hydrophobic interactions was investigated under RPLC conditions using alkylbenzene and trialkylamine retention (Fig. 5). Alkylbenzenes did not show differences in curve progression in the  $\log k$ - $n_c$  plot for carboxylated resins and were not influenced by further low-capacity sulfonation (Fig. 5A). However, the expected hydrophobicity of unfunctionalized and sulfonated PS/DVB was confirmed by the respective plot and methylene selectivities (Table 3). The resulting chromatograms demonstrated that carboxylation and high capacity sulfonation reduced retention for non-charged, hydrophobic alkylbenzenes (Fig. S6). The influence of eluent pH on column hy-

drophobicity was investigated, because a better shielding of the PS/DVB core was expected and, hence, lower hydrophobicity of ionic carboxylate anions compared to the protonated form. However, the pH modulation between 2 and 9 only led to a minor reduction of alkylbenzene retention (Fig. S7), which indicates that eluent pH is a secondary factor influencing the polarity of carboxylated resins. The influence of a charged functional group within the analyte was determined by the y-intercept in the analogous  $\log k$ - $n_c$  plot of trialkylamines, which correlated with the degree of sulfonation (Fig. 5B, Fig. S8). However, methylene selectivities remained nearly constant for the set of stationary phases with comparable polarity (Table 3). The obtained chromatograms confirmed a constant selectivity for the separation of trialkylamines, whereas the overall retention was found to be dependant on the degree of sulfonation or the respective SCX capacity (Fig. S9). Due to their high polarity short-chained alkylamines were not retained on unfunctionalized and weakly functionalized stationary phases. Numerically, the identified structure-property relationship was analysed by applying a modified mixed-mode factor  $F_{\text{Rb}^+/\text{AB}}^*$  [29], which represents the ratio between methylene selectivity (alkylbenzene series) and rubidium cation retention  $k(\text{Rb}^+)$  under modified hydrophobic Tanaka test conditions (Table 3). The resulting mixed-mode factor increased with SCX capacity, because only the retention of inorganic cations strongly depended on resin sulfonation. On highly sulfonated M5,  $\text{Rb}^+$  was not eluted within a reasonable time frame. The RPLC characterization was in good agreement with the characterization data presented in section 3.2 and supported the hypothesis that cation-exchange capacity and material polarity can be modified independently.

Similarly to the hydrophobic tests, the hydrophilic Tanaka selectivity parameters were not influenced by post-carboxylation functionalization reactions under HILIC conditions except in the case of highly sulfonated M5 (Table S4). Additionally, overall retention remained nearly constant for low-capacity MCX resins as deter-

mined by exemplary chromatograms (Fig. S10). Direct sulfonation of PS/DVB (S1 column) did not lead to significant retention of nucleoside derivatives. However, as non-charged hydrophilic analytes showed more retention, high-capacity sulfonation is another tool to induce hydrophilicity to PS/DVB, if the analysis of cationic compounds is not of interest. Sulfonation proved to be valuable for multimodal applications with cationic analytes, because it enables a systematic adjustment of cation retention without changing secondary interactions.

#### 4. Conclusions

This study demonstrates the influence of cation-exchange sites and polymer substrate on mixed-mode retention properties of cation-exchangers. MCX columns were able to separate nucleoside derivatives, alkylbenzenes and trialkylamines in HILIC, RPLC and IC mode respectively. Excess adsorption isotherms and polymer imaging showed the orthogonal effects of low-capacity sulfonation on material polarity and cation-exchange properties, which was confirmed by chromatographic characterization. While carboxylation successfully introduced hydrophilicity to the PS/DVB substrate, sulfonation predominantly influenced electrostatic interactions. This feature makes low-capacity sulfonation a valuable tool to adjust cation-exchange based retention due to the high impact on cationic solutes, whereas HILIC- and RPLC-like interactions remain constant. In contrast, commercially available PRP X-200 and silica-based Metrosep C6 columns extended the range of material and chromatographic properties, demonstrating the prospects of using existing IC phases for such multimodal applications.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### CRedit authorship contribution statement

**Matthias Schmitt:** Investigation, Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing – original draft. **Marina Egorycheva:** Investigation, Methodology. **Daniel Frerichs:** Investigation. **Svenja Fiedler:** Investigation, Methodology. **Peter L. Graumann:** Methodology, Resources. **Andreas Seubert:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Resources, Project administration, Writing – original draft.

#### Data availability

Data are available in the article, supporting information or from the authors upon reasonable request.

#### Acknowledgement

Metrohm AG (Herisau, Switzerland) is acknowledged for providing Metrosep C6 column and column packing equipment. The service facility for Elemental Analysis of Philipps-University Marburg is acknowledged for performing Schoeniger combustions. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.chroma.2023.463934](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463934).

#### References

- [1] J. Weiss, *Handbook of Ion Chromatography*, 4th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2016.
- [2] X. Liu, Y. Wang, H. Cong, Y. Shen, B. Yu, A review of the design of packing materials for ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 1653 (2021) 462313, [doi:10.1016/j.chroma.2021.462313](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462313).
- [3] A.V. Zatrakha, A.D. Smolenkov, O.A. Shpigun, Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta* 904 (2016) 33–50, [doi:10.1016/j.aca.2015.11.012](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.012).
- [4] K. Zhang, X. Liu, Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 19–34, [doi:10.1016/j.jpba.2016.09.013](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.013).
- [5] D. Sýkora, P. Řezanka, K. Záruba, V. Král, Recent advances in mixed-mode chromatographic stationary phases, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 89–129, [doi:10.1002/jssc.201801048](https://doi.org/10.1002/jssc.201801048).
- [6] L. Wang, W. Wei, Z. Xia, X. Jie, Z.Z. Xia, Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 495–506, [doi:10.1016/j.trac.2016.04.001](https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.001).
- [7] Thermo Fisher Mixed-Mode Columns, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/chromatography/liquid-chromatography-ic/hplc-uhplc-columns/mixed-mode-hplc-columns.html> (accessed December 2022).
- [8] Imtakt Mixed-Mode Columns, <https://sielc.com/columns> (accessed December 2022).
- [9] SIELC Technologies Mixed-Mode Columns, <https://sielc.com/columns> (accessed December 2022).
- [10] A.A. Kazarian, M.R. Taylor, P.R. Haddad, P.N. Nesterenko, B. Paull, Ion-exchange and hydrophobic interactions affecting selectivity for neutral and charged solutes on three structurally similar agglomerated ion-exchange and mixed-mode stationary phases, *Anal. Chim. Acta* 803 (2013) 143–153, [doi:10.1016/j.aca.2013.03.063](https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.063).
- [11] X. Liu, C.A. Pohl, Comparison of reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange trimodal stationary phases and their use in active pharmaceutical ingredient and counterion determinations, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 190–195, [doi:10.1016/j.chroma.2011.12.009](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.009).
- [12] A. Bauer, J. Luetjohann, S. Rohn, J. Kuballa, E. Jantzen, Development of an LC-MS/MS method for simultaneous determination of the quaternary ammonium herbicides paraquat, diquat, chlormequat, and mepiquat in plant-derived commodities, *Food Anal. Methods* 11 (2018) 2237–2243, [doi:10.1007/s12161-018-1201-6](https://doi.org/10.1007/s12161-018-1201-6).
- [13] Z. Kadlecová, K. Kalíková, D. Folprechtová, E. Tesařová, M. Gilar, Method for evaluation of ionic interactions in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* (2020) 1625, [doi:10.1016/j.chroma.2020.461301](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461301).
- [14] T.H. Walter, B.A. Alden, K. Berthelette, J.A. Field, N.L. Lawrence, J. McLaughlin, A.V. Patel, Characterization of a highly stable zwitterionic hydrophilic interaction chromatography stationary phase based on hybrid organic–inorganic particles, *J. Sep. Sci.* 45 (2022) 1389–1399, [doi:10.1002/jssc.202100859](https://doi.org/10.1002/jssc.202100859).
- [15] Y. Yang, X. Geng, Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8813–8825, [doi:10.1016/j.chroma.2011.10.009](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.009).
- [16] J. Fritz, Factors affecting selectivity in ion chromatography, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 8–17, [doi:10.1016/j.chroma.2004.12.087](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.087).
- [17] A.S. Popov, K.A. Spiridonov, A.S. Uzhel, A.D. Smolenkov, A.V. Chernobrovkina, A.V. Zatrakha, Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly(styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography, *J. Chromatogr. A* 1642 (2021) 462010, [doi:10.1016/j.chroma.2021.462010](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462010).
- [18] T.K. Chambers, J.S. Fritz, Effect of polystyrene-divinylbenzene resin sulfonation on solute retention in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 139–147, [doi:10.1016/S0021-9673\(97\)01208-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01208-9).
- [19] A.A. Loshin, A.D. Smolenkov, O.A. Shpigun, Porous polymeric substrates based on a styrene-divinylbenzene copolymer for reversed-phase and ion chromatography, *Moscow Univ. Chem. Bull.* 77 (2022) 68–89, [doi:10.3103/S0027131422020031](https://doi.org/10.3103/S0027131422020031).
- [20] E.S. Gilchrist, P.N. Nesterenko, N.W. Smith, L.P. Barron, Organic solvent and temperature-enhanced ion chromatography-high resolution mass spectrometry for the determination of low molecular weight organic and inorganic anions, *Anal. Chim. Acta* 865 (2015) 83–91, [doi:10.1016/j.aca.2015.01.031](https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.031).
- [21] H. Geng, Z. Wang, F. Zhang, Z. Li, B. Yang, A hyperbranched polyglycerol-functionalized polymer polar stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1670 (2022) 462946, [doi:10.1016/j.chroma.2022.462946](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462946).
- [22] Z. Li, S. Li, F. Zhang, H. Geng, B. Yang, A hydrolytically stable amide polar stationary phase for hydrophilic interaction chromatography, *Talanta* 231 (2021) 122340, [doi:10.1016/j.talanta.2021.122340](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122340).
- [23] Y. Shen, H. Geng, F. Zhang, Z. Li, B. Yang, A polyethyleneimine-functionalized polymer substrate polar stationary phase, *J. Chromatogr. A* (2022) 463711, [doi:10.1016/j.chroma.2022.463711](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463711).
- [24] X. Liu, Y. Jiang, F. Zhang, Z. Li, B. Yang, Preparation and evaluation of a polymer-based sulfobetaine zwitterionic stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1649 (2021) 462229, [doi:10.1016/j.chroma.2021.462229](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462229).
- [25] A.S. Rasheed, B.A. Al-Phalahy, A. Seubert, Studies on behaviors of interactions between new polymer-based ZIC-HILIC stationary phases and carboxylic acids, *J. Chromatogr. Sci.* 55 (2017) 52–59, [doi:10.1093/chromsci/bmw149](https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw149).
- [26] L. Sonnenschein, A. Seubert, Separation of inorganic anions using a series of sulfobetaine exchangers, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1185–1194, [doi:10.1016/j.chroma.2010.12.101](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.101).



- [27] A.S. Rasheed, Influence of capacity on the retention characteristics in Zwitter Ion Chromatography (ZIC) and ZIC-Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) on four different sulfobetaine stationary phases, Dissertation (2014) 179.
- [28] C. Liang, C.A. Lucy, Characterization of ion chromatography columns based on hydrophobicity and hydroxide eluent strength, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8154–8160, doi:10.1016/j.chroma.2010.10.065.
- [29] P.N. Nesterenko, E.P. Nesterenko, Hydrophobicity of polymer based anion-exchange columns for ion chromatography, *Heliyon* 7 (2021) e07290, doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07290.
- [30] S. Noga, S. Bocian, B. Buszewski, Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods, *J. Chromatogr. A* 1278 (2013) 89–97, doi:10.1016/j.chroma.2012.12.077.
- [31] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5903–5919, doi:10.1016/j.chroma.2011.06.048.
- [32] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic characterization of silica c18 packing materials. correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721–728, doi:10.1093/chromsci/27.12.721.
- [33] A. Tchaplá, H. Colin, G. Guiochon, Linearity of homologous series retention plots in reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 56 (1984) 621–625, doi:10.1021/ac00268a007.
- [34] Y.V. Kazakevich, R. LoBrutto, F. Chan, T. Patel, Interpretation of the excess adsorption isotherms of organic eluent components on the surface of reversed-phase adsorbents: effect on the analyte retention, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 75–87, doi:10.1016/S0021-9673(00)01239-5.
- [35] F. Gritti, Y.V. Kazakevich, G. Guiochon, Effect of the surface coverage of end-capped C18-silica on the excess adsorption isotherms of commonly used organic solvents from water in reversed phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 111–124, doi:10.1016/j.chroma.2007.08.071.
- [36] F. Gritti, G. Guiochon, Effects of the surface concentration of fixed charges in C18-bonded stationary phases on the adsorption process and on the preparative chromatography of small ionizable compounds, *J. Chromatogr. A* 1372 (2014) 42–54, doi:10.1016/j.chroma.2014.10.003.
- [37] M. Schmitt, M. Egoricheva, A. Seubert, Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids, *J. Chromatogr. A* 1664 (2022) 462790, doi:10.1016/j.chroma.2021.462790.
- [38] K. Lungfiel, A. Seubert, Applying hydrophilicity to PS/DVB-beads via introduction of protected comonomers, *Chromatographia* 79 (2016) 5–17, doi:10.1007/s10337-015-3001-0.
- [39] K. Lungfiel, A. Seubert, Varying the porous structure of polystyrene/divinylbenzene beads prepared by Ugelstads activated swelling technique and examining its reversed phase HPLC properties, *J. Chromatogr. A* 1358 (2014) 117–127, doi:10.1016/j.chroma.2014.06.085.
- [40] Metrohm, C6 product manual, <https://www.metrohm.com/en/documents/81078050> (accessed September 2021).
- [41] Hamilton, Hamilton, PRP X-200 specification, <https://www.hamiltoncompany.com/de/laboratory-products/hplc-columns/cation-exchange/prp-x200> (accessed September 2021).
- [42] V.R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th ed., John Wiley & Sons Inc, Chichester, 2010.
- [43] G. Marrubini, B.E. Castillo, G.Massolini Mendoza, Separation of purine and pyrimidine bases and nucleosides by hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 803–816, doi:10.1002/jssc.200900672.
- [44] D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez, Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 47 (2013) 111–128, doi:10.1016/j.trac.2013.02.011.
- [45] C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, *Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and Steric Constants*, 2nd ed., American Chemical Society, Washington D.C., 1995.
- [46] D.R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, 2016.
- [47] M. Aceto, C. Sarzanini, O. Abollino, E. Mentasti, Ion chromatographic separation of alkylsulphonic acids with conductivity detection, *Chromatographia* 41 (1995) 445–449, doi:10.1007/BF02318620.
- [48] J.B.S. Ng, P. Kamali-Zare, H. Brismar, L. Bergström, Release and molecular transport of cationic and anionic fluorescent molecules in mesoporous silica spheres, *Langmuir* 24 (2008) 11096–11102, doi:10.1021/la801179v.
- [49] A.S. Goldmann, A. Walther, L. Nebhani, R. Joso, D. Ernst, K. Loos, C. Barner-Kowollik, L. Barner, A.H.E. Müller, Surface modification of poly(divinylbenzene) microspheres via thiol-ene chemistry and alkyne-azide click reactions, *Macromolecules* 42 (2009) 3707–3714, doi:10.1021/ma900332d.
- [50] K. Cheng, C.C. Landry, Diffusion-based deprotection in mesoporous materials: a strategy for differential functionalization of porous silica particles, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 9674–9685, doi:10.1021/ja070598b.
- [51] F. Dempwolf, F.K. Schmidt, A.B. Hervás, A. Stroh, T.C. Rösch, C.N. Riese, S. Dersch, T. Heimerl, D. Lucena, N. Hülsbusch, C.A.O. Stuermer, N. Takeshita, R. Fischer, B. Eckhardt, P.L. Graumann, Super resolution fluorescence microscopy and tracking of bacterial flotillin (Reggie) paralogs provide evidence for defined-sized protein microdomains within the bacterial membrane but absence of clusters containing detergent-resistant proteins, *PLoS Genet* 12 (2016) 1–29, doi:10.1371/journal.pgen.1006116.
- [52] G.J. Sevenich, J.S. Fritz, Preparation of sulfonated gel resins for use in ion chromatography, *React. Polym.* 4 (1986) 195–203.

## Supplementary material

### Factors affecting mixed-mode retention properties of cation-exchange stationary phases

Matthias Schmitt<sup>a</sup>, Marina Egorycheva<sup>a</sup>, Daniel Frerichs<sup>a</sup>, Svenja Fiedler<sup>a,b</sup>,  
Peter Graumann<sup>a,b</sup> and Andreas Seubert<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Marburg, Faculty of Chemistry, Hans-Meerwein-Str. 4, 35043 Marburg,  
Germany

<sup>b</sup>SYNMIKRO, LOEWE Center for Synthetic Microbiology, University of Marburg, Hans-  
Meerwein-Str. 6, 35043 Marburg, Germany

**Table S1:** Thermodynamic void volume as obtained from EAI experiments and theoretical numbers using a geometrical factor of 0.36.

Column	$V_0$ (geom.) / mL	$V_0$ (EAI) / mL	Geom. factor (calc.)
Metrosep C6	0.302	0.356	0.245
P1	0.201	0.211	0.328
W2	0.201	0.240	0.236
W1	0.201	0.242	0.230
M4	0.201	0.241	0.233
M5	0.201	0.245	0.220
M2	0.201	0.232	0.262
M1	0.201	0.242	0.230
S1	0.201	0.213	0.322
PRP X-200	0.333	0.358	0.311

**Table S2:** Reproducibility of retention time (%-RSD) in excess adsorption isotherm experiments, detection: RI.

	C6		P1		W1		W2		M1		M2		M4		M5		S1		PRP	
% v/v H <sub>2</sub> O	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD	n	%-RSD
0	6	0.34	6	0.46	6	0.19	6	0.07	6	0.17	6	0.19	6	0.11	6	0.19	6	0.39	6	0.09
5	6	2.53	6	0.54	6	0.31	6	0.20	6	0.19	6	0.39	6	0.07	6	0.14	6	0.37	6	0.18
10	6	0.96	6	0.45	6	0.81	6	0.30	6	0.28	6	1.82	6	0.19	6	0.14	6	0.35	6	0.51
20	6	0.29	6	0.06	6	0.09	6	1.96	6	0.29	6	0.25	6	1.64	6	0.25	6	0.44	6	0.32
30	6	0.27	6	0.44	6	0.20	6	0.24	6	0.26	6	0.08	6	0.23	6	0.45	6	0.31	6	0.22
40	6	0.24	6	0.52	6	0.13	6	1.68	6	0.47	6	0.55	6	0.33	6	0.45	6	0.26	6	0.30
50	6	0.22	6	0.45	6	0.29	6	0.86	6	0.29	6	0.51	6	0.17	6	0.18	6	0.36	6	0.51
60	6	0.13	6	0.64	6	0.34	6	0.52	6	0.98	6	0.68	6	0.36	6	0.08	6	0.25	6	1.95
70	5	0.16	6	0.19	6	0.20	6	3.15	6	0.03	6	0.01	6	0.27	6	0.02	6	0.15	4	5.59
80	5	0.31	6	0.17	6	0.24	6	1.16	6	1.17	6	0.33	6	0.28	6	0.27	6	0.19	6	0.15
90	5	0.06	6	0.15	6	0.17	6	0.35	6	0.63	6	0.30	6	0.12	6	0.21	6	0.91	6	0.18
92	5	0.28	6	0.40	6	0.06	6	0.75	6	0.87	6	0.74	6	0.17	6	0.11	6	0.16	6	0.28
94	5	0.23	5	0.21	6	0.09	6	0.28	6	0.12	6	0.39	6	0.19	6	0.19	6	0.18	6	0.31
96	5	0.10	5	0.25	6	0.12	5	0.58	6	0.44	6	0.35	6	0.11	6	0.17	6	0.14	6	0.63
98	4	0.36	5	0.19	6	0.14	5	0.14	6	0.06	6	0.12	6	1.10	6	0.19	6	0.11	6	0.04
100	4	0.19	4	0.13	5	0.15	3	3.34	6	0.20	5	0.57	2	7.11	9	0.32	6	0.40	2	0.10
<b>mean</b>		<b>0.42</b>		<b>0.33</b>		<b>0.22</b>		<b>0.97</b>		<b>0.40</b>		<b>0.46</b>		<b>0.78</b>		<b>0.21</b>		<b>0.31</b>		<b>0.71</b>

**Table S3:** Qualitative figures of merit for exemplary MCX (M1) and Metrosep C6 column. \*IC data obtained using MS-detection causing additional extra-column void.

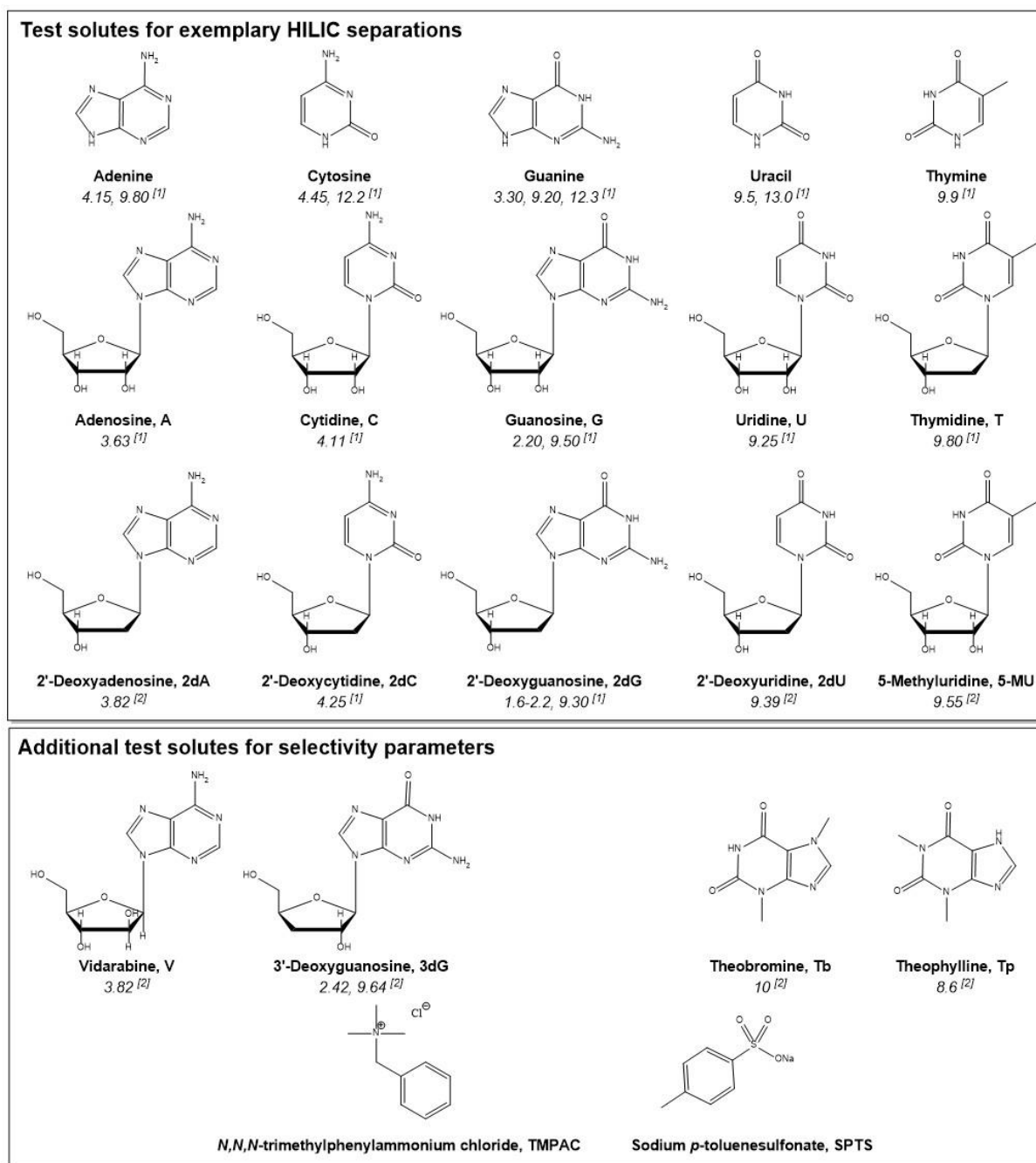
Column	N / m			As		
	C6	M1	PRP	C6	M1	PRP
<b><i>HILIC (Tanaka test solutes)</i></b>						
Adenosine	6700	18100	-	1.19	1.56	-
Guanosine	12600	21400	-	0.85	1.52	-
5mU	9300	16600	-	1.33	1.37	-
Uridine	10100	17000	-	1.35	1.32	-
Adenine	10900	15800	-	1.30	2.63	-
Cytosine	11500	25600	-	1.05	1.82	-
Guanine	13700	19100	-	0.78	1.45	-
Thymine	7300	18800	-	1.67	1.35	-
Uracil	8500	19100	-	1.59	1.32	-
2dA	9300	18000	-	1.39	1.54	-
2dC	11400	22400	-	1.11	1.47	-
2dG	11300	20800	-	0.99	1.54	-
Thymidine	7200	15300	-	1.59	1.35	-
2dU	8200	15800	-	1.52	1.35	-
Theobromine	8500	16600	-	1.52	1.37	-
Theophene	8000	17000	-	1.64	1.41	-
Vid	10600	18700	-	1.25	1.49	-
3dG	12700	20900	-	0.99	1.45	-
Cytidine	17170	19740	-	0.99	1.49	-
<b><i>RPLC (Alkylbenzenes)</i></b>						
C0	-	14900	10000	-	1.11	1.37
C1	-	12300	9200	-	1.01	1.32
C2	-	14500	9600	-	1.49	1.28
C3	-	13900	9700	-	1.10	1.23
C4	-	17100	9900	-	1.10	1.22
C5	-	17700	10000	-	1.15	1.27
C6	-	18500	10400	-	1.18	1.23

**Table S3:** continued.

<b>IC (Trialkylamines)</b>						
Rb	7500	5600	7100	2.33	1.64	1.12
C1	10500	8600	14600	1.39	1.15	1.25
C2	8200	5100	13500	1.79	1.56	0.93
C3	10500	8200	13600	1.64	1.49	1.00
C4	7000	7000	12600	1.89	1.49	0.95
C5	6100	9100	11700	1.96	1.41	1.09
C6	5900	12100	11100	1.89	1.33	0.96

**Table S4:** Effect of polymer functionalization towards hydrophilic Tanaka test parameters: eluent: 10/90 % v/v (20 mM AA buffer/acetonitrile); detection: ESI-MS.

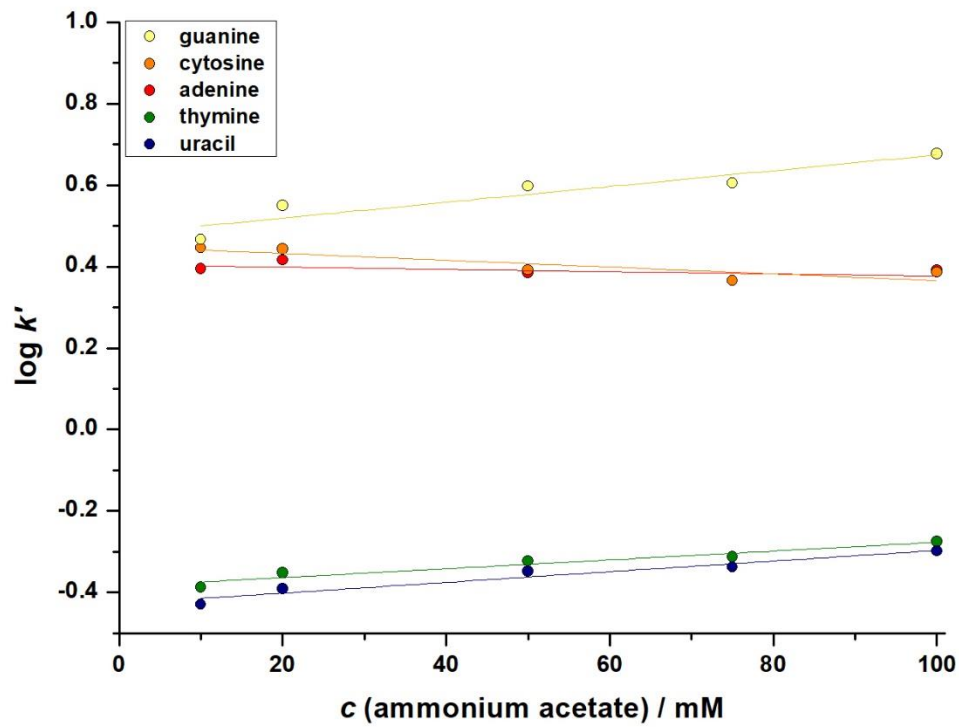
<b>Column</b>	<b><math>k(U)</math></b>	<b><math>\alpha(CH_2)</math></b>	<b><math>\alpha(OH)</math></b>	<b><math>\alpha(V/A)</math></b>	<b><math>\alpha(AX)</math></b>	<b><math>\alpha(CX)</math></b>	<b><math>\alpha(Tb/Tp)</math></b>	<b><math>\alpha(2dG/3dG)</math></b>
S1	0.059	-	-	-	-	-	-	-
W1	0.503	0.986	1.244	1.00	-0.538	57.2	0.84	1.00
W2	0.737	1.046	1.461	1.11	-0.380	84.3	0.83	1.07
M1	0.725	1.050	1.449	1.11	-0.393	85.4	0.84	1.07
M2	0.683	1.042	1.440	1.09	-0.424	104	0.83	1.07
M4	0.770	1.041	1.293	1.09	-0.327	99.7	0.87	1.07
M5	1.881	1.122	1.575	1.09	-0.148	95.9	0.83	1.13



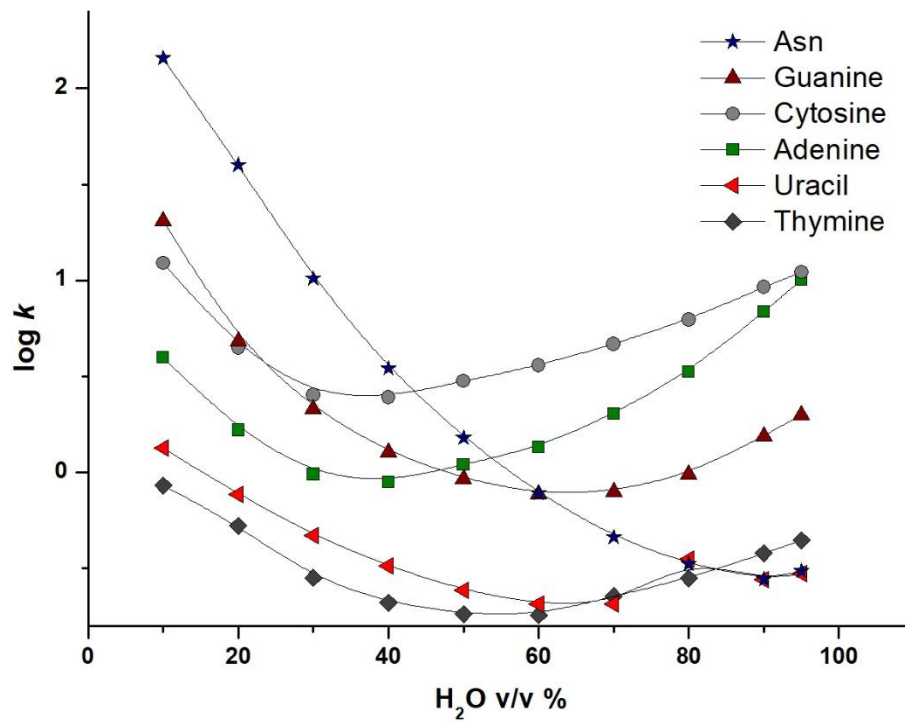
**Fig. S1:** Structure and  $pK_a$  of test solutes under hydrophilic conditions.

[1] R.M.C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, Data for Biochemical Research, Oxford, Clarendon Press, 1959.

[2] Scifinder database (accessed March 2023)

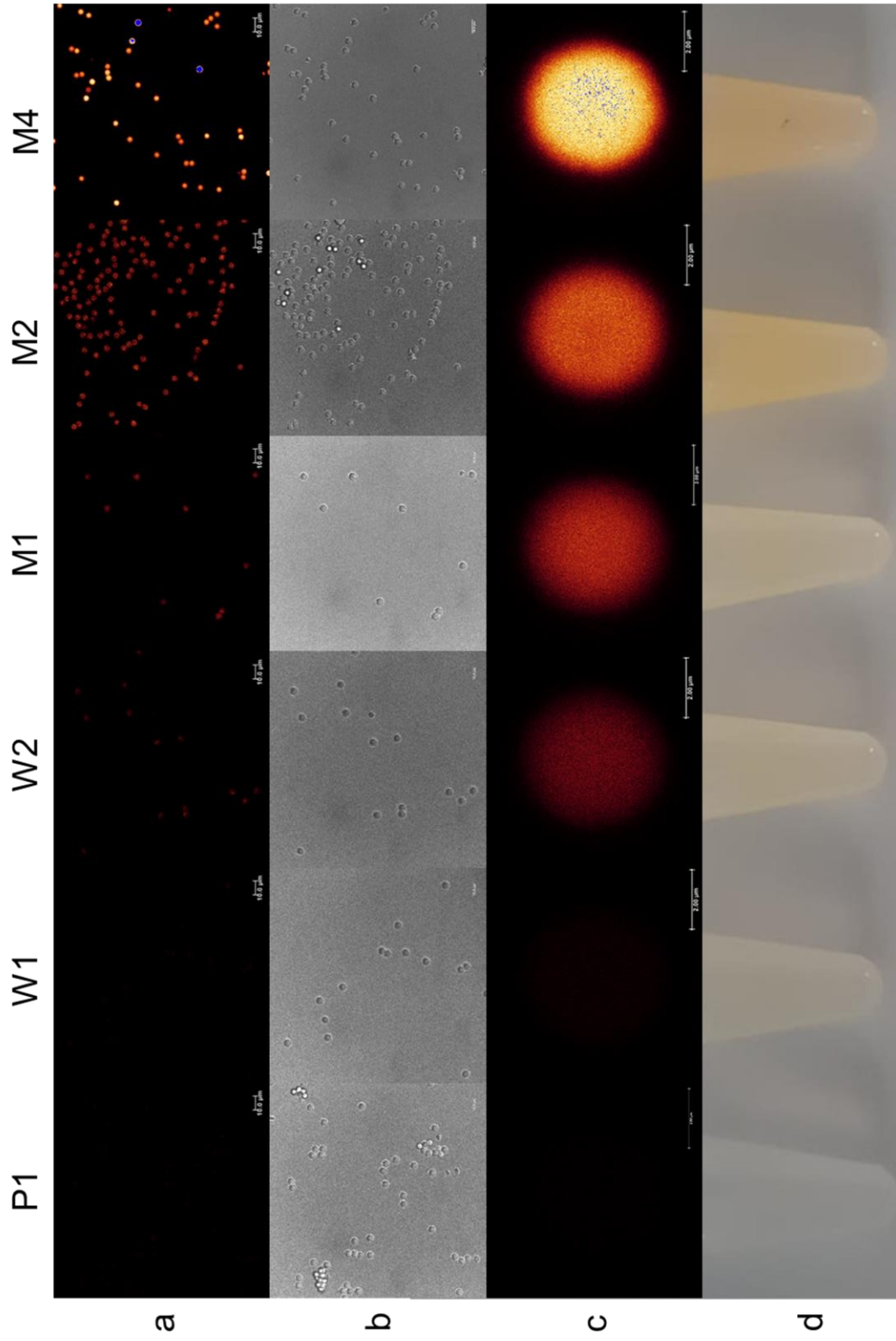


**Fig. S2:** Influence of ionic strength towards the retention of nucleobases. Column: M1, Eluent: 10/90 % v/v (buffer/acetonitrile), buffer pH: 4.85 (10 mM) to 3.75 (100 mM), eluent pH: 8.23 (10 mM) to 7.26 (100 mM); analyte concentration: 10 ppm each

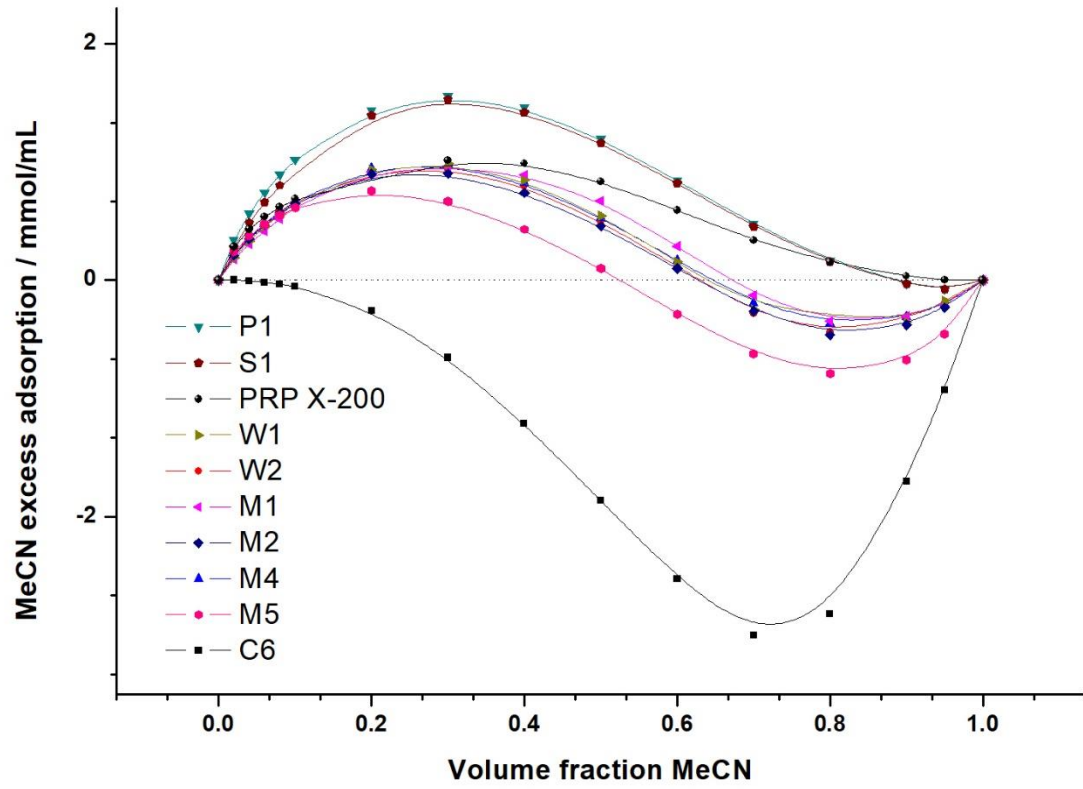


**Fig. S3:** U-shape plots on Metrosep C6 column for asparagine, adenine, cytosine, guanine, thymine and uracil as logarithmic retention factor ( $\log k$ ); eluent: 10-95 % v/v aqueous buffer (20 mM AA) in acetonitrile; detection: ESI-MS.

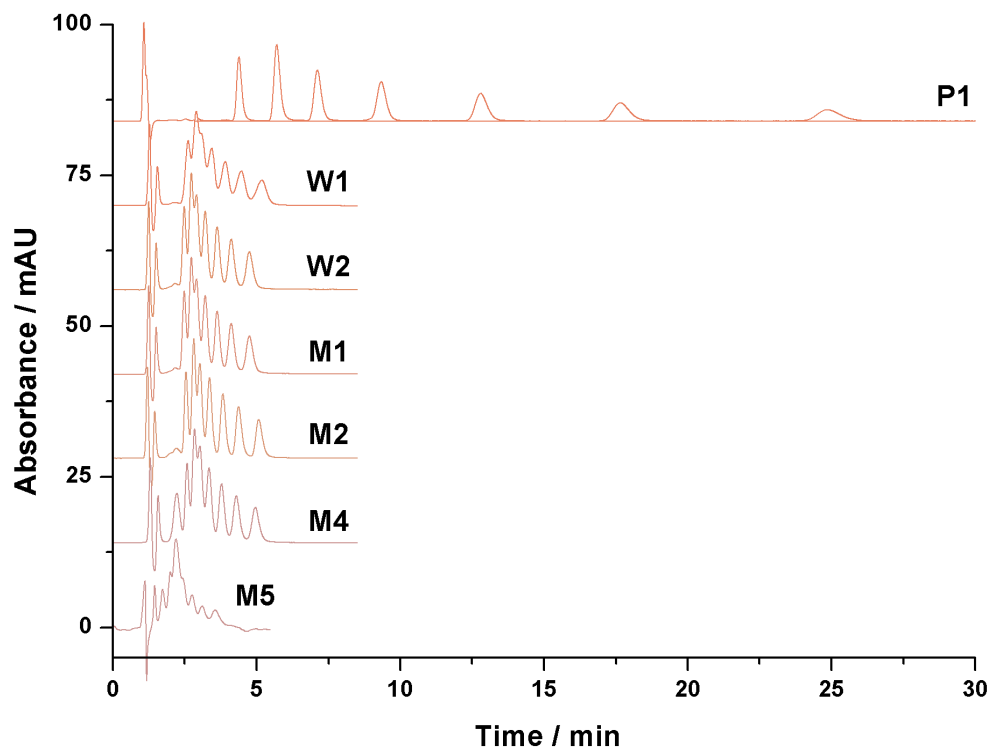




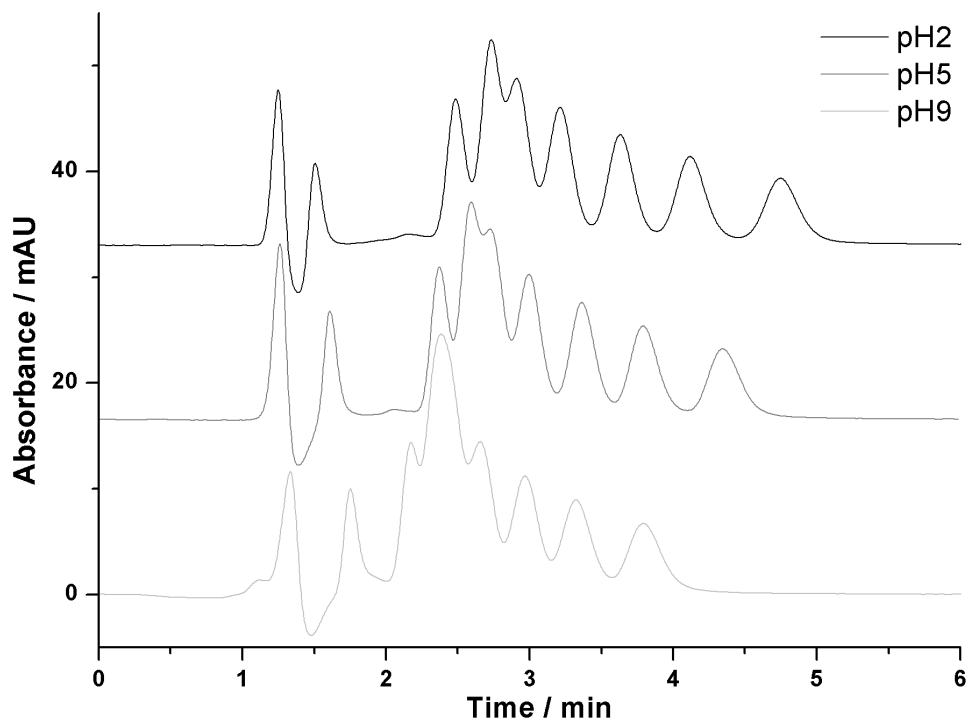
**Fig. S4:** Rh-123 labelled PS/DVB particles: (a) STED image (overview, scale bar 10 µm), (b) transmission image (overview, scale bar 10 µm), (c) STED image (single particle, scale bar 2 µm) as used for intensity plots, (d) polymer suspension prior to fluorescence imaging



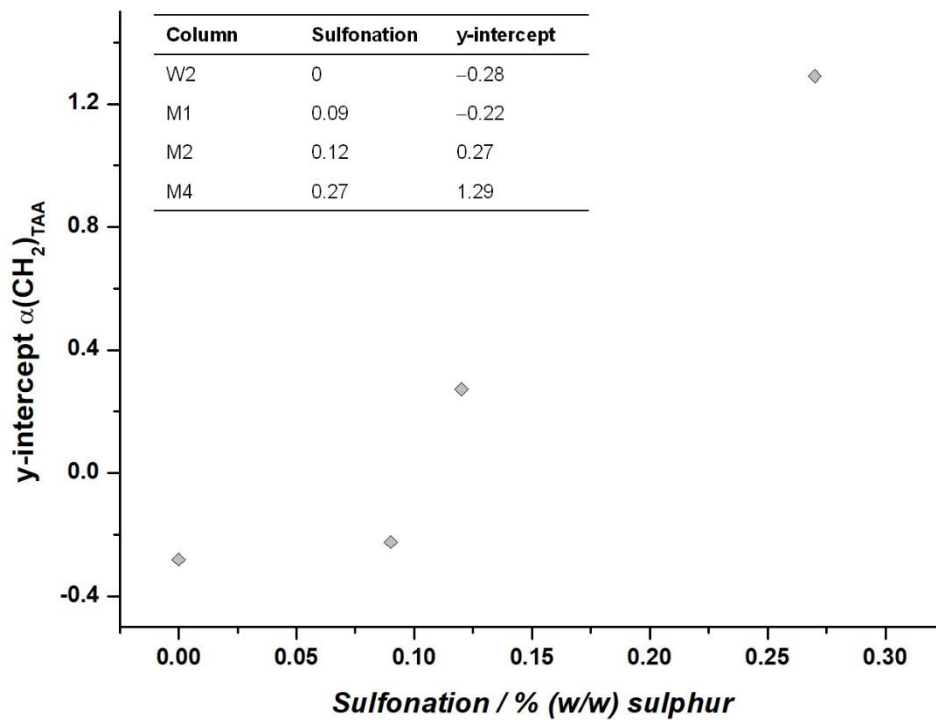
**Fig. S5:** Excess adsorption isotherms of acetonitrile for all columns under investigation.



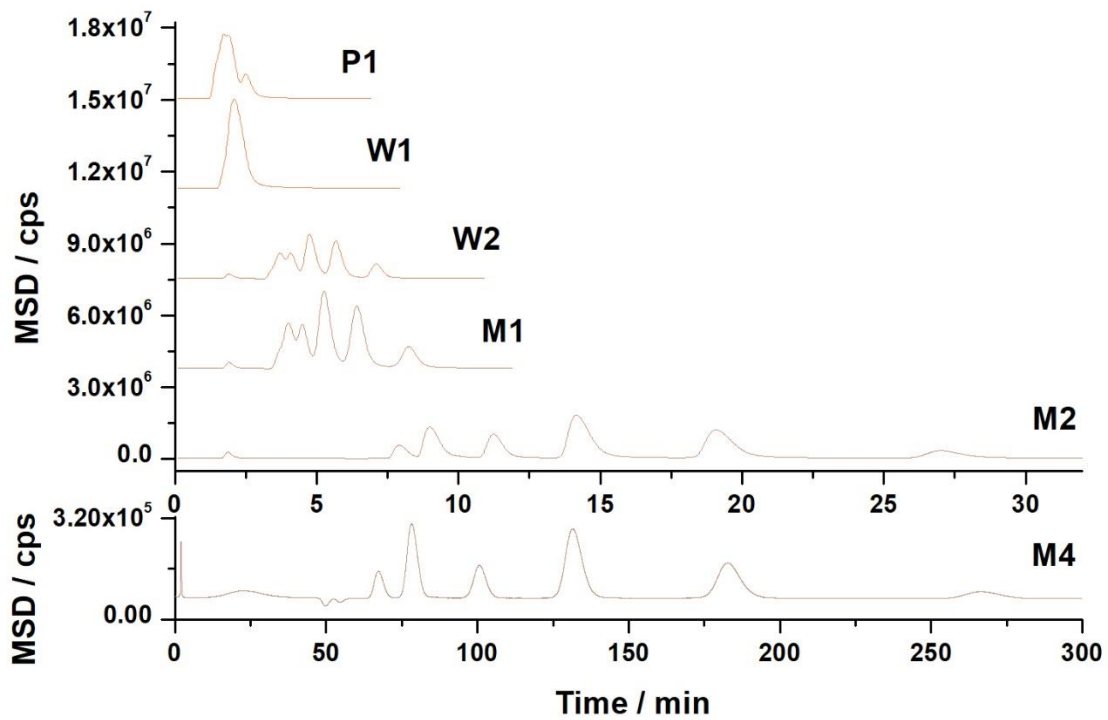
**Fig. S6:** Separation of seven alkylbenzenes on a homologous series of cation-exchange columns: eluent: 30/70 % v/v (100 mM FA/acetonitrile); detection: UV, analyte concentration: 100 ppm.



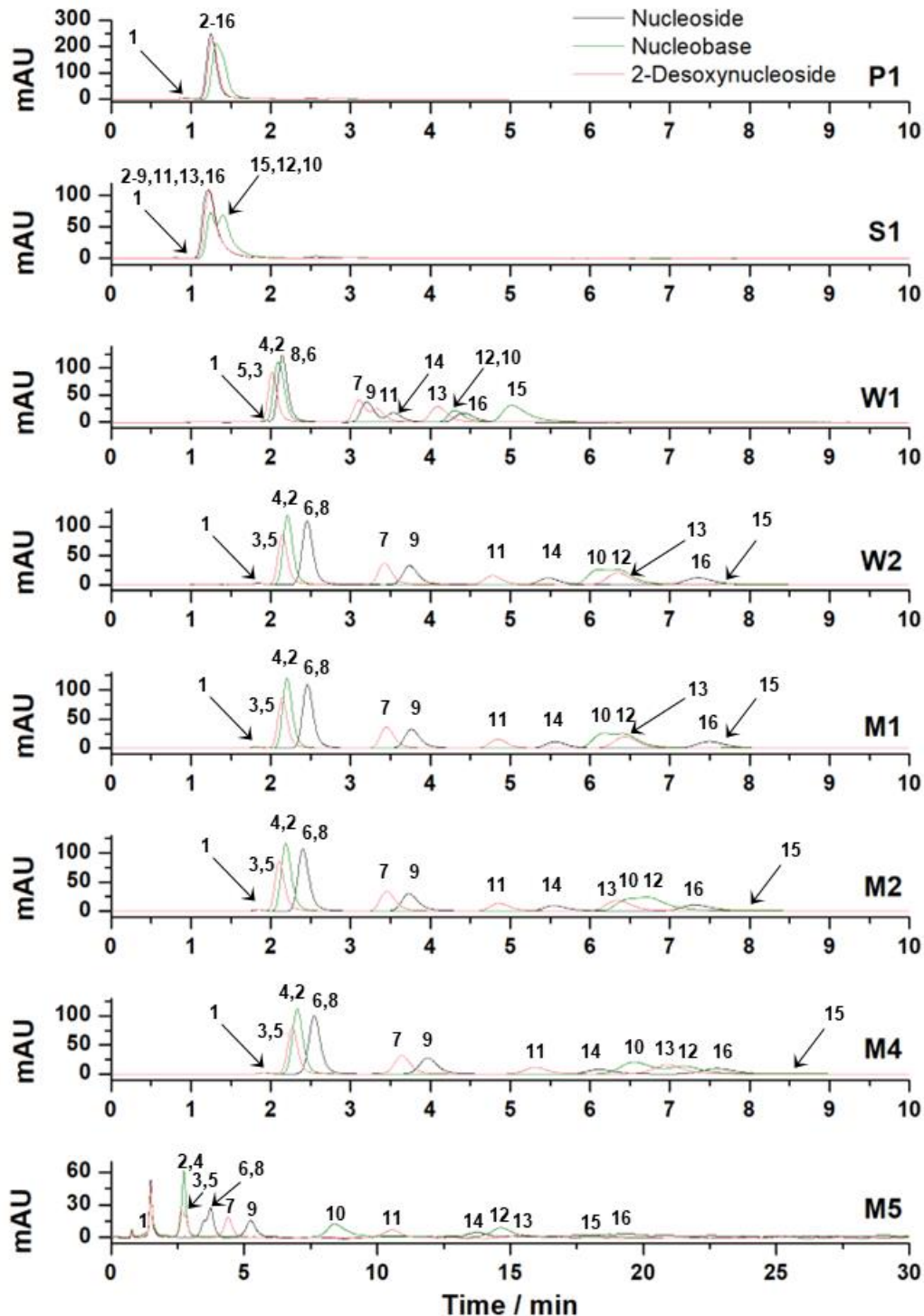
**Fig. S7:** Separation of seven alkylbenzenes on W2 column at different pH: eluent: 30/70 % v/v (buffer/acetonitrile), buffer: 100 mM FA (pH = 2.25), 100 mM AF (pH = 4.96), 100 mM AC (pH = 9.18), analyte concentration: 100 ppm.



**Fig. S8:** Influence of sulfonation towards y-intercept of methylene selectivity for trialkyl amines.



**Fig. S9:** Separation of six trialkylamines on a series of different cation-exchange columns: eluent: 30/70 % v/v (100 mM FA buffer/acetonitrile); detection: ESI-MS, analyte concentration: 10 ppm.



**Fig. S10:** Chromatograms of PS/DVB-based columns under HILIC conditions: eluent: 10/90 % v/v (20 mM AA buffer/acetonitrile), analytes (10 ppm each) (1) toluol, (2) thymine, (3) thymidine, (4) uracil, (5) 2dU, (6) 5-MU, (7) 2dA, (8) uridine, (9) adenosine, (10) adenine, (11) 2dC, (12) cytosine, (13) 2dG, (14) cytidine, (15) guanine, (16) guanosine.

Journal of Analytical Atomic Spectrometry



JAAS

**Characterization of metal-labeled ion-exchange  
microparticles using single-particle inductively coupled  
plasma mass spectrometry**

Journal:	<i>Journal of Analytical Atomic Spectrometry</i>
Manuscript ID	JA-ART-11-2023-000417
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	28-Nov-2023
Complete List of Authors:	Schmitt, Matthias; Philipps-Universität Marburg, Zhou, Zichao; Queens University, Chemistry Meiers, Emelie; Philipps-Universität Marburg Schipplick, Luca; Philipps-Universität Marburg Beauchemin, Diane; Queens University, Chemistry Seubert, Andreas; Philipps-Universität Marburg

SCHOLARONE™  
Manuscripts



## Characterization of metal-labeled ion-exchange microparticles using single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry

Matthias Schmitt<sup>a</sup>, Zichao Zhou<sup>b</sup>, Emelie Meiers<sup>a</sup>, Luca Schipplick<sup>a</sup>, Diane Beauchemin<sup>b</sup>, Andreas Seubert<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Marburg, Faculty of Chemistry, Hans-Meerwein-Str. 4, 35043 Marburg, Germany

<sup>b</sup>Queen's University, Department of Chemistry, 90 Bader Lane, Kingston, ON K7L 3N6, Canada

### Abstract

A novel methodology was developed for the characterization of polymer microparticles by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS) using cation exchangers as model materials. Microparticles with a diameter of 4.5 and 10  $\mu\text{m}$  were detected using both covalently attached sulfur and electrostatically labeled metal cations. Barium cations were found to be the optimal metal tag due to the high affinity to the cation-exchanger and improved sensitivity compared to the direct detection of sulfur. Particle functionalization was semi-quantitatively monitored for a series of structurally similar sulfonated materials with a critical bulk mass-fraction of 0.21% sulfur (4.5  $\mu\text{m}$  particles) or a respective barium mass of 0.59 pg per particle. Average barium mass per event correlated well with the mass-fraction of sulfur obtained from combustion ion chromatography experiments. Sample heterogeneity was monitored for particle batches produced by different synthetic procedures and was compared to microscopy data. Flow injection reduced sample consumption, increased robustness, and facilitated data evaluation. The transport efficiency was optimized using infrared (IR) heating of the sample introduction system (20-250  $^{\circ}\text{C}$ ). Compared to a Scott double-pass spray chamber, the number of particles detected increased 10-fold when the modified cyclonic spray chamber with an IR heater in a modified baffle was operated above 135  $^{\circ}\text{C}$ . The method extends the possibilities of sp-ICP-MS for the detection of functionalized particles and the identification of their chemical properties.

### Introduction

Inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry (MS) operated in single-particle mode (i.e., sp-ICP-MS) is an increasingly popular technique for the analysis of metal nanoparticles in a variety of samples from materials science to biomedical applications.<sup>1</sup> A more recent and rapidly growing field of application is the analysis of nm- to  $\mu\text{m}$ -sized carbon-based particles<sup>2</sup>, for which sp-ICP-MS proved to be complementary to Fourier-transform infrared spectroscopy, Raman microscopy and pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry.<sup>3,4</sup> Possible applications of such sp-ICP-MS methodology are multifold as polymer particles are not only

critical to the environment and human health but important technical products, e.g. in separation science or drug transport, that need to be characterized.<sup>5,6</sup>

Several articles describe the detection of  $\mu\text{m}$ -sized particles by monitoring carbon isotopes even in complex samples, despite the variety of potential non-particulate carbon sources.<sup>7-10</sup> Figures of merit and matrix compatibility were successfully improved by using ICP tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS).<sup>11</sup> However, the low sensitivity and the elevated background are still critical aspects using this approach.<sup>2,3</sup> Recently, ICP time-of-flight MS was used for the quasi-simultaneous detection of  $^{12}\text{C}^+$  and doped rare earth elements in microplastic beads.<sup>12</sup>

Alternatively, the heteroatom content of various types of polymer particles can be employed for their detection using sp-ICP-MS, which provides chemical information for identification of the particles. Such a heteroatom-based approach was used by Gelman et al. for the monitoring of polytetrafluoroethylene (PTFE) particles by detecting the  $^{138}\text{Ba}^{19}\text{F}^+$  polyatomic interference after addition of barium nitrate to the carrier.<sup>13</sup>

A complementary approach to the direct determination of carbon or covalently attached heteroatoms is the labeling of particles with abundant isotopes, which allows for an increased sensitivity. Thus, Jiménez-Lamana et al. compared different labeling approaches. Tagging carboxylated nanoplastics with positively charged gold nanoparticles was found to be the most effective technique, while direct  $\text{Ag}^+$  metal labeling was insufficient for a sensitive detection.<sup>14,15</sup> Additionally, an optimized tagging with nanoparticles was developed by Lai et al. to label common plastic types and detect them in the presence of matrix nanoparticles.<sup>16</sup>

Most of the above-mentioned studies used a Scott double-pass spray chamber or single-cell setup with continuous nebulization for sample analysis and calibration. Poor transport efficiencies below 1% for  $\mu\text{m}$ -sized particles and cells were reported for standard sample introduction systems consisting of a pneumatic nebulizer fitted to a Scott double-pass spray chamber. This figure of merit was improved by using a linear pass spray chamber designed for the analysis of cells, although 100% transport efficiency was not achieved.<sup>10,17-19</sup> Challenges for the analysis of microparticles using these setups are low transport efficiencies, high sample consumption and low sample throughput as well as memory effects and a lack of robustness.<sup>2,20</sup>

Injecting a known amount of sample into a carrier using flow injection (FI)<sup>21</sup> or monosegmented flow analysis (MSFA)<sup>22</sup> eliminates errors associated with measurements of sample uptake rate and transport efficiency, while providing comparable results as sp-ICP-MS for determination of nanoparticle mass. Additionally, either FI or MSFA reduces memory effects and the contamination of the ICP (e.g. with carbon originating from detergents used to stabilize the particle suspension).<sup>22,23</sup> However, neither approach has been tested with microparticles.

Infrared (IR) heating of the sample introduction system (where a cyclonic spray chamber has an IR heater inserted in a modified baffle and the connection to the torch is also IR-heated) provides total consumption for nanoparticles.<sup>24</sup> It has yet to be used for the measurement of microparticles. Heating the aerosol reduces the droplet size and noise originating from the desolvation and vaporization of the droplets in the ICP.<sup>25,26</sup>

Irrespectively of the sample introduction system, available methods require knowledge of the chemical composition and density of the particle prior to the determination of the size of microparticles.<sup>10</sup> However, a stoichiometric labeling as expected for metal cations that correlates with the number of charged functional groups within the particle would be an interesting approach to characterize the chemical identity of engineered particles. To the best of our knowledge, an approach based on characterizing chemical properties such as the number and interparticle homogeneity of ionizable functional groups has not been previously investigated. Various particles including ion-exchangers and nanolipids would be suitable for such an approach and have not been characterized on a single-particle level yet. Additionally, microplastics tend to undergo oxidation and carboxylation over time in the environment and are thus another promising object of study.<sup>9,15,27</sup>

This study aims to expand the set of available methodologies for the analysis of functionalized microparticles using sp-ICP-MS to enable more advanced applications. An electrostatic metal ion labeling procedure was developed to increase sensitivity and allow for semi-quantitative characterization of the microparticles. Additionally, FI-sp-ICP-MS and IR-heating of the sample introduction system were applied to carbon-based microparticles for the first time.

## **Experimental**

### **Chemicals and materials**

Ultrapure water from a MilliQ-system (Merck-Millipore Billerica, MA, USA) and an Atrium Pro system (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany) was used for all experiments. Barium nitrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), rubidium carbonate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), sodium perrhenate (Chempur, Karlsruhe, Germany), Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Germany), and ethanol (Honeywell, Mücke, Germany) were used as received. Sub-boiled nitric acid (69%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Calibration was performed using a Certipur® multielement-standard VI (Merck, Darmstadt, Germany) for rubidium and barium. Alternatively, single element 1000 mg L<sup>-1</sup> stock solutions were purchased from SCP Science (Baie d'Urfé, QC Canada).

### Preparation and characterization of model particles

Polystyrene/divinylbenzene (PS/DVB) particles were prepared and characterized as described previously.<sup>28</sup> Table S1 shows the composition of the series of self-prepared functionalized materials obtained from the same batch of polymer substrate. Sulfur was determined using a Schoeniger combustion with subsequent sulfate quantitation using anion-exchange chromatography (Offline Combustion IC). The obtained data were confirmed on a relative scale using rubidium retention in cation-exchange chromatography and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Carboxylic acid groups were quantified as proton capacities obtained from displacement experiments and were normalized to the respective polymer mass.

### Sample preparation

A suspension of 5 mg dried polymer, 0.5 mL ethanol, 0.5 mL water and 0.1 mL labeling solution was homogenized and incubated overnight at 21 °C. Saturated Ba(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and 1 M Rb<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were used for metal ion labeling. The particles were precipitated and washed seven times with 20/80% (v/v) (ethanol/water) to remove unspecifically binding metal ions. The final extraction was performed with water. The labeled particles were dried overnight at 60 °C and were weighed to determine the mass concentration of the respective slurry. A stock suspension of 5000 ppm was prepared in 1 mM Triton X-100 as a non-ionic detergent.

Prior to analysis, the stock suspension was homogenized using ultrasonication and diluted with 1 mM Triton X-100 to obtain the final slurries. Particle suspensions were sonicated and shaken at least every 30 min before analysis. Stock suspensions were stored at room temperature and were stable for over six months. A slurry concentration of 10 ppm labeled particles was selected as a compromise between maximizing the number of detected particles and minimizing multi-particle events (Fig. S2). Calibration was performed by FI of 20 µL of 0.1 to 50 µg L<sup>-1</sup> standard solution diluted with 1 mM Triton X-100 as described before.<sup>22</sup> Transient signals were integrated over a constant time window. To avoid the formation of aggregates in the instrument tubing and an enrichment of the detergent in the sample introduction system, 0.7% nitric acid was added to the sample queue every ten injections.

### Instrumentation

An 7500ce ICP-MS instrument (Agilent, Tokyo, Japan) comprising a Scott double-pass spray chamber operated at 2 °C and a Mira Mist polyetheretherketone (PEEK) nebulizer (Burgener Research Inc., Mississauga, ON, Canada) was the mainly used instrument in this study. The instrument was equipped with the standard quartz torch with an injector diameter of 2.5 mm. Table 1 shows the operating parameters. It was connected to an ASX 520 autosampler (CETAC Technologies, Omaha, NE, USA) and an Integrated Sample Introduction System

(Agilent, Tokyo, Japan) consisting of an injection valve with a 20- $\mu$ L sample loop and an additional peristaltic pump and using the operating parameters in Table S2.

Experiments using the IR-heated sample introduction system with a 50 mL modified baffled cyclonic spray chamber described elsewhere<sup>24</sup> were carried out on a Varian 820MS ICP-MS instrument (Mulgrave, Australia) using a PFA260 nebulizer (Burgener Research Inc.) and the operating conditions summarized in Table 1. A quartz torch with an injector diameter of 2.3 mm was used. For reference, a Scott double-pass spray chamber (SCP Science) was used. A correction for the average quadrupole settling time of 41 ms was done as described previously.<sup>29</sup>

**Table 1:** ICP-MS operating parameters.

Parameter	Value	
	7500ce (Agilent)	820MS (Varian)
RF power (kW)	1.55	1.3
Sampling position (mm)	8.2	5.5
Plasma gas flow rate (L min <sup>-1</sup> )	15.0	18.0
Auxiliar gas flow rate (L min <sup>-1</sup> )	0.20	1.80
Nebulizer gas flow rate (L min <sup>-1</sup> )	0.95	0.90
Sample uptake rate ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> )	382	25-75
Isotopes measured (m/z)	138 ( <sup>138</sup> Ba <sup>+</sup> ), 85 ( <sup>85</sup> Rb <sup>+</sup> ), 34 ( <sup>34</sup> S <sup>+</sup> ), 48 ( <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>+</sup> ), 185 ( <sup>185</sup> Re <sup>+</sup> )	137 ( <sup>137</sup> Ba <sup>+</sup> )
Acquisition time (s)	30 (cont. asp.), 50 (FI)	35
Dwell time (ms)	10	10

### Sample uptake rate and transport efficiency

The sample uptake rate was determined daily and obtained from a five-minute aspiration of water in triplicates. Particle number concentrations (PNC) were determined using a counting chamber Neumann (Marienfeld, Lauda, Germany) with two replicate fillings per sample combined with optical microscopy. 20 images at 10x magnification were taken per replicate using a Axiotech 100HD microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Canon EOS 1200D (Canon, Tokyo, Japan) camera. Images were processed using the ImageJ2 software with Fiji package to determine PNCs. Transport efficiency (TE) was determined using a modified particle frequency method.<sup>30</sup> The number of detected events from 20  $\mu$ L FI of the slurry was compared to the counted PNC.

As no certified PNCs were available for the materials under investigation, TEs of non-particulate solutions were determined gravimetrically by weighing the infeed and drainage

before and after 10 min of aspiration. To compare dissolved samples and slurries, the metal tags were extracted into solution by suspending the labeled particles in 69 % nitric acid (0.5 mL), subsequent filtration with PTFE syringe filters (0.45  $\mu\text{m}$ ) and rinsing three times with 4 M nitric acid (0.1 mL). The obtained signals from FI of 20  $\mu\text{L}$  of each of the filtrate and the respective slurry were integrated. The resulting area ratio was multiplied by the solution TE to obtain the total TE for the slurry. Exemplary data for a variety of particle batches exhibiting a broad range of particle size and functionalization are provided in Table S3.

### **Data processing**

The data collected in time-resolved mode were exported and processed using Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). A threshold of three times the standard deviation of the average signal was used to discriminate between particle events and the background. The procedure was iterated to account for all particle events independently of the number of detected events.

When a significant background signal was observed in FI mode, the peak resulting from dissolved elements was fitted and subtracted using Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Particle intensity distributions were estimated through the application of Equation S1 (log-normal fit).

A dwell time of 10 ms was used in this study to maximize signal intensity per particle.<sup>10</sup> As the dwell time is significantly longer compared to an average event duration of 600  $\mu\text{s}$ , event intensities were multiplied by the dwell time to obtain the respective integral. The sum integral of all events was used to determine the heteroatom mass using the calibration function, and dividing by the number of detected events yielded the average heteroatom mass of an event.

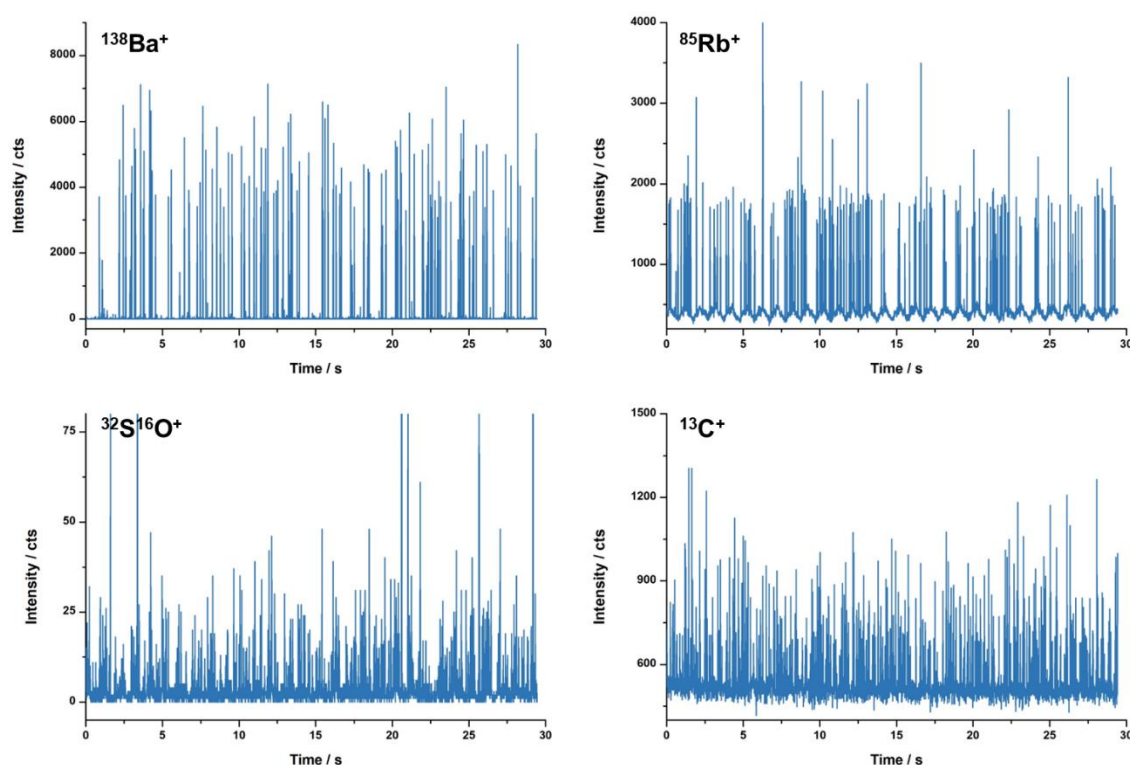
A multivariate optimization of temperature (20 to 250  $^{\circ}\text{C}$ ) and sample uptake rate (25 to 75  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) to maximize TE was conducted for the IR-heated setup using Minitab® 18 (Minitab Inc., State College, PA, USA) with a face-centered composite experimental design.

## **Results and discussion**

### **Heteroatom-based detection of polymer microparticles**

Sulfonated PS/DVB particles (7.21 % (w/w) S) were detected using either electrostatic labeling with metal tags or the intrinsic S and C atoms (Fig. 1). Barium and rubidium were identified as promising metal tags because they are fully ionized in the ICP and are free of critical interferences. Additionally, both metal ions have a stable charge in the aqueous labeling solution.  $\text{Ba}^{2+}$  tags offer a high signal-to-noise ratio due to their strong electrostatic interaction with the cation-exchanger. In contrast,  $\text{Rb}^{+}$  shows significant background due to the equilibrium population of the cation-exchange sites with  $\text{H}^{+}$  and  $\text{Rb}^{+}$ . The stability of the metal tags was

studied by adding nitric acid to the slurry.  $\text{Ba}^{2+}$  electrostatic tag was highly stable in presence of an excess of nitric acid (Fig. S3) and tagged particles were detectable in the full concentration range (0 to 120 mM nitric acid). In contrast,  $\text{Rb}^+$  was already removed at low concentrations of nitric acid (1 mM). This difference in binding stability could be a reason for the insufficient labeling reported in previous studies using monocationic  $\text{Ag}^+$ .<sup>14</sup> The specific labeling of charged functional groups was verified by submitting unfunctionalized particles to sp-ICP-MS and EDX analysis after the labeling and washing procedure. No signal was observed in both control experiments. In combination with prior experience for sulfonated particles in cation-exchange chromatography,  $\text{Ba}^{2+}$  can thus be considered one of the most robust cationic tags in an aqueous environment, which is additionally reflected by the high ratio of charge to hydrated radius.<sup>31,32</sup>



**Figure 1:** Comparison of different detection strategies for sulfonated PS/DVB microparticles: indirect detection through electrostatically attached metal tags (*top*) and direct detection of carbon and sulfur atoms (*bottom*).

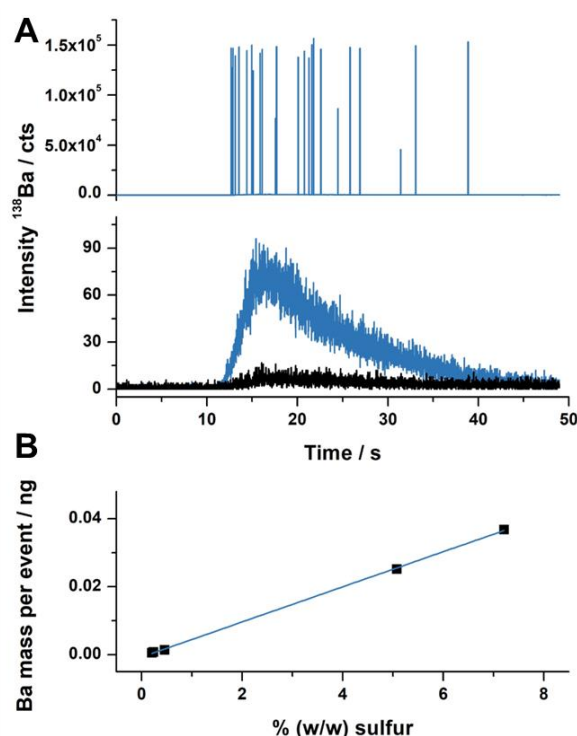
The direct detection of the particles by their sulfur heteroatom using the  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  polyatomic interference in no-gas mode provided a higher sensitivity in comparison to  $^{34}\text{S}^+$ . The detection by the backbone atom carbon was only possible for hydrophilic particles that did not require Triton X-100 as non-ionic detergent to stabilize the slurry.

To demonstrate the more general scope of the electrostatic labeling using small metal probes, the experiment was extended to a broader sample set (Fig. S4). Sulfonated particles with a mean diameter of 10  $\mu\text{m}$  and carboxylated silica as well as PS/DVB were successfully detected by using barium tags. As an example for positively charged particles, polymer-based anion-

exchangers were selected. Perrhenate anions were found to be a well-suited probe for the labeling of cationic particles offering both a low background and a high binding affinity.

### Monitoring of particle functionalization using electrostatic labeling

A series of self-prepared particles based on PS/DVB with varying degrees of sulfonation and otherwise constant properties were analyzed to evaluate the relationship between material properties and the metal tag in detail. A fully automated FI setup was applied to reduce sample consumption, memory effects and the carbon intake of the ICP resulting from the particles and the stabilizing agent. An average of 20 particles was detected per injection with a 20  $\mu\text{L}$  injection loop (Fig. 2A), which equals a TE below 1 %. Figure 2A also shows the transient signal of an exemplary calibration standard solution compared to a 1 mM Triton X-100 blank.



**Figure 2:** Semi-quantitative analysis of a series of sulfonated polymer microparticles using FI-sp-ICP-MS: **A** 10 ppm  $\text{Ba}^{2+}$ -tagged slurry, 1 ppb dissolved  $\text{Ba}^{2+}$  standard (*blue*) and 1 mM Triton X-100 (*black*), **B** correlation of bulk functionalization with average single-particle event mass of  $\text{Ba}^{2+}$  tags.

Using the proposed FI-sp-ICP-MS method, the mean Ba mass per event was determined for a broad set of structurally similar materials. Ba labeling enabled the detection of a critical heteroatom mass-fraction of 0.21 % (w/w) sulfur. The determined Ba masses correlated well with offline Combustion Ion Chromatography experiments (Fig. 2B), allowing for a semi-quantitative analysis of the tested material set. Table 2 shows figures of merit for the proposed FI-sp-ICP-MS method. Compared to  $\text{Ba}^{2+}$  tagged samples,  $\text{Rb}^+$  tagged particles as well as the direct detection of S were less favorable in terms of sensitivity, background, and precision of signal (Fig. S5).



**Table 2:** Figures of merit of the FI-sp-ICP-MS method for the analysis of functionalized microparticles.

Parameter	$^{138}\text{Ba}^+$
Solution sensitivity (cts $\text{ng}^{-1}$ )	46900, $R^2 = 0.99977$
Slurry sensitivity (cts $\text{event}^{-1}$ per % (w/w) S)	27200, $R^2 = 0.99957$
Critical sulfur bulk concentration (% (w/w))	0.21
% RSD (signal)	< 7 % (n = 10)
Transport efficiency (n = 12)	$0.22 \pm 0.06$ %
Number of events (20 $\mu\text{L}$ injection)	$20 \pm 5$

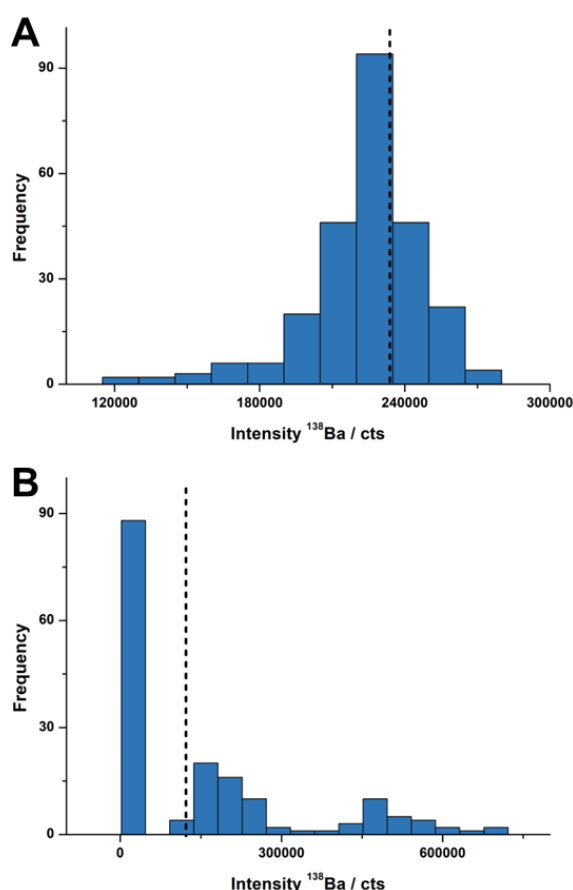
A background correction was used for resins containing carboxylic acids for which barium tags were in equilibrium with dissolved barium cations due to the weakly acidic character of the functional group. The data processing procedure that utilizes the peak shape of the background signal is displayed in Fig. S6 for an exemplary data set. Procedure precision (% RSD) was determined as 7 % (n = 10) for carboxylated particles with  $0.146 \pm 0.004$  % (w/w) S as a worst-case assumption. For the series of only sulfonated particles % RSD was between 0.6 and 7 % (n = 3) depending on the degree of sulfonation.

Therefore,  $\text{Ba}^{2+}$ -tag labeling combined with FI-sp-ICP-MS enables rapid screenings of charged particles on a single-particle level to determine the absolute number of charged functional groups for monitoring particle functionalization or preparation processes. Besides advantages in terms of robustness and instrument maintenance, error-prone measurements of sample uptake rate and transport efficiencies are not needed for data processing.<sup>21</sup> However, the straightforward correlation between the bulk parameters and single-particle results depends on the use of a constant particle substrate with fixed properties (e.g. size and porosity). Additionally, multiple injections or larger injection volumes with increased acquisition times are required to generate event intensity distributions. To further improve sensitivity, an increased band pass could be applied to account for all Ba isotopes.<sup>33</sup>

### Evaluation of sample homogeneity

Samples produced following different protocols were analyzed to demonstrate the method's ability to provide information about particle homogeneity for this class of microscale particles. Particle batches from the series of laboratory-synthesized materials analyzed in the previous section showed a high level of homogeneity in sp-ICP-MS (Fig. 3A). The sample homogeneity was confirmed with scanning electron microscopy (SEM), which indicated a homogeneous size distribution of  $4.45 \pm 0.20$   $\mu\text{m}$ . The even distribution of sulfonic acid functional groups

within the material was demonstrated using confocal laser scanning microscopy (CLSM) after labeling with Rhodamine 123 cationic fluorescent dye (Fig. S7A).<sup>31</sup> All data sets independent of the level of functionalization showed an event intensity distribution that can be described by a single peak for which peak center and mean intensity were in good agreement (Fig. S8A). Additionally, relative heterogeneity was compared using the reduced peak width obtained from a log-normal fit. Relative peak width inversely correlated with the degree of sulfonation due to the short reaction times used for weakly functionalized particles resulting in extra heterogeneity.



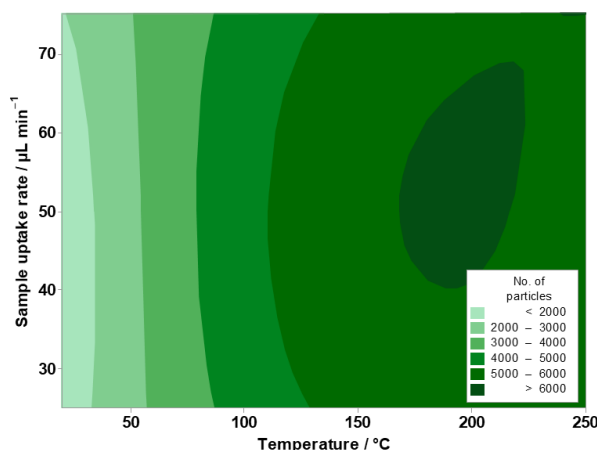
**Figure 3:** Histograms of different batches of sulfonated PS/DVB particles: **A** laboratory-made particles with 7.21% (w/w) S, **B** heterogeneous particle batch comprising three different types of particles; dashed line: mean signal intensity.

In contrast, a commercially available sulfonated cation-exchange material (SCX) with a nominal particle size of 10  $\mu\text{m}$  showed a heterogeneous intensity distribution of the barium tag (Fig. 3B). Particle imaging by SEM confirmed the heterogeneity of particle diameter ( $10.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ ) measured by sp-ICP-MS. Additionally, CLSM showed that functionalization only takes place at the outer sphere of the particle, further confirming the heterogeneity (Fig. S7B). For further analysis of this heterogeneous sample, three distinct populations were identified and further evaluated using a log-normal fit (Fig. S8B). The uneven intensity ratios of those different distributions showed that the observed effect was not due to multi-particle

events within one dwell time. Moreover, the strong impact of the particle diameter on the number of tagged functional groups reflected by the particle volume could be analyzed independently of the functionalization heterogeneity.

#### IR-heating of the sample introduction system

A setup optimized for efficient particle introduction into the plasma was used to study the effect of IR-heating towards the transport of microparticles. A two-parameter optimization of sample uptake rate and temperature was conducted to maximize TE for 4.5  $\mu\text{m}$  sulfonated PS/DVB particles. The resulting contour plot demonstrates the influence of the parameters under investigation (Fig. 4). A 5-fold increase in TE resulted upon heating the baffled cyclonic spray chamber to 135  $^{\circ}\text{C}$  compared to 20  $^{\circ}\text{C}$ , but more elevated temperatures (250  $^{\circ}\text{C}$ ) did not result in a significantly higher number of detected particles (Fig. S9). In contrast, the sample uptake rate had a limited effect between 25 and 75  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Compared to 510  $\pm$  60 particles detected using a Scott double-pass spray chamber operated at 20  $^{\circ}\text{C}$  and 0.333  $\text{mL min}^{-1}$ , the number of detected particles increased 10-fold with the IR-heated system for the same suspension. Based on the calculated PNC, this corresponds to a TE of 60  $\pm$  7%, which is an improvement compared to previous reports on polymer particles or cells of a similar size.<sup>10,34,35</sup> However, further improvements are needed for total consumption, as was achieved for nanoparticles with the same system.<sup>24</sup>



**Figure 4:** Contour plot of normalized particle number for  $\text{Ba}^{2+}$ -labelled resin (1 ppm) versus sample uptake rate and IR-heating temperature.

As a proof of concept, a suspension containing 10  $\mu\text{m}$  sulfonated particles was analyzed using the standard setup and the proposed system. With the cooled Scott double-pass spray chamber (2  $^{\circ}\text{C}$ ), TE decreased 5-fold compared to that measured with 4.5  $\mu\text{m}$  particles (Table S3). However, using the IR-heated system at 100  $^{\circ}\text{C}$  and 50  $\mu\text{L min}^{-1}$  sample uptake rate, a significantly smaller decrease to 40 % TE resulted. This experiment shows the potential of the methodology for the analysis of larger microparticles. However, a broader set of larger microparticles should be studied to understand their effect on fundamental plasma processes.

Another potential strategy would be to operate a linear pass spray chamber at elevated temperatures and apply it to single-cell ICP-MS, which faces similar challenges in introducing intact cells into the plasma.<sup>36,37</sup>

## Conclusions

In this study, methodology for the characterization of functionalized polymer particles using sp-ICP-MS was developed based on the stoichiometric labeling of charged functional groups with barium cations. Sensitivity and matrix compatibility were found to be optimal for barium tags compared to the mono-cationic rubidium or the direct detection of sulfur heteroatoms. The robustness, the degree of automation and the ease of measurement were improved by employing FI for the analysis of polymer microparticles. Using this FI-sp-ICP-MS method, a linear correlation of barium mass and the mass-fraction of bulk sulfur between 0.21 and 7.21% (w/w) resulted. This demonstrated that stoichiometric labeling and FI-sp-ICP-MS can be used to determine the absolute number of charged functional groups within a single microparticle. Furthermore, particle-to-particle heterogeneity in the intensity distributions could be related to differences in particle diameter and functionalization. IR-heating of the sample introduction system proved to be an effective tool for the analysis of microparticles as TE of  $60 \pm 7$  % for 4.5  $\mu\text{m}$  diameter particles was 10 times that measured with a standard unheated Scott double-pass spray chamber. The proposed methodology should be applicable to the characterization of other charged particles or to single-cell analysis.

## Author Contributions

Matthias Schmitt: conceptualization, investigation, data curation, formal analysis, methodology, supervision, writing – original draft, Zichao Zhou: investigation, formal analysis, methodology, writing – review & editing, Emelie Meiers: investigation, methodology, validation, Luca Schipplack: investigation, validation, Diane Beauchemin: funding acquisition, supervision, writing – original draft, Andreas Seubert: conceptualization, methodology, resources, project administration, supervision, writing – original draft.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

The authors thank F. Fillsack and F. Noll for performing SEM analysis as well as S. Fiedler and P. L. Graumann for performing CLSM imaging. The service facility for Elemental Analysis of Philipps-University Marburg is acknowledged for performing Schoeniger combustions. ZZ and DB acknowledge funding from Mitacs (grant IT33380 supported by Burgener Research Inc.)

and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant ALLRP 578516-22).

## References

- 1 M. D. Montaña, J. W. Olesik, A. G. Barber, K. Challis and J. F. Ranville, Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5053–5074.
- 2 M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, A. Bazo, E. Bolea-Fernandez and F. Vanhaecke, Living in a transient world: ICP-MS reinvented via time-resolved analysis for monitoring single events, *Chem. Sci.*, 2022, **13**, 4436.
- 3 M. Velimirovic, K. Tirez, S. Verstraelen, E. Frijns, S. Remy, G. Koppen, A. Rotander, E. Bolea-Fernandez and F. Vanhaecke, Mass spectrometry as a powerful analytical tool for the characterization of indoor airborne microplastics and nanoplastics, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, **36**, 695–705.
- 4 Q. Li, Y. Lai, P. Li, X. Liu, Z. Yao, J. Liu and S. Yu, Evaluating the Occurrence of Polystyrene Nanoparticles in Environmental Waters by Agglomeration with Alkylated Ferroferric Oxide Followed by Micropore Membrane Filtration Collection and Py-GC/MS Analysis, *Environ. Sci. Technol.*, 2022, **56**, 8255–8265.
- 5 X. Liu, Y. Wang, H. Cong, Y. Shen and B. Yu, A review of the design of packing materials for ion chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2021, **1653**, 462313.
- 6 E. Tsarenko, U. S. Schubert and I. Nischang, Nanoparticle Formulation Composition Analysis by Liquid Chromatography on Reversed-Phase Monolithic Silica, *Anal. Chem.*, 2023, **95**, 565–569.
- 7 E. Bolea-Fernandez, A. Rua-Ibarz, M. Velimirovic, K. Tirez and F. Vanhaecke, Detection of microplastics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) operated in single-event mode, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 455–460.
- 8 C. Trujillo, J. Pérez-Arantegui, R. Lobinski and F. Laborda, Improving the Detectability of Microplastics in River Waters by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Nanomaterials*, 2023, **13**, 1–16.
- 9 Z. Liu, Y. Zhu, S. Lv, Y. Shi, S. Dong, D. Yan, X. Zhu, R. Peng, A. A. Keller and Y. Huang, Quantifying the Dynamics of Polystyrene Microplastics UV-Aging Process, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2022, **9**, 50–56.
- 10 F. Laborda, C. Trujillo and R. Lobinski, Analysis of microplastics in consumer products by single particle-inductively coupled plasma mass spectrometry using the carbon-13 isotope, *Talanta*, 2021, **221**, 121486.
- 11 R. Gonzalez de Vega, S. Goyen, T. E. Lockwood, P. A. Doble, E. F. Camp and D. Clases, Characterisation of microplastics and unicellular algae in seawater by targeting carbon via single particle and single cell ICP-MS, *Anal. Chim. Acta*, 2021, **1174**, 338737.
- 12 S. Harycki and A. Gundlach-Graham, Characterization of a high-sensitivity ICP-TOFMS instrument for microdroplet, nanoparticle, and microplastic analyses, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2023, **38**, 111–120.

- 13 F. Gelman, M. Muszyńska, J. Karasiński, O. Lev and L. Halicz, Detection of PTFE microparticles by ICP-qMS operated in single-particle mode, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2022, **37**, 2282–2285.
- 14 L. Marigliano, B. Grassl, J. Szpunar, S. Reynaud and J. Jiménez-Lamana, Nanoplastic labelling with metal probes: Analytical strategies for their sensitive detection and quantification by icp mass spectrometry, *Molecules*, 2021, **26**, 7093.
- 15 J. Jiménez-Lamana, L. Marigliano, J. Allouche, B. Grassl, J. Szpunar and S. Reynaud, A Novel Strategy for the Detection and Quantification of Nanoplastics by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 11664–11672.
- 16 Y. Lai, L. Dong, Q. Li, P. Li, Z. Hao, S. Yu and J. Liu, Counting Nanoplastics in Environmental Waters by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy after Cloud-Point Extraction and in Situ Labeling of Gold Nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.*, 2021, **55**, 4783–4791.
- 17 R. C. Merrifield, C. Stephan and J. R. Lead, Quantification of Au Nanoparticle Biouptake and Distribution to Freshwater Algae Using Single Cell - ICP-MS, *Environ. Sci. Technol.*, 2018, **52**, 2271–2277.
- 18 T. Nomizu, S. Kaneco, T. Tanaka, D. Ito, H. Kawaguchi and B. T. Vallee, Determination of Calcium Content in Individual Biological Cells by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 3000–3004.
- 19 S. I. Miyashita, A. S. Groombridge, S. I. Fujii, A. Minoda, A. Takatsu, A. Hioki, K. Chiba and K. Inagaki, Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1598–1606.
- 20 D. Ojeda, E. Bolea, J. Perez-Arategui and F. Laborda, Exploring the boundaries in the analysis of large particles by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry : application to, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2022, **37**, 1501–1511.
- 21 R. P. Lamsal, G. Jerkiewicz and D. Beauchemin, Flow Injection Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: An Original Simple Approach for the Characterization of Metal-Based Nanoparticles, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 10552–10558.
- 22 A. Williams and D. Beauchemin, Comparison of monosegmented flow analysis to flow injection for single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2022, **37**, 727–732.
- 23 A. Williams and D. Beauchemin, Integrating Instead of Averaging Signal Intensity to Simplify Nanoparticle Mass Measurement by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 12778–12782.
- 24 Z. Zhou, A. Al Hejami, M. J. Burgener, J. Burgener and D. Beauchemin, A total consumption infrared heated sample introduction system for nanoparticle measurement using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2022, **37**, 1450–1454.
- 25 J. W. Olesik and J. C. Fister III, Incompletely desolvated droplets in argon inductively coupled plasmas: their number, original size and effect on emission intensities, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, 1991, **46**, 851–868.

- 
- 26 A. Al Hejami, J. Burgener, M. J. Burgener and D. Beauchemin, How much aqueous sample can an inductively coupled plasma withstand?, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1300–1305.
- 27 A. Bianco, F. Sordello, M. Ehn, D. Vione and M. Passananti, Degradation of nanoplastics in the environment: Reactivity and impact on atmospheric and surface waters, *Sci. Total Environ.*, 2020, **742**, 140413.
- 28 M. Schmitt, M. Egorycheva and A. Seubert, Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids, *J. Chromatogr. A*, 2022, **1664**, 462790.
- 29 R. P. Lamsal, G. Jerkiewicz and D. Beauchemin, Improving accuracy in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry based on conventional standard solution calibration, *Microchem. J.*, 2018, **137**, 485–489.
- 30 H. E. Pace, N. J. Rogers, C. Jarolimek, V. A. Coleman, C. P. Higgins and J. F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 9361–9369.
- 31 M. Schmitt, M. Egorycheva, D. Frerichs, S. Fiedler, P. L. Graumann and A. Seubert, Factors affecting mixed-mode retention properties of cation-exchange stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 2023, **1695**, 463934.
- 32 D. R. Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, 2016, vol. 96.
- 33 S. Meyer, R. G. De Vega, X. Xu, Z. Du, P. A. Doble and D. Clases, Characterization of Upconversion Nanoparticles by Single-Particle ICP-MS Employing a Quadrupole Mass Filter with Increased Bandpass, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 15007–15016.
- 34 Y. Tanaka, R. Iida, S. Takada, T. Kubota, M. Yamanaka, N. Sugiyama, Y. Abdelnour and Y. Ogra, Quantitative Elemental Analysis of a Single Cell by Using Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry in Fast Time-Resolved Analysis Mode, *ChemBioChem*, 2020, **21**, 3266–3272.
- 35 O. Ornatsky, D. Bandura, V. Baranov, M. Nitz, M. A. Winnik and S. Tanner, Highly multiparametric analysis by mass cytometry, *J. Immunol. Methods*, 2010, **361**, 1–20.
- 36 J. S. F. Pereira, R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, A. Manteca, J. Bettmer, K. L. LeBlanc, Z. Mester and M. Montes-Bayón, Towards single cell ICP-MS normalized quantitative experiments using certified selenized yeast, *Talanta*, 2022, **252**, 123786.
- 37 M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2020, **132**, 116042.

## Supplementary Information

### Characterization of metal-labeled ion-exchange microparticles using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry

Matthias Schmitt<sup>a</sup>, Zichao Zhou<sup>b</sup>, Emelie Meiers<sup>a</sup>, Luca Schipplick<sup>a</sup>, Diane Beauchemin<sup>b</sup>,  
Andreas Seubert<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Marburg, Faculty of Chemistry, Hans-Meerwein-Str. 4, 35043 Marburg,  
Germany

<sup>b</sup>Queen's University, Department of Chemistry, 90 Bader Lane, Kingston, ON K7L 3N6,  
Canada

**Table S1:** Series of self-prepared carboxylated and/or sulfonated PS/DVB resins: particle diameter 4.45  $\mu\text{m}$ , fully porous PS/DVB, 0.3 mmol/g  $\text{COO}^-$  for carboxylated resins.

Name	Substrate	Charged functional group	% (w/w) sulfur
PS/DVB	PS/DVB	-	-
S1	PS/DVB	$\text{SO}_3^-$	$0.205 \pm 0.009$
S2	PS/DVB	$\text{SO}_3^-$	$0.237 \pm 0.003$
S3	PS/DVB	$\text{SO}_3^-$	$0.461 \pm 0.004$
S4	PS/DVB	$\text{SO}_3^-$	$5.077 \pm 0.003$
S5	PS/DVB	$\text{SO}_3^-$	$7.2 \pm 0.3$
O1	PS/DVB	$\text{COO}^-$	-
M1	O1	$\text{COO}^-/\text{SO}_3^-$	$0.146 \pm 0.004$



**Table S2:** Sample introduction parameters used for flow injection analysis.

Step	Speed / rps	Time / s
Carrier Speed	0.1	-
Sample Load	0.5	30
Probe Rinse	0.5	10
Rinse	0.5	60
Loop Wash	-	10
Acquisition	-	50

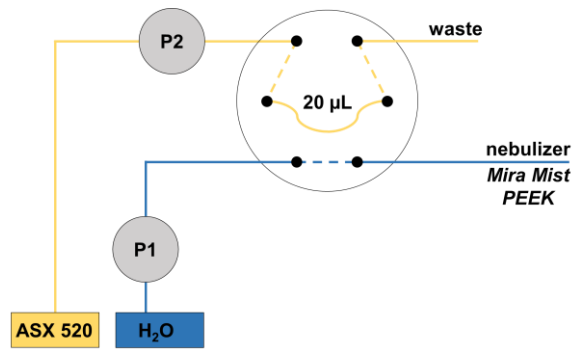
**Table S3:** Exemplary transport efficiency data using a standard sample introduction system (Scott double-pass spray chamber, 2 °C, sample uptake rate: 0.382 mL/min).

Material	size / $\mu\text{m}$	Functional groups	PNC (N/L)	TE (PNC) / %	TE (extract) / %
S5 (20 ppm)	4.5	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	7.7 * 10 <sup>8</sup>	0.33	0.27
SCX resin (100 ppm)	10	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2.9 * 10 <sup>8</sup>	0.059	-
M1 (10 ppm)	4.5	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /COO <sup>-</sup> /OH	4.0 * 10 <sup>8</sup>	0.24	-
M1 (5-30 ppm)	4.5	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /COO <sup>-</sup> /OH	Fig. S2	0.22	-
PS/DVB (10 ppm)	4.5	-	2.9 * 10 <sup>8</sup>	-	-

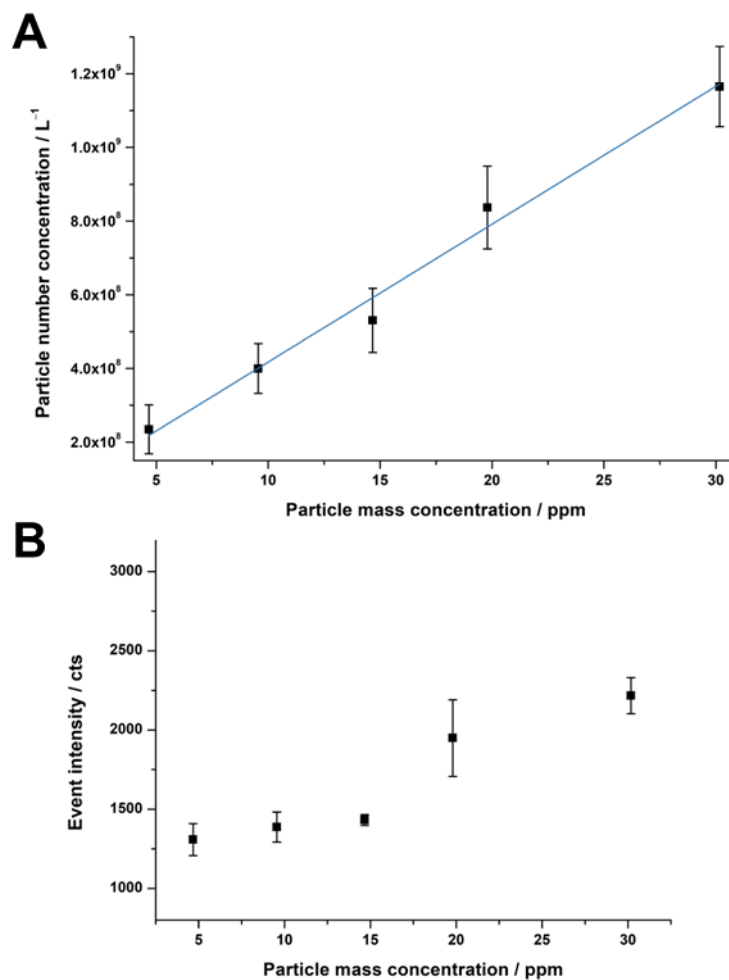
**Equation S1:** Log-normal function applied for peak fitting of particle intensity distributions.

$$y = y_0 + \left( \frac{A}{\sqrt{2\pi} \cdot w \cdot x} \right) \cdot e^{-\frac{\left(\ln\left(\frac{x}{x_c}\right)\right)^2}{2w^2}} \quad (\text{Eq. S1})$$

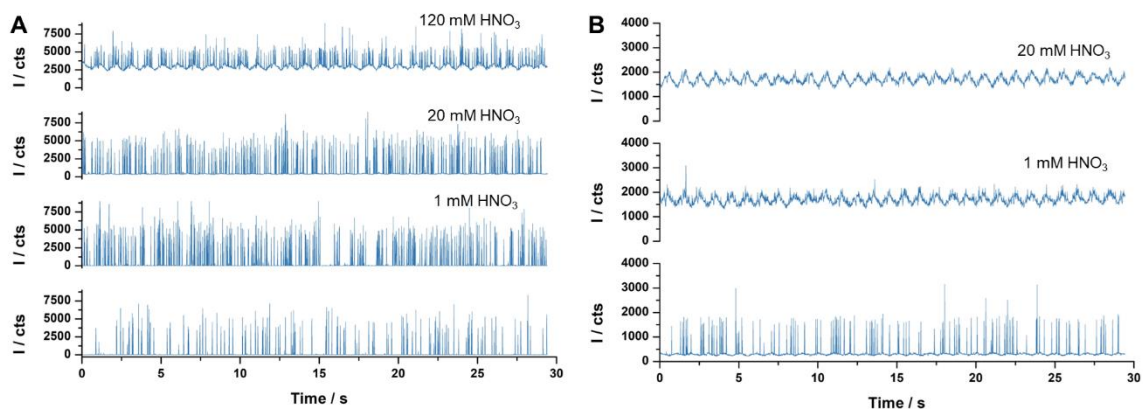
$y_0$ : baseline,  $A$ : Amplitude,  $w$ : peak width,  $x_c$ : peak center



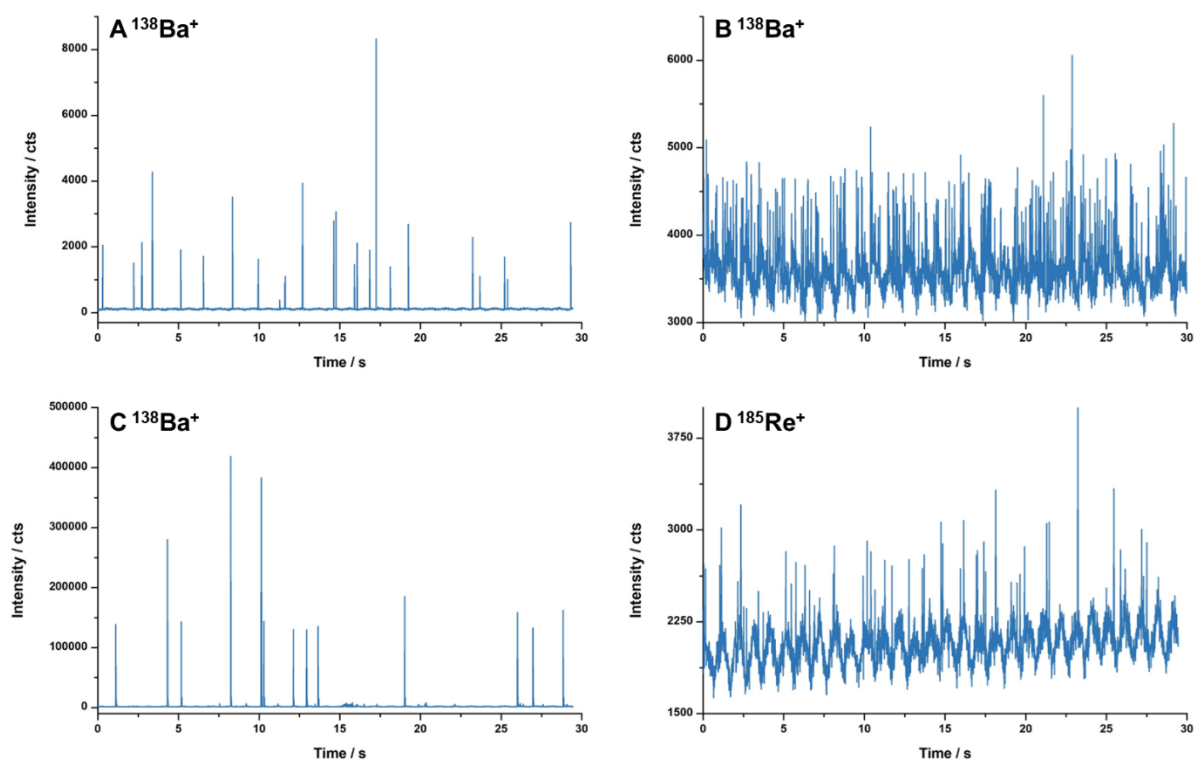
**Figure S1:** Flow injection analysis setup for the analysis of polymer slurries using sp-ICP-MS.



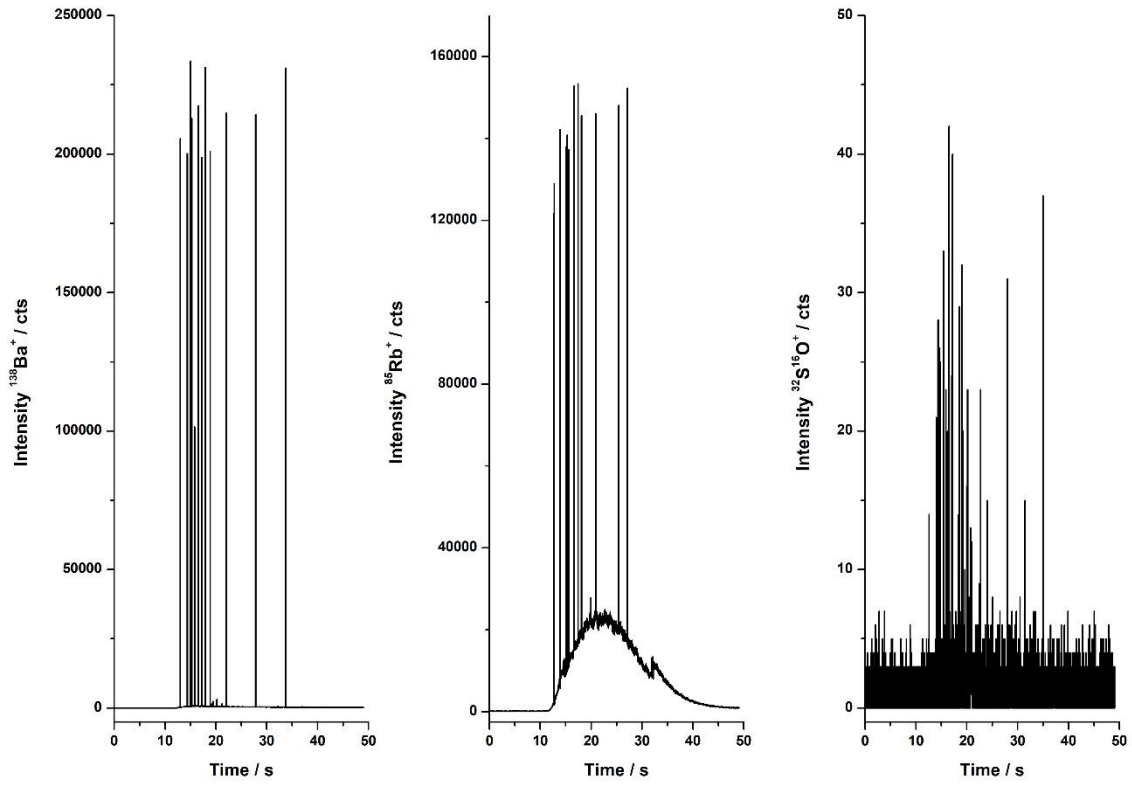
**Figure S2:** Selection of slurry concentration: **A** validation of particle counting method using a correlation of particle mass and number concentration ( $R^2 = 0.98$ ) at a constant transport efficiency of  $0.62 \pm 0.14\%$  (number of images:  $n = 20$ ), **B** effect of slurry concentration on event intensity (injections:  $n = 3$ ).



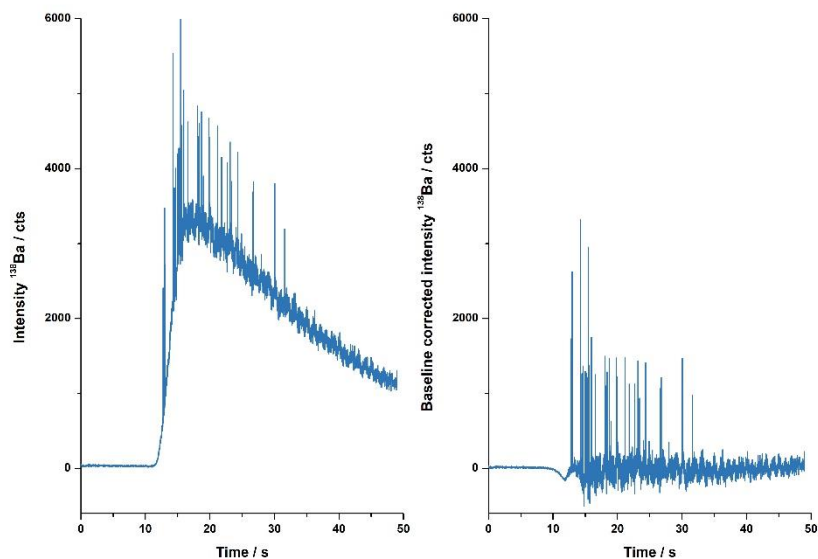
**Figure S3:** Detection of labeled sulfonated PS/DVB (**A** Ba<sup>2+</sup> tagged, **B** Rb<sup>+</sup> tagged) under acidic conditions: 10 ppm polymer slurry in 1 mM Triton X-100 with different concentrations of nitric acid.



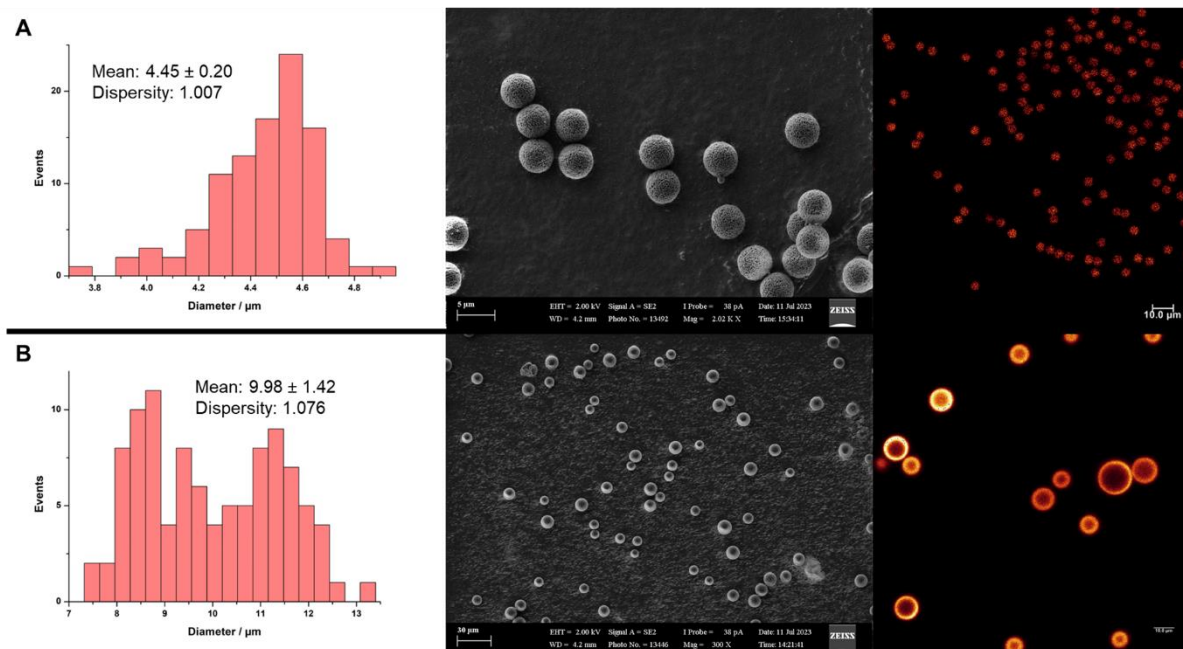
**Figure S4:** Detection of further polymer microparticles by heteroatoms: Ba<sup>2+</sup> labeled **A** 5 μm Metrosep C6 resin (carboxylated silica), **B** 4.5 μm carboxylated PS/DVB, **C** 10 μm SCX resin (sulfonated PS/DVB), **D** ReO<sub>4</sub><sup>-</sup> labeled anion-exchanger (4 μm PS/DVB + quaternary ammonium groups).



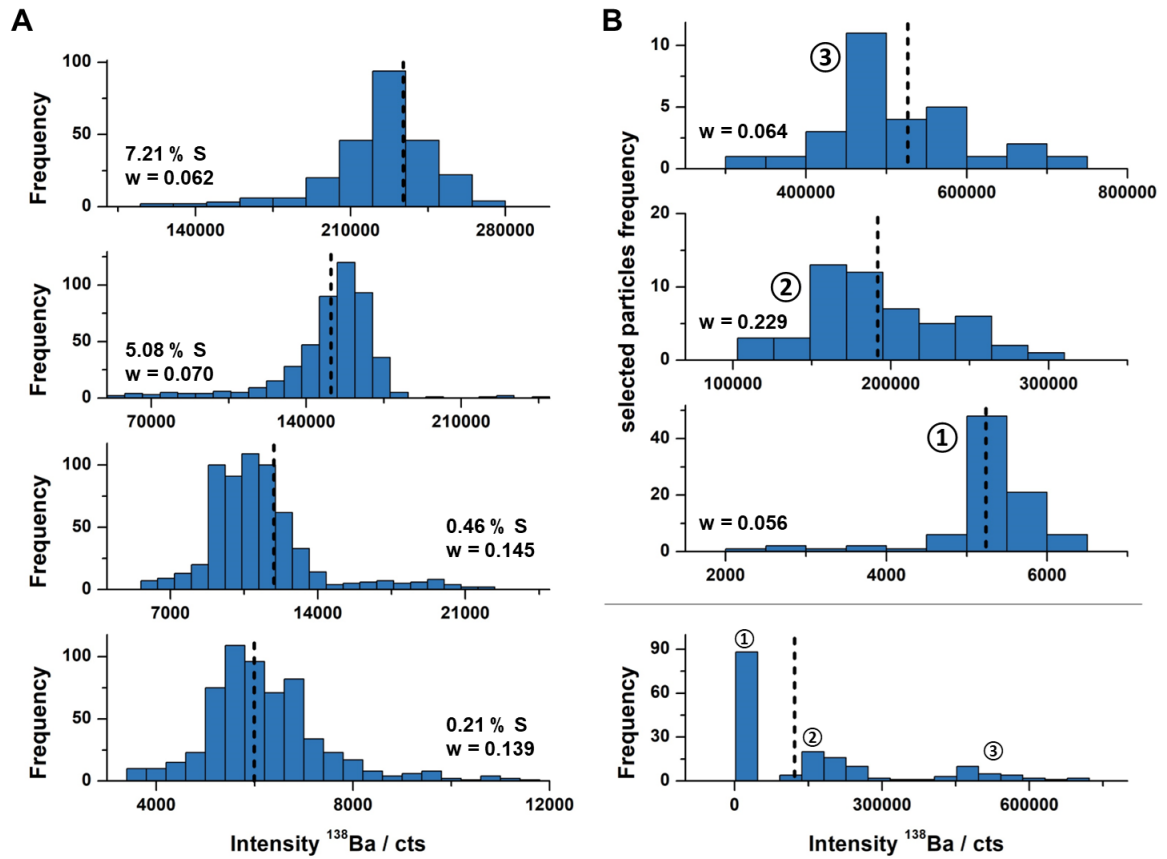
**Figure S5:** Transient signal of polymer suspension in flow injection mode using  $\text{Ba}^{2+}$  and  $\text{Rb}^+$  as metal tags and a direct detection of sulfur (10 ppm slurry in 1 mM Triton X-100, 7.21 % (w/w) S, 20  $\mu\text{L}$  sample loop).



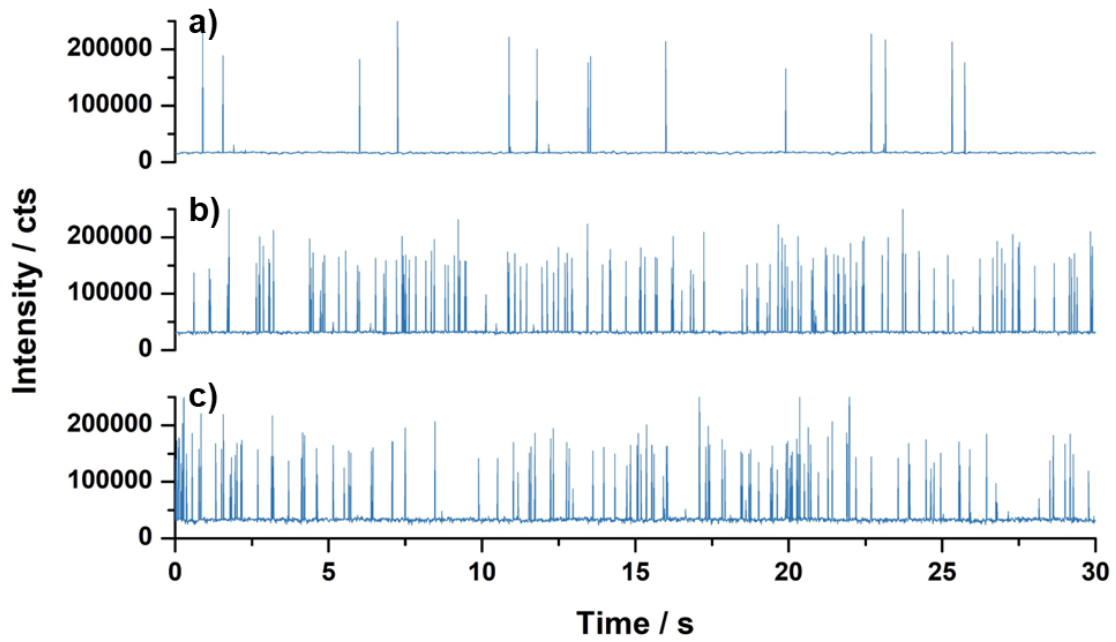
**Figure S6:** Exemplary background correction for a sample containing weakly acidic functional groups: **A** original data set, **B** background subtracted data after applying an asymmetric double sigmoidal fit ( $R^2 = 0.98$ ).



**Figure S7:** Imaging of polymer samples: size distribution histograms (*left*), scanning electron microscopy (SEM) - *center*, confocal laser scanning microscopy (CLSM) of Rhodamine 123 labeled samples (*right*). **A** polymer substrate for self-prepared particles, **B** test sample of sulfonated PS/DVB with a nominal diameter of 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure S8:** Histograms obtained from sp-ICP-MS: **A** PS/DVB particles (4.5  $\mu\text{m}$ ) with different levels of sulfonation, **B** heterogeneous particle batch (10  $\mu\text{m}$ ) comprising three distinct populations (1-3); dashed line: mean signal intensity;  $w$ : normalized width of the log-normal fit.



**Figure S9:** Exemplary datasets at  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  sample uptake rate using the IR-heating setup: **a)**  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1210 \pm 110$  particles, **b)**  $135 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5550 \pm 260$  particles, **c)**  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5490 \pm 220$  particles.

modes. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-MS using amide functionalized columns is the current benchmark in the analysis of underivatized AAs as it provides sufficient retention, good peak shape, and MS compatibility for all AAs [13–15]. Recent improvements in AA analysis led to applications in the field of metabolomics [16–18] and clinical analysis [19]. However, complex sample matrices can require another separation mode or a more stable column chemistry for robust quantification or method validation. Additionally, typical issues of reproducibility, ruggedness, and limited understanding of the retention mechanism in HILIC mode were still not fully overcome [12, 20, 21] and most studies used elaborated tandem-MS instruments [20, 22, 23]. Beer samples were selected as an exemplary matrix due to their complexity consisting of organic solvent and water, various fermentation products, polymeric as well as small molecules, and the availability of extensive comparison studies in the context of metabolomics and AA analysis [24–30]. Significant matrix effects in beer samples and differences between RPLC and HILIC mode were found for the analysis of biogenic amines which are structurally similar in comparison to AAs [31]. Therefore, complementary methods with the ability to deal with this complex matrix are of interest. Schad et al. showed a fully automated method for AA analysis in beer using a pre-column derivatization approach combined with RPLC, MS detection, and internal standardization. While highly specialized equipment was needed, the proposed procedure allowed for the quantitation of 38 AAs in different beer samples within a total runtime of 12 min [27]. Flores et al. used diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatization reagent for the analysis of free AAs in beer. The RPLC tandem-MS method was evaluated for ion suppression and enhancement. The alternate use of either positive or negative ionization mode enabled optimization of LODs for certain AAs and a reduction of matrix effects without internal standardization [32]. Shelor et al. described an alternative MS-compatible eluent system operated with cation-exchangers for the separation of AAs by the in-situ preparation of ammonium-carbonate from gaseous precursors. While quite elaborate and not yet commercially available, the proposed strategy to vary eluent pH and ionic strength over a broad range allowed for easy-to-adjust gradient programs on different cation-exchange column chemistries [33].

Recently, our group introduced mixed-acidic cation-exchange column chemistry and successfully applied it to the analysis of AAs with MS detection [34]. The combination of strongly and weakly acidic exchange sites allowed for tailored selectivity using both eluent and column composition. Carboxylic acid functional groups determined the selectivity for neutral-polar and acidic AAs

and reduced the hydrophobicity of the stationary phase. However, overall retention and selectivity between basic and neutral acids were optimized by sulfonic acid functional groups. The method demonstrated the potential to overcome the most common issues in the LC-MS analysis of AAs. Contrary to RPLC [17] or ion-pair chromatography (IPC) [35], neither pre- nor post-column derivatization of the analytes was required. The stationary phase chemistry based on a polymer substrate proved to be robust in terms of retention time and stable under a broad range of eluent compositions, which was a major advantage in comparison to typical HILIC and mixed-mode columns [12, 21, 36–38]. Additionally, the given phase can be easily reproduced or modified by any researcher due to the facile synthesis which is compatible with different types of (commercially available) polystyrene/divinylbenzene copolymer (PS/DVB) particles.

In contrast to most of the existing IC-MS methods, the eluent using formic acid as the source of hydronium ions is fully compatible with ESI-MS detection [39–41]. The analysis can thus be carried out on standard single quadrupole LC-MS instruments without the need for specific ion chromatography equipment. Additionally, the applicability of pre-detection devices such as an electrolytic suppressor is limited for ampholytic analytes as AAs because they can be significantly removed together with the eluent cations [42–45]. Pulsed amperometric detection is another commonly used detection technique for AA analysis with IC due to its ease of operation, robustness, and relatively high sensitivity. However, highly alkaline, corrosive eluents were needed making pulsed amperometric detection incompatible with cation-exchange separation mode [46, 47]. The hyphenation of LC and MS provides a unique combination of sensitivity, specificity, and flexibility and allows for the application in screening studies of biological samples for non-standard AAs [48–51].

A critical evaluation of the proposed column chemistry and the method's performance, when used in a common application, was still pending. Therefore, we investigated the ability of the method to operate in complex sample matrices as well as the influence of ion suppression in the ESI source for (partially) co-eluting compounds with low retention factors and provided strategies for the evaluation of the constitutional isomers isoleucine/leucine.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Chemicals

Ultrapure water from a MilliQ-system (Merck-Millipore Billerica, MA, USA) was used for all experiments. Formic acid (VWR Chemicals, Leuven, Belgium), hydrochloric





Received: 14 February 2023 | Revised: 2 May 2023 | Accepted: 3 May 2023

DOI: 10.1002/jssc.202300106

## RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF  
SEPARATION SCIENCE

# A simple ion chromatography-mass spectrometry method for amino acid analysis in beer

Matthias Schmitt | Florian Fillsack | Andreas Seubert

Faculty of Chemistry, Analytical  
Chemistry, University of Marburg,  
Marburg, Germany**Correspondence**Andreas Seubert, Hans-Meerwein-Str. 4,  
35043 Marburg, Germany.  
Email: seubert@staff.uni-marburg.de

The amino acid footprint of different beer samples was analyzed using ion chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. A tailor-made polymer-based cation-exchange resin was operated with a mass spectrometry-compatible eluent under isocratic conditions on a standard high-performance liquid chromatography system coupled to a single quadrupole mass spectrometer using formic acid as a volatile eluent ion source. The partially separated peaks of the isomeric pair isoleucine/leucine were processed according to their area response ratio using vertical peak splitting or Gaussian fit. Additionally, the chromatographic resolution of the isomers was optimized with an adjusted, solely aqueous mobile phase from 0.85 to 2.92. Ion suppression in the electrospray ion source was investigated for the derivatization-free method and found to be insignificant (recovery value  $100 \pm 15\%$ ) for 15 out of the 20 analytes. Quantitative results for various beer and mixed-beer beverages were found to be in high agreement with existing methods. Simultaneous photometric detection demonstrated the method's ability to successfully remove most of the interfering matrix compounds.

**KEYWORDS**

cation exchanger, ion suppression, isomer resolution, liquid chromatography-mass spectrometry, stationary phase

## 1 | INTRODUCTION

Ion-exchange chromatography with suppressed conductivity detection is the dominating technique for the analysis of inorganic ions and is typically referred to as IC in the analytical chemistry community [1]. However, the development of IC methods for the analysis of multifunc-

tional analytes such as amino acids (AAs) [2–4], pesticides [5], or metabolites [6] is a focus of current research in the field. Specifically, IC-MS applications have become more and more important [7–9]. However, these methods were still rarely used outside the IC community and were rarely considered as an orthogonal separation mode for applications in LC [10, 11]. Thereby, most studies address anion exchangers, whilst the investigation of cation-exchange chromatography mode lags behind.

One such important application is the analysis of AAs using LC-MS for which current methods were described in detail by Ferré et al. [12] for all common LC separation

**Article Related Abbreviations:** AA, amino acid; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; IC, ion chromatography; IPC, ion-pair chromatography; PS/DVB, polystyrene/divinylbenzene copolymer; SIM, selected ion monitoring.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Journal of Separation Science* published by Wiley-VCH GmbH

*J Sep Sci* 2023;2300106.

<https://doi.org/10.1002/jssc.202300106>

[www.jssc-journal.com](http://www.jssc-journal.com)

1 of 11

acid (VWR Chemicals, Leuven Belgium), and ACN (Honeywell, Mücke, Germany) were used as received for the preparation of the ESI-MS compatible eluents. If not otherwise indicated, all chemicals were purchased in analytical quality. A set of AAs was purchased in chromatographically pure quality from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany). A certified reference material containing 17 AAs (Supelco, No. 79248; Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) was used for the determination of LODs and recovery rates.

## 2.2 | Preparation of samples and standard solutions

Amino acid standards for DL-alanine (Ala), L-arginine (Arg), L-asparagine (Asn), DL-aspartic acid (Asp), L-cystine (Cys), L-glutamine (Gln), L-glutamic acid (Glu), L-glycine (Gly), L-histidine (His), L-isoleucine (Ile), L-leucine (Leu), L-lysine (Lys), DL-methionine (Met), DL-phenylalanine (Phe), L-proline (Pro), DL-serine (Ser), DL-threonine (Thr), DL-tryptophan (Trp), L-tyrosine (Tyr), DL-valine (Val) were prepared in 2 mM HCl.

Beer samples were obtained from a local supermarket degassed by sonication and subsequently filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Nylon syringe filter tip. Beer samples (50  $\mu\text{l}$ ) were diluted in 1.6 ml 2 mM HCl. Prior to analysis, a further dilution of 1/10 with 2 mM HCl was applied.

## 2.3 | Preparation of the cation-exchanger

PS/DVB-based mixed-acidic cation-exchange material containing both sulfonic and carboxylic acid functional groups covalently attached to the polymer substrate was developed and produced in our laboratory as previously described [34]. Unfunctionalized monodisperse PS/DVB starting material (55% crosslinking, 4.1  $\mu\text{m}$  average diameter, 1100  $\text{m}^2/\text{g}$  specific surface area, 44 nm mean pore size  $\varphi_{50}$ ) was prepared according to Lungfiel et al. [52, 53]. The obtained cation-exchange resin was slurry-packed into 2 mm i.d. PEEK columns [34].

## 2.4 | Chromatographic setup and data processing

The AA separations were performed on an HPLC system coupled with an 1100 series ESI-MSD (G1946D; Agilent, Waldbronn, Germany) electrospray ionization mass spectrometer. Ionization was carried out in positive mode (ESI(+)) with the following source settings: capillary voltage 3500 V, nebulizer pressure 55 psi, source temperature

350°C, gas flow 12.5 ml/min, fragmentor voltage 70 V. The 1100 series HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany) consists of a binary gradient pump (G1312A), an autosampler (G1313A), a column oven (G1316A), and a diode array detector (G1315A). Photometric detection was performed at 195 nm. Amino Acids were detected as  $[\text{M}+\text{H}]^+$  in selected ion monitoring (SIM) mode. Separations were performed under isocratic conditions using a pre-mixed, fully volatile eluent (85/15 % v/v (water/ACN), 0.05 % formic acid).

Chromatographic data were processed using Agilent ChemStation B.04.03. If not indicated differently, 0.2 ml/min eluent flow rate and 2.5  $\mu\text{l}$  injection volume were used. Overlapping peaks of the isomeric pair isoleucine/leucine (Ile/Leu) were separated by the application of Gaussian fits (Equation S1) using Origin Pro 8 or vertical peak splitting.

## 2.5 | Method validation

LODs were determined and compared using two different methodologies. According to DIN 32645, the calibration function (10 standards,  $n = 3$ ) was used to obtain the confidence band ( $\alpha = 0.05$ ). LODs were reported as the y-intercept of the upper limit of the confidence band [54]. Spiked samples (0.15  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{l}$  injection volume) were used to obtain LODs according to EPA method 40. The student's t-value ( $\alpha = 0.02$ ,  $n = 10$ ) was multiplied by the standard deviation of the replicate spiked sample [55]. The mass spectrometer response was corrected using a drift function within a series of measurements.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 | Method description and design of study

An IC-MS method was developed and optimized to separate 20 AAs within 30 min. Screening of both column and eluent composition led to the separation properties previously described [34]. Isocratic operation mode was pre-selected due to the focus of the proposed method on robustness and simplicity in routine application. Isocratic elution mode is especially favorable in terms of method transfer between instruments, robustness, and reproducibility of quantitative results [56, 57]. Additionally, long run times were needed in gradient mode (Figure S1) to obtain a significantly improved resolution. This is due to the relatively high retention factor of the critical pair and the extensive re-equilibration typical for sulfonated cation-exchangers.

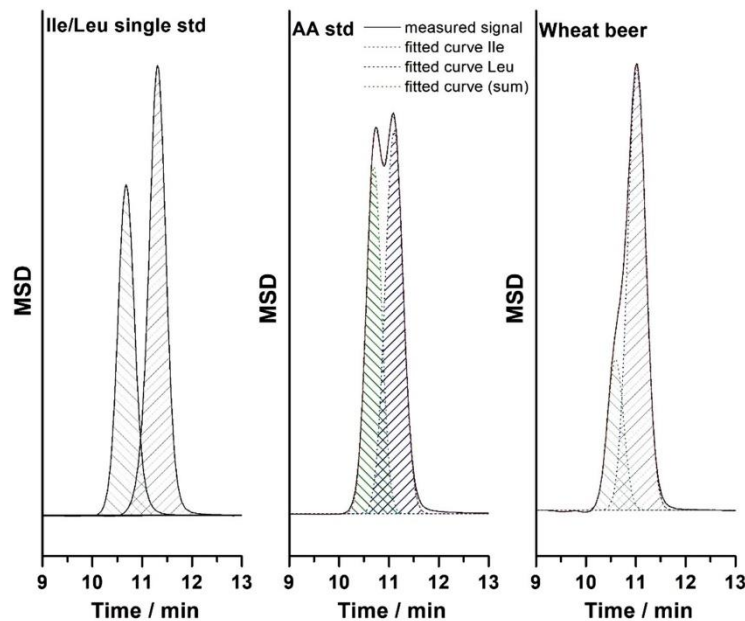


FIGURE 1 Data evaluation method to process isomers Ile/Leu: single standards; Gaussian fit for equimolar amino acid (AA) standard, correlation coefficient 0.9997; Gaussian fit for wheat beer with 1:3 Ile/Leu ratio, correlation coefficient 0.9996.

The method showed an elution order different from mixed-mode chromatography [58], HILIC [13], and RPLC [26] making IC an interesting alternative in terms of orthogonality. Compared to optimized methods using commercially available cation-exchangers, unique features were found for the proposed procedure. Contrary to strongly acidic, PS/DVB-based PRP X-200 (Hamilton, Reno, USA; Figure S2) neutral and highly charged AAs were separated in one run using a mixed-acidic cation-exchanger. On highly hydrophilic silica-based weakly acidic Metrosep C6 (Metrohm, Herisau, Switzerland) isomers were not separated at all for ACN portions being between 0% and 40% v/v (Figure S3). Qualitative figures of merit for the three IC-MS methods (Tables S1–S3) demonstrate the proposed methods' superior selectivity, whilst performance and peak shape were comparable to the commercially available columns.

The performance of the method to deal with common challenges in quantitative LC-MS analysis was investigated in this study. Namely, different beer styles and mixed-beer beverages were randomly selected as exemplary matrices due to their complex composition and the existence of quantitative reference applications using other LC separation modes. Simultaneous mass spectrometric and photometric detection were used to investigate the capa-

bilities of the method to remove interfering compounds. Additionally, procedures to evaluate partially co-eluting isomers without MS/MS were evaluated in terms of the proposed method.

### 3.2 | Peak processing of isomeric pair Ile/Leu

The isomers Ile/Leu were partially separated with a resolution of 0.86 under optimized conditions and processed using different approaches. From an applicant's perspective, vertical peak splitting seems to be the most convenient way of processing partially separated isomers in LC-MS datasets, as commercially available software easily performs such tasks. However, a critical evaluation of such a process is necessary, especially as it requires highly symmetrical peaks with a similar area response for both compounds. As an alternative approach, a Gaussian fit was applied to deconvolute the sum peak.

Figure 1 demonstrates the suitability of the different evaluation procedures to the method under investigation as highly symmetrical peaks for both isomers were obtained and the MS response in the equimolar sample is comparable. Gaussian fit functions with comparable

**TABLE 1** Evaluation of partially resolved isomers using vertical peak splitting and Gaussian fit for equimolar reference standards at different concentrations ( $n = 4$ ) and different beer samples ( $n = 2$ ). Expected area ratio (Cal) obtained from calibration function using individual standards. Data presented as %area of Ile.

Sample	Fit	%RSD	Splitting	%RSD	Cal
<i>Equimolar Ile/Leu standard (n = 4)</i>					
0.25 mM	0.405	2.115	0.463	1.245	0.429
0.17 mM	0.427	2.140	0.468	1.078	0.427
0.14 mM	0.436	1.792	0.469	0.488	0.426
<i>Beer Sample (n = 2)</i>					
Pils	0.279	8.015	0.253	31.27	
Braunbier	0.266	10.70	0.254	28.18	
Lager Hell	0.230	6.837	0.201	14.727	
Wheat Beer	0.238	4.540	0.213	20.457	

correlation coefficients were obtained for the mixed standard and an exemplary beer sample. Exemplary fit parameters were shown in Table S4.

Quantitative evaluation of the Ile/Leu peak ratio (Table 1) using Gaussian fit and vertical peak partitioning demonstrated that both approaches were applicable for equimolar AA standards with %RSD in the low percentage area. The offset between both approaches of signal processing for the AA standards can be explained by the slightly higher response for Leu leading to an elevated area percent of Ile obtained from vertical peak splitting. The method offset increased with the analyte concentration but was still acceptable at higher concentrations. The area response ratio obtained from the fitting procedure agreed well with the expected number obtained from individual standards. However, vertical peak splitting is favorable in terms of practical reasons as it is automatically performed by the chromatography software. Good recoveries for both analytes showed that the overlap did not lead to significant matrix effects compared to fully resolved AAs.

As for higher levels of one of the analytes (e.g., in beer samples), the random error for peaks processed with vertical splitting increased significantly as the determination of the splitting point becomes more and more difficult. This leads to problems in inter-operator reproducibility. Consequently, Gaussian fit was applied as an evaluation method within this study as it provides a robust way of processing the partially separated isomers Ile and Leu in a broad range of concentration ratios.

However, for samples with a concentration ratio beyond an order of magnitude, this procedure came to its limit. Furthermore, some applicants might not want to include such manual processing steps in their procedures. To address this possible limitation the presented IC-MS method offered another possibility to quantify both iso-

mers. Specifically, Ile/Leu resolution was optimized by reducing the organic modifier concentration within the aqueous eluent (Figure 2). The optimization described was possible due to the different  $\log P$  of both isomers [59] and mixed-mode retention effects between the analyte and stationary phase. In the context of IC, these effects are usually referred to as secondary interactions. The contribution of such RP-like interactions to the overall retention of mixed-acidic cation-exchanger columns and other polymer-based IC columns was demonstrated by different researchers [34, 60, 61].

The selection of the final eluent parameters depends on the analytical problem. If highly hydrophobic AAs (e.g., Trp and Phe) are not part of the set of analytes, a general readjustment of the method could be a reasonable choice. Otherwise, extra runs for the determination of the isomers could be performed. Figures of merit for different fractions of ACN regarding the resolution and performance of Ile and Leu, runtime, and the number of AAs under investigation were provided in Table S5.

### 3.3 | Method calibration and validation

Method calibration was performed at two different concentration levels ( $\mu\text{M}$  trace level analysis and mM standard operating level). Trace level calibration data (Table S6) demonstrated linearity within two orders of magnitude and detection limits were between 4 and 64 nM when calculated according to the EPA method 40 or DIN 32645 [34].

At typical working level concentrations in the mM range, the impact of ion suppression was investigated, and MS detection was compared to the UV detection data for Met, Tyr, His, Phe, and Trp, which provided sufficient absorbance at 195 nm without derivatization. Calibration curves with correlation coefficients  $\geq 0.9996$  (UV linear, MS 2nd order polynomial) were obtained for both detectors with comparable RSD < 8% for area response.

Ion suppression, which is a common drawback for quantitative LC-ESI-MS methods, was evaluated by calculating recoveries from standard solutions containing different numbers of analytes. One standard contained all the AAs that are under investigation, and the others comprised 6–7 AAs that are well separated from each other (Figure S4) under the assumption of no ion suppression due to co-elution. Both solutions were prepared from an identical AA stock solution to eliminate operational errors. Sufficient recoveries ( $100 \pm 15\%$ ) were obtained for 15 out of 20 target compounds, wherein significant ion suppression was observed for Cys, Gln, and Thr which is quite reasonable due to the co-elution of these compounds with

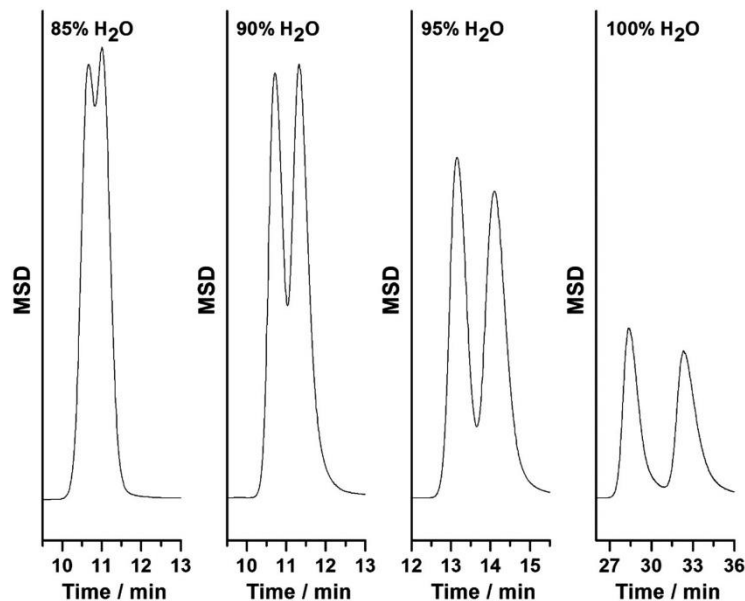


FIGURE 2 Optimization of isomeric pair Ile/Leu resolution by adjustment of organic modifier concentration in the eluent. Eluent: H<sub>2</sub>O/ACN + 0.2% formic acid; exception 0.05% formic acid in 85% H<sub>2</sub>O eluent.

each other and highly abundant Pro. However, intense signal enhancement was observed for baseline-separated Val which could be caused by ionization interferences either in the calibration standard or the sample. Orthogonal UV detection provided less valid results with a significant difference of recovery values to 100% due to a smaller S/N and lower quality of the calibration data. Additionally, the certified reference standard (17 analytes) was analyzed to demonstrate the accuracy of the method using the calibration procedure described above (Table S7) [34]. Generally, findings were comparable but recoveries were superior for the certified standard as random errors were minimized due to the use of three dilutions of the reference material within the calibration range. In contrast, the self-prepared mixed standard solution was only prepared at two different concentration levels (e.g., 0.034 and 0.34 mM for Asp), one being slightly below the lower edge of the calibration function.

The method showed stable retention times over 2 days of consecutive injections as indicated by an RSD below 0.5%. The column was used regularly for the separation of inorganic cations and AAs in both beer and cell culture matrices for about one year without observable changes, indicating good long-term stability under acidic conditions.

### 3.4 | Application to beer samples

Chromatograms of several beer samples were presented in Figure 3 to show the AA fingerprint of different types of beer. Full-scale chromatograms for all samples and extracted ion chromatograms for the mixed-beer beverage were shown in Figure S5 and Figure S6 respectively. Quantitated amounts for all analytes were presented in Table 2. For all samples Pro was found at high concentration levels (3.25 mM mean concentration for pure beer) as it can only be poorly consumed by yeast [28], followed by Ala (0.79 mM). Other major AAs were Val, Tyr, and Gly at mean concentrations of 0.2–0.5 mM. Met, Lys, and Glu were found at low concentration levels (<0.05 mM). A mixed-beer beverage (“Weissbier—alkoholfrei Zitrone”) containing 50% non-alcoholic wheat beer and 50% lemonade showed the smallest total amount of free AAs with 5.8 mM in contrast to 8.4 mM in pure beer samples. This indicated that the beer proportion is the main source of the target compounds. However, the concentration distribution was found to be narrower for the mixed-beer beverage with elevated concentration levels for minor compounds. Generally, quantitative results were comparable to existing LC-UV [24, 26, 28] and LC-MS [27, 62] applications for beer analysis in different chromatographic modes.

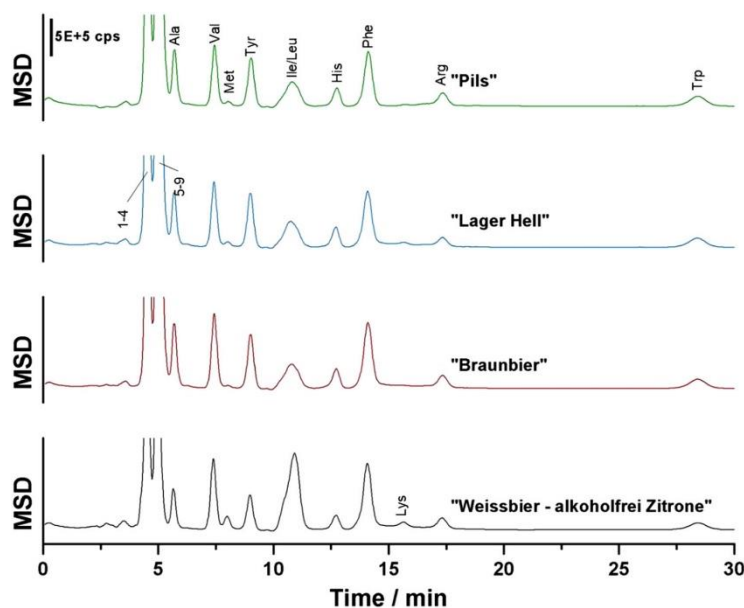


FIGURE 3 Analysis of different beer samples using IC-MS (SIM-POS ([M + H]<sup>+</sup>)). Analytes indicated with numbers: (1) Asp, (2) Asn, (3) Cys, (4) Ser, (5) Gln, (6) Thr, (7) Pro, (8) Glu, (9) Gly.

Another key feature of the IC method presented is the ability to remove matrix compounds. The beverages under investigation are challenging as they contain compounds of various chemical properties that can interfere with nearly all common LC separation modes and an aqueous/organic solvent. Typical compounds were carbohydrates, inorganic anions, inorganic cations, amines, peptides, and vitamins. In the case of the mixed-beer beverage sweeteners and flavors should be additionally considered [63]. Figure 4 shows the comparison of an AA standard in 2 mM HCl and a beer sample using photometric detection. Six AAs were identified in both the standard solution and sample. However, in the exemplary case of Pilsener Beer various matrix compounds were well-separated from the target analytes as they elute within 5 min after injection. These compounds were suspected to be neutral or anionic. Then, a stable baseline was obtained with two major interfering compounds, which likely were non-standard AAs (e.g.,  $\gamma$ -Aminobutyric acid) or amines [28]. The overlap of His with this matrix compound was determined to be the reason for the mismatch of UV and MS data for this analyte. Poor photometric quantitation results for Met were explained by the UV chromatogram due to a significant difference in response in comparison to the adjacent Tyr signal. Additionally, UV/MS-detection

mismatch was consistent with the recovery data for both types of detection.

In the extracted ion chromatogram (Figure S6) one highly abundant, interfering compound was detected at  $m/z = 118$  in all beer samples at a retention time of 4.5 min. The area response of this compound differed between the beer styles under investigation and was not found in AA standards indicating the beer matrix as the source of this signal. This observation matched the UV data indicating less validity of the quantitative results for compounds with retention times below 5.5 min due to matrix effects. No further matrix compounds were observed and only weakly abundant, early-eluting Cys showed peak distortion due to interference with co-eluting analytes and matrix compounds. This demonstrates the method's ability to be applied to the given samples.

The described IC-MS method proved to be a complementary tool in applied AA analysis as it can deal with complex sample matrices and typical analyte concentration ratios of beer samples. Robust quantitation data was obtained for 11 AAs with retention times higher than 5.5 min, making the method a promising tool for the validation of the more typical HILIC methods for which these analytes were weakly retained.

TABLE 2 Results of the determination of amino acids (nM) in beer samples using IC-MS (SIM-POS ( $[M + H]^+$ )) and IC-UV ( $n = 3$ ).

Amino acid (nM)	Pils	Lager Hell	Braunbier	Weissbier
L-Gly	0.260	0.234	0.317	0.182
DL-Ala	0.748	0.719	0.906	0.520
DL-Ser	0.032	0.044	0.021	0.198
L-Pro	3.419	3.249	3.093	1.183
DL-Val	0.401	0.434	0.512	0.483
DL-Thr	0.016	0.028	0.011	0.092
L-Ile	0.042	0.049	0.055	0.116
L-Leu	0.141	0.154	0.144	0.360
L-Asn	0.037	0.052	0.024	0.119
DL-Asp	0.101	0.086	0.095	0.255
L-Gln	0.029	0.009	0.030	0.011
L-Lys	0.023	0.047	0.008	0.096
L-Glu	0.148	0.088	0.147	0.117
DL-Met	0.019	0.022	0.013	0.059
DL-Met (UV)	0.395	0.513	0.440	0.317
L-His	0.122	0.134	0.132	0.095
L-His (UV)	0.646	0.573	0.481	0.113
DL-Phe	0.208	0.210	0.254	0.252
DL-Phe (UV)	0.242	0.231	0.272	0.257
L-Arg	0.212	0.148	0.210	0.182
L-Arg (UV)	0.191	0.261	0.226	0.164
L-Tyr	0.254	0.289	0.243	0.184
L-Tyr (UV)	0.285	0.311	0.315	0.190
DL-Trp	0.133	0.124	0.127	0.094
DL-Trp (UV)	0.123	0.098	0.111	0.077
L-Cys	0.007	0.006	0.007	0.004
$\Sigma$	8.418	8.306	8.383	5.761

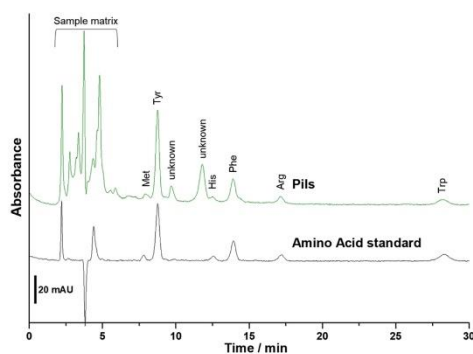


FIGURE 4 Separation of an exemplary beer matrix away from target analytes using IC-UV.

#### 4 | CONCLUDING REMARKS

A reliable, easy-to-perform, and relatively fast IC-MS method using a novel cation-exchange column chemistry for the analysis of 20 standard AAs was successfully applied to different beer samples. Typical challenges present in LC-MS analysis of AAs were critically evaluated and found to be less significant in comparison to existing methods. The cation-exchange method under investigation offered a unique selectivity for the target analytes separated from various matrix compounds leading to superior quantitation results for 11 AAs with retention times above 5.5 min. The multifold options to evaluate partially resolved isomers in different concentration ratios without MS/MS are valuable from an applicant's perspective as minimal instrumentation is required. Thus, the method was determined to be a promising tool for the routine analysis of AAs in complex matrices or the validation of existing methods.

Furthermore, the simple IC setup containing the novel cation-exchange chemistry operated with standard LC-MS instrumentation is expected to be applicable to further analytical challenges with highly polar, charged target compounds involved. Besides that, commercially available, well-established, and robust polymer-based IC columns should be considered more often as alternatives to RP, HILIC, and mixed-mode columns.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Metrohm AG (Herisau, Switzerland) for providing instruments, polymeric substrate, and column packing equipment.

Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available in the article, supporting information, or from the authors upon reasonable request.

#### ORCID

Matthias Schmitt <https://orcid.org/0000-0002-1761-5381>

Andreas Seubert <https://orcid.org/0000-0002-7398-363X>

#### REFERENCES

- Weiss J. Handbook of ion chromatography. Weinheim: Wiley-VCH; 2016.
- Hanko VP, Rohrer JS. Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange

- chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Anal Biochem.* 2004;324:29–38.
3. Yokoyama Y, Fujishima T, Kurota K. Fast and efficient separation and determination of UV-absorbing amino acids, nucleobases, and creatine using a carboxy-functionalized cation-exchange column. *Anal Sci.* 2015;31:371–6.
  4. Abaye DA, Morrison DJ, Preston T. Strong anion exchange liquid chromatographic separation of protein amino acids for natural <sup>13</sup>C-abundance determination by isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011;25:429–35.
  5. Christison T, Madden JE, Rohrer J. Determination of cationic polar pesticides in homogenized fruit and vegetable samples using IC-HRAM MS. *Dionex Appl. Note No.* 72908. 2019.
  6. Rumachik N, Tian T, Hou Y, Saini C, Cheng J, Pohl C, et al. Towards a more complete glycome: advances in ion chromatography-mass spectrometry (IC-MS) for improved separation and analysis of carbohydrates. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2021;1175:122719.
  7. Conboy JJ, Henion JD, Martin MW, Zweigenbaum JA. Ion chromatography/mass spectrometry for the determination of organic ammonium and sulfate compounds. *Anal Chem.* 1990;62:800–7.
  8. Lewis Z, Jackson BA, Crampton A, Ray AD, Holman SW. Towards a generic method for ion chromatography/mass spectrometry of low-molecular-weight amines in pharmaceutical drug discovery and development. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2020;34:1–10.
  9. Ngere JB, Ebrahimi KH, Williams R, Pires E, Walsby-Tickle J, McCullagh JSO. Ion-exchange chromatography coupled to mass spectrometry in life science, environmental, and medical research. *Anal Chem.* 2023;95:152–66.
  10. Si-Hung L, Troyer C, Causon T, Hann S. Sensitive quantitative analysis of phosphorylated primary metabolites using selective metal oxide enrichment and GC- and IC- MS/MS. *Talanta.* 2019;205:120147.
  11. Violi JP, Bishop DP, Padula MP, Steele JR, Rodgers KJ. Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2020;131:116018.
  12. Ferré S, González-Ruiz V, Guillaume D, Rudaz S. Analytical strategies for the determination of amino acids: past, present and future trends. *J Chromatogr B.* 2019;1132:121819.
  13. Pan Y, Li J, Li X, Chen J, Bai G. Determination of free amino acids in *isatis radix* by HILIC-UPLC-MS/MS. *Bull Korean Chem Soc.* 2014;35:197–203.
  14. Zhao Q, Bian X, Shan C, Cheng J, Wang C, Xu Y, et al. Quantitative analysis of nutrients for nucleosides, nucleobases, and amino acids hidden behind five distinct regions-derived *Poria cocos* using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole linear ion-trap tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2022;45:4039–51.
  15. Periat A, Krull IS, Guillaume D. Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins. *J Sep Sci.* 2015;38:357–67.
  16. Wernisch S, Pennathur S. Evaluation of coverage, retention patterns, and selectivity of seven liquid chromatographic methods for metabolomics. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408:6079–91.
  17. Jiang X, Wang Y, Liu J. Comprehensive characterization of amino acids and water-soluble vitamins in a pentylenetetrazole-induced seizures rat model. *J Sep Sci.* 2023, 1–9.
  18. Zhang J, Lu Q, Xin L, Lou Y, Xiao W, Wang Z, et al. A liquid chromatography-mass spectrometry untargeted urinary metabolomics combined with quantitative analysis of seven amino acids biomarkers on yaobitong capsule in the intervention of rheumatoid arthritis rats. *J Sep Sci.* 2022;45:4209–23.
  19. Guo N, Yang D, Yang X, Yan H, Fan B, Dai J, et al. A rapid, sensitive, and widely applicable method for quantitative analysis of underivatized amino acids in different biological matrices by UHPLC-MS/MS. *J Sep Sci.* 2019;42:3173–81.
  20. Marrubini G, Appelblad P, Maietta M, Papetti A. Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review. *Food Chem.* 2018;257:53–66.
  21. Krumpochova P, Bruyneel B, Molenaar D, Koukou A, Wuhler M, Niessen WMA, et al. Amino acid analysis using chromatography-mass spectrometry: An inter platform comparison study. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;114:398–407.
  22. Tsochatzis E, Papageorgiou M, Kalogiannis S. Validation of a HILIC UHPLC-MS/MS method for amino acid profiling in *Triticum* species wheat flours. *Foods.* 2019;8:514.
  23. Gao J, Helmus R, Cerli C, Jansen B, Wang X, Kalbitz K. Robust analysis of underivatized free amino acids in soil by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2016;1449:78–88.
  24. Kabelová I, Dvořáková M, Čížková H, Dostálek P, Melzoch K. Determination of free amino acids in beers: a comparison of Czech and foreign brands. *J Food Compos Anal.* 2008;21:736–41.
  25. Gómez-Alonso S, Hermosín-Gutiérrez I, García-Romero E. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J Agric Food Chem.* 2007;55:608–13.
  26. Benvenuti ME, Hong P. Determination of amino acids in beers using the UPLC amino acid analysis solution. *Waters Application Note.* 2007.
  27. Bollig B, Schad GJ, Ludwig R, Erxleben BT. Fast and simple determination of free amino acids in beer. *Column.* 2015;10:16–20.
  28. Redruello B, Ladero V, del Rio B, Fernández M, Martín MC, Alvarez MA. A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer. *Food Chem.* 2017;217:117–24.
  29. Bettenhausen HM, Barr L, Broeckling CD, Chaparro JM, Holbrook C, Sedin D, et al. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. *Food Res Int.* 2018;113:487–504.
  30. Anderson HE, Liden T, Berger BK, Schug KA. Target profiling of beer styles by their iso- $\alpha$ -acid and phenolic content using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2021;44:2764–72.
  31. Nalazek-Rudnicka K, Kubica P, Wasik A. Discrepancies in determination of biogenic amines in beer samples by reversed phase and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Microchem J.* 2020;159:105574.
  32. Zapata Flores EJ, Herodes K, Leito I. Comparison of the ionisation mode in the determination of free amino acids in beers by Liquid Chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2022, 1677.
  33. Shelor CP, Yoshikawa K, Dasgupta PK. Automated programmable generation of broad pH range volatile ionic eluents for liquid chromatography. *Anal Chem.* 2021;93:5442–50.



34. Schmitt M, Egorycheva M, Seubert A. Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids. *J Chromatogr A*. 2022;1664:462790.
35. Gussakovskiy D, Anderson G, Spicer V, Krokhin OV. Peptide separation selectivity in proteomics LC-MS experiments: Comparison of formic and mixed formic/heptafluorobutyric acids ion-pairing modifiers. *J Sep Sci*. 2020;43:3830–9.
36. Kazarian AA, Taylor MR, Haddad PR, Nesterenko PN, Paull B. Ion-exchange and hydrophobic interactions affecting selectivity for neutral and charged solutes on three structurally similar agglomerated ion-exchange and mixed-mode stationary phases. *Anal Chim Acta*. 2013;803:143–53.
37. McCalley DV. A study of column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2018;1554:61–70.
38. Vilches AP, Norström SH, Bylund D. Direct analysis of free amino acids by mixed-mode chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2017;40:1482–92.
39. Barron L, Gilchrist E. Ion chromatography-mass spectrometry: a review of recent technologies and applications in forensic and environmental explosives analysis. *Anal Chim Acta*. 2014;806:27–54.
40. Michalski R, Balcerzak M, Mattusch J, Fischer K, Kosaka K, Jagielski AK, et al. Applications of IC-MS and IC-ICP-MS in environmental research. Hoboken, NJ: Wiley & Sons; 2016.
41. Jansons M, Pugajeva I, Bartkevics V. Evaluation of selected buffers for simultaneous determination of ionic and acidic pesticides including glyphosate using anion exchange chromatography with mass spectrometric detection. *J Sep Sci*. 2019;42:3077–85.
42. Christison T, Madden JE, Rohrer J. Determination of cationic polar pesticides in homogenized fruit and vegetable samples using IC-HRAM MS. 2019.
43. Geerdink RB, Hassing M, Ayarza N, Bruggink C, Wielheesen M, Claassen J, et al. Analysis of glyphosate, AMPA, Glufosinate and MPPA with Ion chromatography tandem mass spectrometry using A membrane suppressor in the ammonium form application to surface water of low to moderate salinity. *Anal Chim Acta*. 2020;1133:66–76.
44. Walsby-Tickle J, Gannon J, Hvinden I, Bardella C, Abboud MI, Nazeer A, et al. Anion-exchange chromatography mass spectrometry provides extensive coverage of primary metabolic pathways revealing altered metabolism in IDH1 mutant cells. *Commun Biol*. 2020;3:1–12.
45. Zhao L, Lu Y, Zhang F, Yang B. A bipolar membrane-based cation electrolytic membrane suppressor for ion chromatography. *J Chromatogr A*. 2019;1603:422–5.
46. Islam MA, Mahub P, Nesterenko PN, Paull B, Macka M. Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems - A review. *Anal Chim Acta*. 2019;1052:10–26.
47. Alterman MA. Amino acid analysis - wheat gluten amino acid analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. New York, NY: Springer US; 2019.
48. Mais C-N, Hermann L, Altegoer F, Seubert A, Richter AA, Wernersbach I, et al. Degradation of the microbial stress protectants and chemical chaperones ectoine and hydroxyectoine by a bacterial hydrolase-deacetylase complex. *J Biol Chem*. 2020;295:9087–104.
49. Khan MR, Wabaidur SM, Alothman ZA, Busquets R, Naushad M. Method for the fast determination of bromate, nitrate and nitrite by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry and their monitoring in Saudi Arabian drinking water with chemometric data treatment. *Talanta*. 2016;152:513–20.
50. Abdullah AlFaris N, Zaidan ALTamimi J, ALOthman ZA, Wabaidur SM, Ghafar AA, Saleh Aldayel T. Development of a sensitive liquid-liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of carbaryl residues in fresh vegetables sold in Riyadh. *J King Saud Univ Sci*. 2020;32:2414–8.
51. AlFaris NA, Wabaidur SM, Alothman ZA, Altamimi JZ, Aldayel TS. Fast and efficient immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of aflatoxins in baby food and feeds. *J Sep Sci*. 2020;43:2079–87.
52. Lungfiel K, Seubert A. Applying hydrophilicity to PS/DVB-beads via introduction of protected comonomers. *Chromatographia*. 2016;79:5–17.
53. Lungfiel K, Seubert A. Varying the porous structure of polystyrene/divinylbenzene beads prepared by Ugelstads activated swelling technique and examining its reversed phase HPLC properties. *J Chromatogr A*. 2014;1358:117–27.
54. Normenausschuss Grundlagen der analytischen Atomspektroskopie im DIN-Normenausschuss Materialprüfung (NMP), DIN 32645 - Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth Verlag, Berlin. 2008. <https://dx.doi.org/10.31030/1465413>
55. United States Environmental Protection Agency. Definition and procedure for the determination of the method detection limit, revision 2. [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure\\_rev2\\_12-13-2016.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-12/documents/mdl-procedure_rev2_12-13-2016.pdf) Accessed December 16, 2021.
56. Meyer VR. Practical high-performance liquid chromatography. Chichester: John Wiley & Sons Inc; 2010.
57. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical HPLC method development. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc; 2012.
58. Choi MS, Rehman SU, Kim IS, Park HJ, Song MY, Yoo HH. Development of a mixed-mode chromatography with tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of 23 underivatized amino acids in human serum. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;145:52–8.
59. GESTIS Database. <https://gestis.dguv.de> Accessed June 8, 2022.
60. Popov AS, Spiridonov KA, Uzhel AS, Smolenkov AD, Chernobrovkina AV, Ztirakha AV. Prospects of using hyperbranched stationary phase based on poly(styrene-divinylbenzene) in mixed-mode chromatography. *J Chromatogr A*. 2021;1642:462010.
61. Li Y, Nesterenko P, Stanley R, Paull B, Macka M. Comparison of cation-exchange capillary columns used for ion chromatographic separation of biogenic amines. *J Chromatogr A*. 2018;1571:193–200.
62. Gökmen V, Serpen A, Mogol BA. Rapid determination of amino acids in foods by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403:2915–22.
63. Kahle EM, Zarnkow M, Jacob F. Substances in beer that cause fluorescence: evaluating the qualitative and quantitative

tive determination of these ingredients. *Eur Food Res Technol.* 2019;245:2727–37.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Schmitt M, Fillsack F, Seubert A. A simple ion chromatography-mass spectrometry method for amino acid analysis in beer. *J Sep Sci.* 2023;2300106.

<https://doi.org/10.1002/jssc.202300106>

## **Supporting Information**

### **A Simple Ion Chromatography Mass Spectrometry Method for Amino Acid Analysis in Beer**

Matthias Schmitt, Florian Fillsack and Andreas Seubert

University of Marburg, Faculty of Chemistry, Analytical Chemistry, Hans-Meerwein-Str. 4,  
35043 Marburg, Germany

**Table S1:** Chromatographic data for 16 standard amino acids on PRP X-200 column (2.1 x 150 mm). Retention time  $t_R$ , retention factor  $k$ , resolution  $R_s$ , efficiency  $N$  and asymmetry factors  $A_s$  obtained in isocratic elution mode. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ L; sample size: 0.3 mM per amino acid; eluent: 90/10 % v/v (water/acetonitrile), 0.2 % formic acid; flow rate: 0.25 mL/min; detection: ESI-MS (SIM-POS  $[M+H]^+$ ); column temperature: 45  $^{\circ}$ C.

$m/z$	Analyt	$t_R$ / min	$k$	$R_s$ (N+1)	$N / m^{-1}$	$A_s$
134	DL-Asp	3.26	1.43	1.4	8000	1.4
133	L-Asn	3.58	1.69	0.71	9000	1.1
106	DL-Ser	3.74	1.83	0.88	10000	1.1
120	DL-Thr	3.96	2.01	0.01	8000	1.2
147	L-Gln	3.96	2.01	0.34	6000	1.1
148	L-Glu	4.06	2.09	1.55	8000	1.0
116	L-Pro	4.56	2.50	0.61	6000	1.2
76	L-Gly	4.75	2.66	2.13	11000	0.9
90	DL-Ala	5.41	3.20	6.91	9000	1.1
118	DL-Val	8.58	5.81	3.81	8000	1.0
150	DL-Met	10.1	7.79	3.31	9000	0.8
182	L-Tyr	13.56	9.90	2.46	9000	1.0
132	L-Ile	16.05	11.94	1.07	7000	0.8
132	L-Leu	17.27	12.95	7.26	9000	1.1
166	DL-Phe	27.57	21.42	16.91	10000	0.8
205	DL-Trp	87.31	70.55		10000	0.9

**Table S2:** Chromatographic data for 20 standard amino acids on Metrosep C6 column (2.0 x 150 mm). Retention time  $t_R$ , retention factor  $k$ , resolution  $R_s$ , efficiency  $N$  and asymmetry factors  $A_s$  obtained in isocratic elution mode. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ L; sample size: 0.3 mM per amino acid; eluent: 70/30 % v/v (water/acetonitrile), 0.2 % formic acid; flow rate: 0.20 mL/min; detection: ESI-MS (SIM-POS  $[M+H]^+$ ); column temperature: 45  $^{\circ}$ C.

$m/z$	Analyt	$t_R$ / min	$k$	$R_s$ (N+1)	$N / m^{-1}$	$A_s$
134	Asp	3.01	0.33	2.35	11000	1.8
148	Glu	3.44	0.55	0.38	12000	1.6
106	Ser	3.51	0.58	0.91	14000	1.6
120	Thr	3.68	0.67	1.07	14000	1.7
133	Asn	3.89	0.77	1.25	15000	1.5
147	Gln	4.16	0.91	0.34	11000	1.3
76	Gly	4.23	0.94	1.09	19000	1.4
90	Ala	4.44	1.05	0.62	21000	1.6
116	Pro	4.57	1.11	0.47	11000	1.8
241	Cys	4.7	1.18	0.36	13000	1.5
182	Tyr	4.78	1.22	1.04	20000	1.5
150	Met	5.01	1.34	0.37	17000	1.8
118	Val	5.1	1.38	2.09	13000	1.5
132	Ile	5.77	1.72	0	9000	1.5
132	Leu	5.77	1.72	1.46	9000	1.5
166	Phe	6.24	1.96	6.93	19000	1.5
205	Trp	8.38	3.04	15.44	22000	1.3
156	His	15.69	6.73	3.89	25000	1.4
147	Lys	18.19	7.99	5.46	27000	1.5
175	Arg	22.71	10.28		20000	1.6

**Table S3:** Chromatographic data for 20 standard amino acids on MCX column. Retention time  $t_R$ , retention factor  $k$ , resolution  $R_s$ , efficiency  $N$  and asymmetry factors  $A_s$  obtained in isocratic elution mode. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ L; sample size: 0.3 mM per amino acid; eluent: 85/15 % v/v (water/acetonitrile), 0.05 % formic acid; flow rate: 0-12 min 0.2 mL/min, 12.5-32.5 min 0.25 mL/min, 33-34 min 0.2 mL/min; detection: ESI-MS (SIM-POS  $[M + H]^+$ ); column temperature: 45  $^{\circ}$ C [34].

$m/z$	Analyt	$t_R$ / min	$k$	$R_s$ (N+1)	$N / m^{-1}$	$A_s$
134	DL-Asp	4.34	0.40	1.65	11000	1.4
133	L-Asn	4.66	0.52	0.16	12000	1.2
241	L-Cys	4.69	0.53	0.05	12000	1.2
106	DL-Ser	4.70	0.53	0.91	12000	1.2
147	L-Gln	4.89	0.60	0.20	11000	1.2
120	DL-Thr	4.93	0.61	0.51	13000	1.2
116	L-Pro	5.03	0.65	0.27	13000	1.2
148	L-Glu	5.09	0.67	0.88	12000	1.1
76	L-Gly	5.28	0.74	2.14	14000	1.2
90	DL-Ala	5.74	0.90	7.16	15000	1.2
118	DL-Val	7.50	1.52	2.22	17000	1.1
150	DL-Met	8.11	1.74	3.38	18000	1.0
182	L-Tyr	9.12	2.10	5.26	19000	1.0
132	L-Ile	10.81	2.70	0.85	17000	1.1
132	L-Leu	11.14	2.82	4.76	17000	1.0
156	L-His	12.92	3.45	3.66	30000	1.0
166	DL-Phe	14.29	3.91	4.22	32000	1.0
147	L-Lys	15.84	4.48	4.09	37000	1.1
175	L-Arg	17.59	5.10	17.00	32000	1.0
205	DL-Trp	28.71	9.05		25000	1.0

**Table S4:** Exemplary fit parameters obtained for an equimolar standard and a wheat beer sample.

	<b>Equimolar Standard</b>		<b>Mixed-beer sample</b>	
	<i>Value</i>	<i>Error</i>	<i>Value</i>	<i>Error</i>
<i>Fit parameters</i>				
y0	10106	106.66	7583.3	22.727
xc1	10.699	4.68E-4	10.595	0.001
w1	0.3107	6.338E-4	0.3182	0.0014
A1	669133	2121.60	62467.6	406.450
xc2	11.105	4.93E-4	11.021	3.94E-4
w2	0.3605	7.142E-4	0.3650	5.965E-4
A2	857841	2157.31	208918	413.650
<i>Statistics</i>				
DF	1716		1716	
COD (R <sup>2</sup> )	0.99973		0.99964	
ReducedChiSq	1.88666E7		855848.3666	

**Table S5:** Eluent-dependent resolution of Ile/Leu with varying organic modifier. \*\* without Trp, Phe; \*without Trp.

<b>Eluent (H<sub>2</sub>O/ACN + %FA)</b>	<b>R<sub>s</sub> (Ile/Leu)</b>	<b>Runtime / min</b>	<b>No. of AA</b>	<b>N (Ile, Leu)</b>
100/0 + 0.2	2.92	36	18**	12000
95/5 + 0.2	1.75	30	19*	16000
90/10 + 0.2	1.30	20	19*	13000
85/15 + 0.05	0.85	34	20	17000

**Table S6:** Calibration data for quantification of standard amino acids at trace level (IC-MS) and standard working level (IC-MS and IC-UV).

Amino acid	Trace level ( $\mu\text{M}$ )			Working level (mM)			
	Test range / $\mu\text{M}$	$R^2$	Calibration function	Test range / mM	Recovery (Mix/Cal.) / % MS   UV	$R^2$ (MS   UV)	Calibration function
DL-Asp	0.057-2.42	0.9999	$y=0.686x-0.013$	0.061-1.24	98.8	0.9999	$y=-0.8105x^2+2.5191x$
L-Asn	-	-		0.068-1.35	92.6	0.9999	$y=-0.9452x^2+2.4720x$
L-Cys	0.028-1.21	0.9997	$y=1.386x-0.020$	0.064-1.29	73.1	0.9997	$y=-0.5901x^2+2.3312x$
DL-Ser	0.057-2.42	0.9999	$y=0.667x+0.012$	0.064-1.33	87.6	0.9999	$y=-1.0138x^2+2.5205x$
L-Gln	-	-		0.064-1.27	84.6	0.9999	$y=-0.9840x^2+2.4743x$
DL-Thr	0.057-2.42	0.9999	$y=0.673x-0.001$	0.063-1.32	83.6	0.9999	$y=-0.9833x^2+2.5150x$
L-Pro	0.057-2.42	0.9999	$y=0.689x-0.007$	0.066-1.34	104	0.9999	$y=-1.4523x^2+2.7377x$
L-Glu	0.057-2.42	0.9999	$y=0.661x+0.002$	0.064-1.27	86.3	0.9999	$y=-1.0152x^2+2.5992x$
L-Gly	0.057-2.42	0.9997	$y=0.679x-0.012$	0.226-4.72	86.8	0.9998	$y=-0.1275x^2+0.7997x$
DL-Ala	0.057-2.42	1.0000	$y=0.672x-0.002$	0.057-1.16	106	0.9999	$y=-1.2044x^2+2.8235x$
DL-Val	0.057-2.43	0.9999	$y=0.671x-0.001$	0.064-1.25	147	0.9999	$y=-1.4572x^2+2.7377x$
DL-Met	0.057-2.42	1.0000	$y=0.672x-0.000$	0.061-1.27	94.2	0.9997	$y=-0.7444x^2+2.4691x$
L-Tyr	0.057-2.42	0.9999	$y=0.683x-0.008$	0.065-1.32	103	0.9999	$y=-0.4057x^2+2.2202x$
L-Ile	0.058-2.44	0.9996	$y=0.660x+0.014$	0.063-1.25	92.8	0.9997	$y=-1.1319x^2+2.7027x$
L-Leu	0.058-2.45	0.9998	$y=0.671x+0.005$	0.082-1.71	99.9	0.9998	$y=-0.6523x^2+1.9879x$
L-His	0.057-2.42	0.9986	$y=0.631x+0.022$	0.063-1.27	86.4	1.0000	$y=-0.3529x^2+2.2496x$
DL-Phe	0.057-2.42	0.9999	$y=0.669x+0.000$	0.067-1.33	95.9	1.0000	$y=-0.3708x^2+2.1947x$
L-Lys	0.057-2.43	0.9905	$y=0.798x-0.082$	0.140-2.91	83.4	0.9999	$y=-0.0434x^2+0.9580x$
L-Arg	0.057-2.42	0.9923	$y=0.801x-0.087$	0.065-1.33	96.3	0.9999	$y=-0.2602x^2+2.1286x$
DL-Trp	-	-		0.064-1.29	90.0	0.9997	$y=-0.0271x^2+2.0522x$



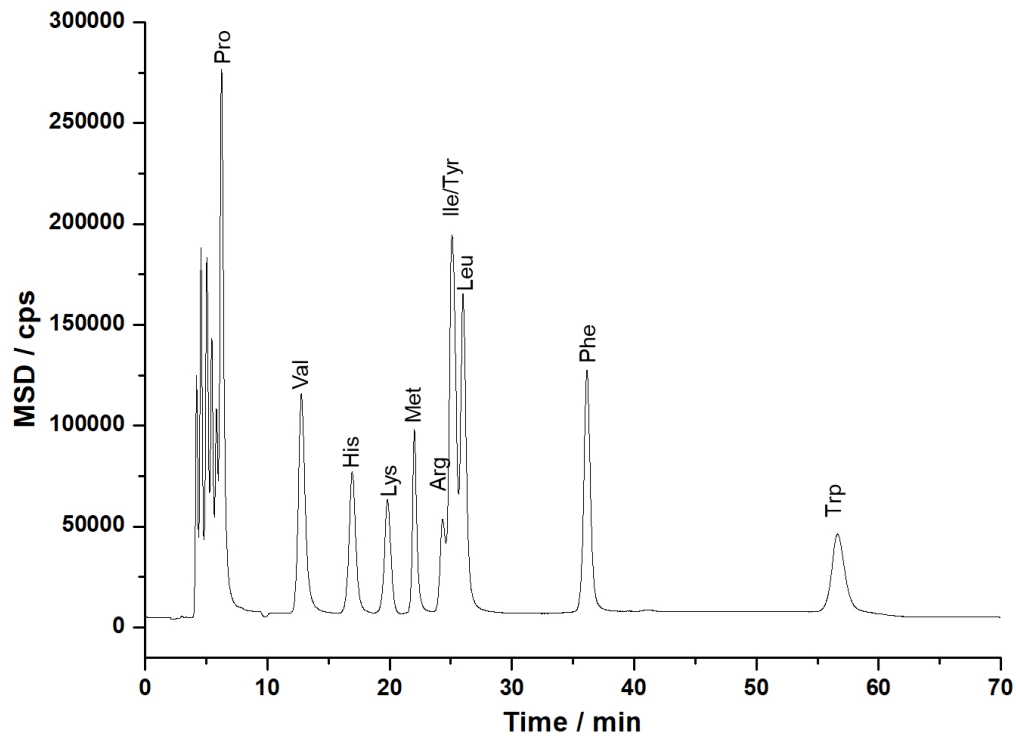
**Table S7:** Recovery rates in comparison to a certified reference standard with both UV and MS detection [34].

Analyte	Recovery UV (Cal/Certipur)/ %	Recovery MS (Cal/Certipur)/ %
DL-Asp	-	103
L-Cys	-	111
DL-Ser	-	101
DL-Thr	-	82.9
L-Pro	-	101
L-Glu	-	80.8
L-Gly	-	90.1
DL-Ala	-	105
DL-Val	-	127
DL-Met	105	107
L-Tyr	108	103
L-Ile	-	98.7
L-Leu	-	103
L-His	101	104
DL-Phe	107	107
L-Lys	-	107
L-Arg	-	106

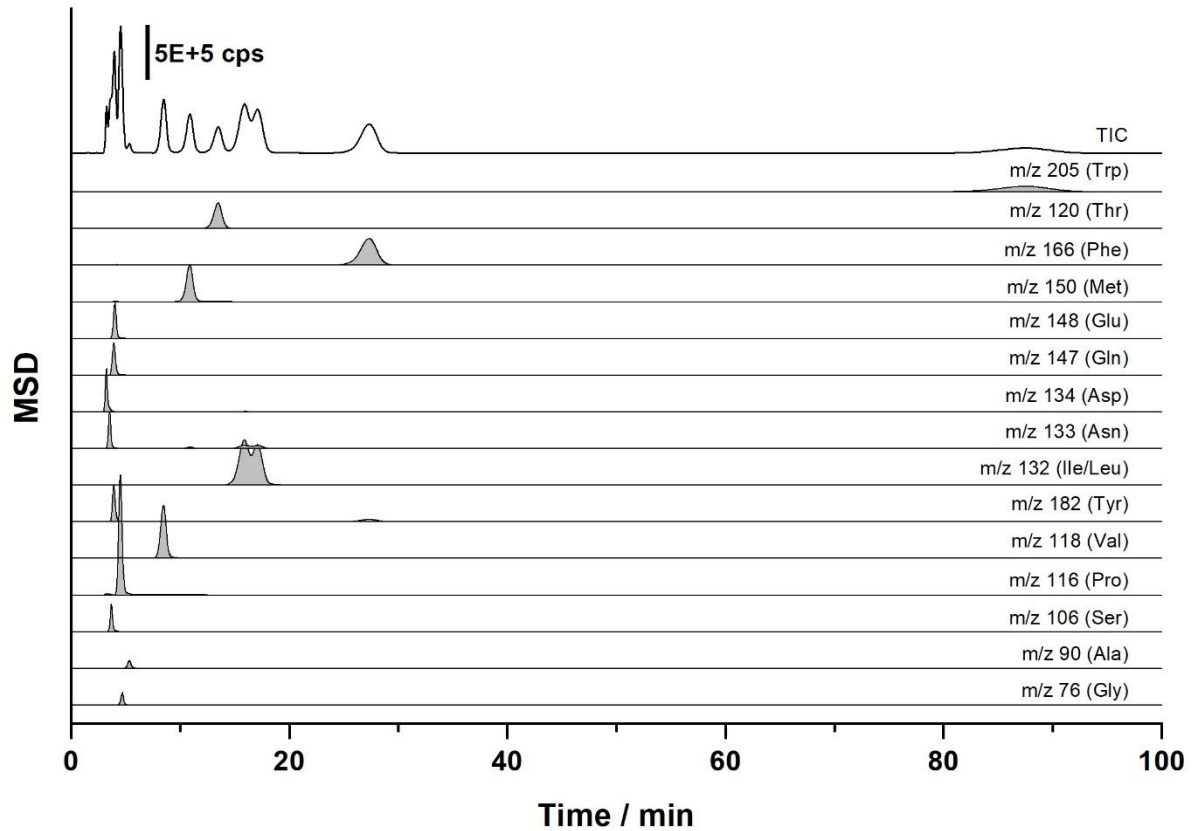
**Equation S1:** Gaussian function applied for peak fitting using the Levenberg-Marquardt algorithm.

$$y = y_0 + \frac{A}{w \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot e^{-2 \frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$$

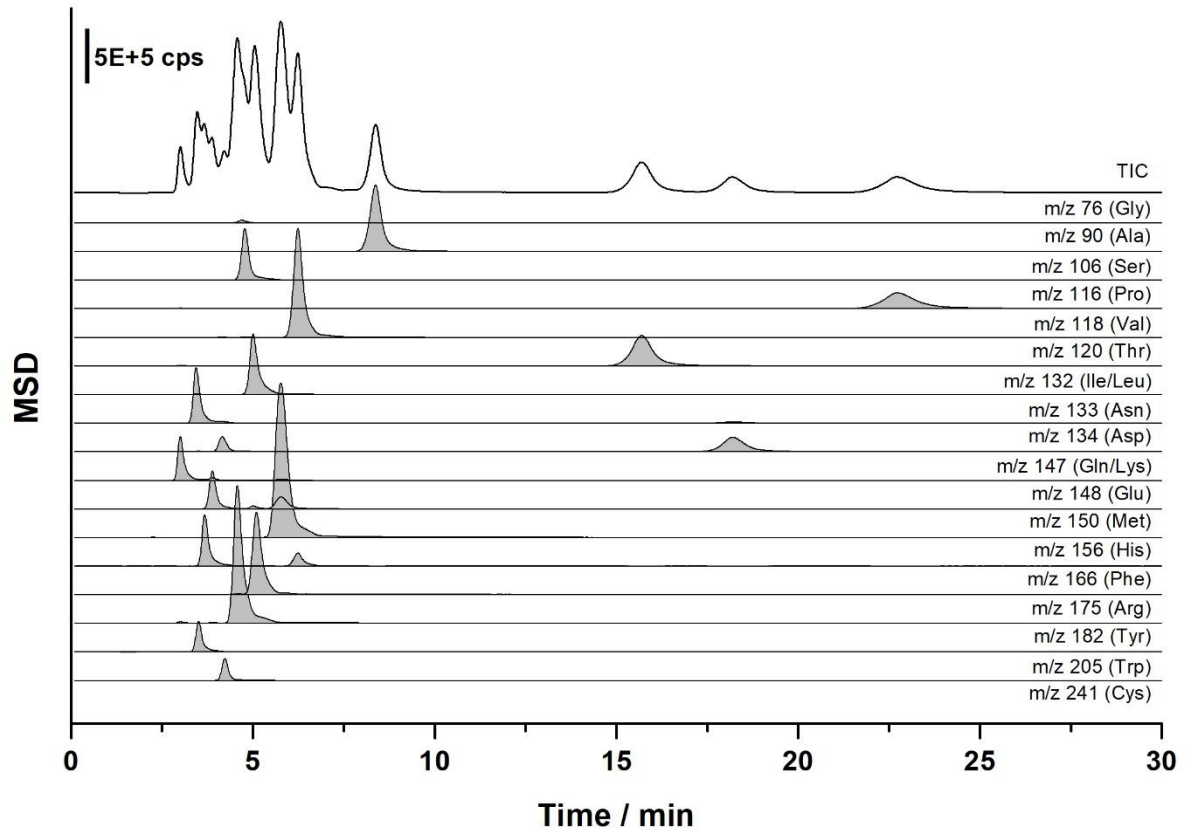
$y_0$ : baseline,  $A$ : peak area,  $w$ : peak width,  $x_c$ : retention time



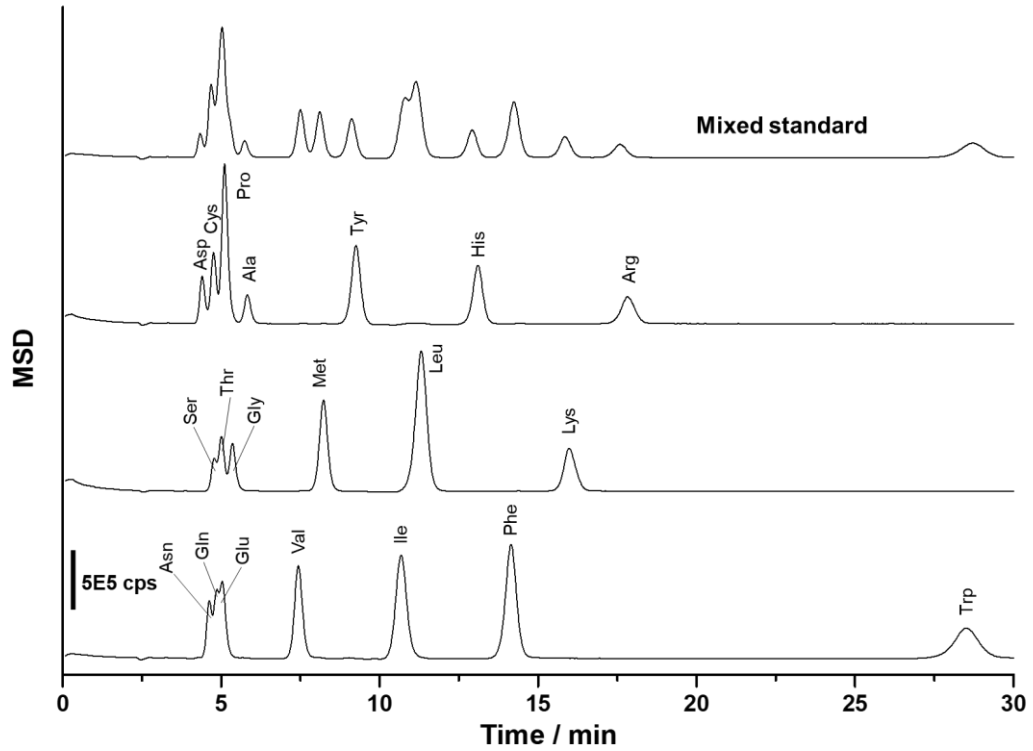
**Figure S1:** Optimized gradient program using MCX column (250 x 2 mm). Eluents: A 100/0% v/v (H<sub>2</sub>O/MeCN) + 0.05% FA, B 80/20% v/v (H<sub>2</sub>O/MeCN) + 0.2% FA, Gradient: 0–10 min 0% B, 13–25 min 40% B, 28–50 min 80% B, 53–90 min 0% B; column temperature: 45 °C,  $R_S$  (Ile/Leu) = 2.06.



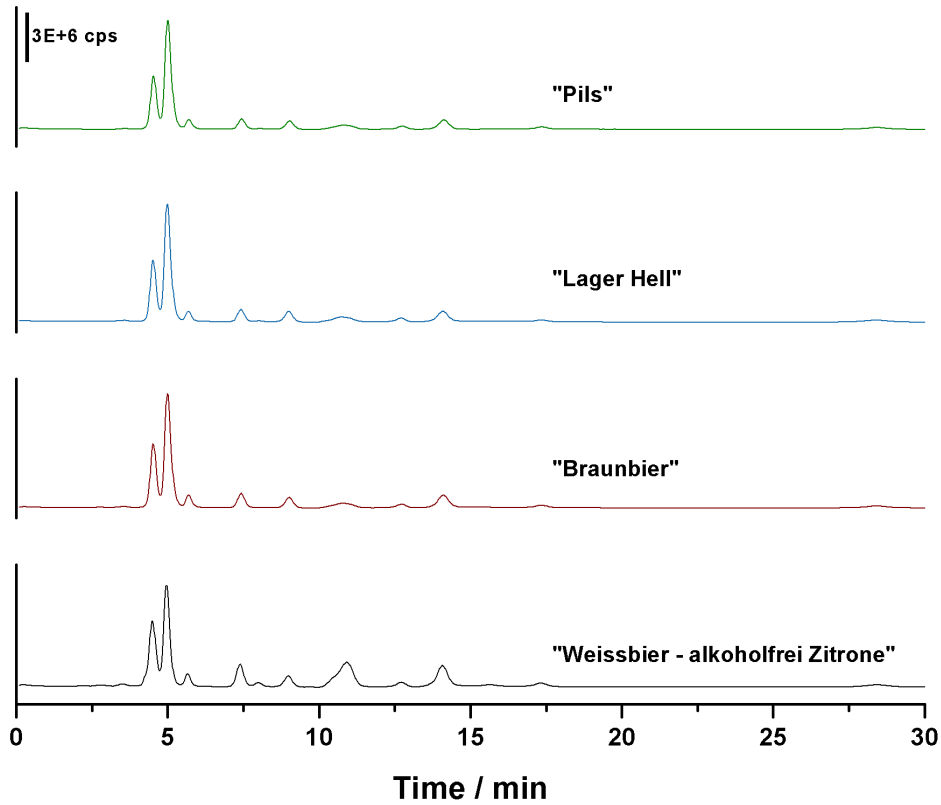
**Figure S2:** Chromatogram of 16 standard amino acids using PRP X-200 column (2.1 x 150 mm) under isocratic conditions. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ L; sample size: 0.3 mM per amino acid; eluent: 90/10 % v/v (water/acetonitrile), 0.2 % formic acid; flow rate: 0.25 mL/min; detection: ESI-MS (SIM-POS  $[M + H]^+$ ); column temperature: 45  $^{\circ}$ C.



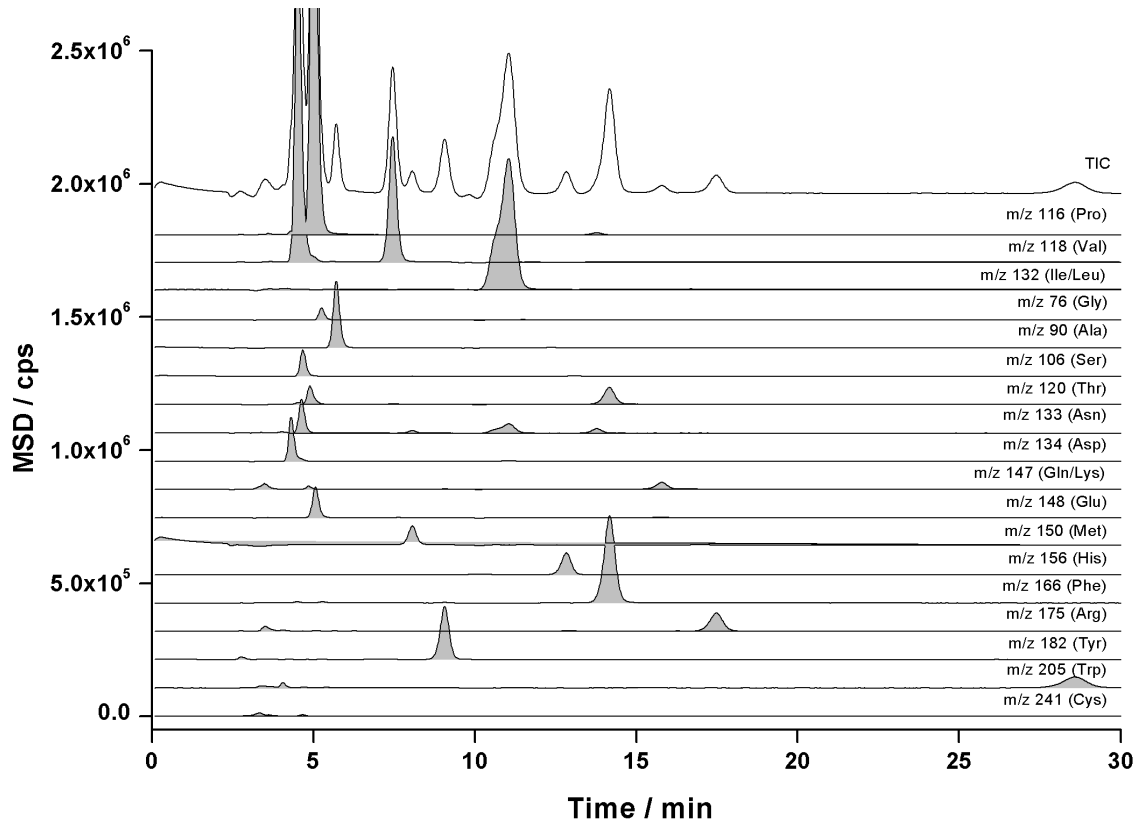
**Figure S3:** Chromatogram of 20 standard amino acids using Metrosep C6 column (2.0 x 150 mm) under isocratic conditions. Chromatographic conditions: injection volume: 5  $\mu$ L; sample size: 0.3 mM per amino acid; eluent: 70/30 % v/v (water/acetonitrile), 0.2 % formic acid; flow rate: 0.2 mL/min; detection: ESI-MS (SIM-POS  $[M + H]^+$ ); column temperature: 45  $^{\circ}$ C.



**Figure S4:** Separation of 20 standards amino acids from staggered calibration standards and a mixed standard containing all 20 compounds under investigation. IC-MS (SIM-POS ( $[M + H]^+$ )); eluent: 85/15 % v/v (water/acetonitrile), 0.05 % formic acid.



**Figure S5:** Analysis of different beer samples using IC-MS (SIM-POS ( $[M + H]^+$ )), chromatograms in full scale; eluent: 85/15 % v/v (water/acetonitrile), 0.05 % formic acid.



**Figure S6:** Extracted ion chromatograms of an exemplary wheat beer-based mixed-beer beverage using IC-MS (SIM-POS ( $[M + H]^+$ ); eluent: 85/15 % v/v (water/acetonitrile), 0.05 % formic acid.

## **7 Wissenschaftlicher Lebenslauf**



## 8 Erklärung

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation

**Entwicklung stationärer Phasen für die Kationenaustauschchromatographie:  
Funktionalisierung, Charakterisierung, Anwendung**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Dritte waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Dissertation nicht beteiligt; insbesondere habe ich hierfür nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden. Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

---

Ort, Datum, Unterschrift

## Erklärung zur kumulativen Dissertation

Ich versichere, dass die im kumulativen Teil der Dissertation mit dem Titel:

**Entwicklung stationärer Phasen für die Kationenaustauschchromatographie:  
Funktionalisierung, Charakterisierung, Anwendung**

aufgeführten Anteile der Autoren an den verfassten Publikationen und Manuskripten korrekt und vollständig dargelegt sind.

Der kumulative Teil umfasst Kapitel 3.

Marburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Unterschrift Doktorand

Name: Matthias Schmitt

\_\_\_\_\_

Unterschrift Betreuer

Name: Prof. Dr. Andreas Seubert