

Chemische Synthese von isotopenmarkierten Standards zur Analyse von unerwünschten Substanzen (NIAS) aus Lebensmittelkontaktmaterialien

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Aneta Grazyna Manowski

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Lorenz Adrian

Gutachter: Prof. Dr. Juri Rappsilber

Gutachter: Prof. Dr. Leif-Alexander Garbe

Gutachter: Dr. Andreas Mattulat

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23.11.2018

Berlin 2019

Vorbemerkung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2013 bis Dezember 2017 während einer Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V. durchgeführt. Die vorliegenden Ergebnisse sind weitgehend im Rahmen des AiF-ZIM-Projektes „Reproduzierbare Synthese von Isotopenstandardsubstanzen und Entwicklung von Monomer-Screening-Verfahren von Lebensmittelkontaktmaterialien zur FuE valider targeted und non-targeted Analysenverfahren für NIAS.“ (Förderkennzeichen: ZL4000109) erzielt worden. An dem Projekt waren drei Kooperationspartner beteiligt: die Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V., die PiCA Prüfinstitut Chemische Analytik GmbH sowie die Hochschule Neubrandenburg. Das Projekt wurde im Rahmen des Förderprogramms „Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand“ (ZIM) durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWi) gefördert und von der AiF Projekt GmbH als Projektträger betreut. Der Industriepartner, die PiCA Prüfinstitut Chemische Analytik GmbH, entwickelte die hier vorgestellte LC-MS/MS-Methode in den lipophilen Matrices und stellte das Referenzmaterial Cyclo-di-BADGE zur Verfügung. Der Kooperationspartner, die Hochschule Neubrandenburg, führte die Stabilitätsuntersuchungen der Referenzmaterialien durch.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Aneta Grazyna Manowski

Abstract

One of the main goals of this work was the synthesis of new reference materials for non-intentionally added substances (NIAS) from polymers which are used in food contact materials, the epoxy resin and polyamide-6. The application of protecting group strategy allowed synthesis of four new oligomer reference materials of bisphenol A (BPA): BADGE·BPA, BADGE·2BPA, BADGE·BPA·H₂O and BADGE·BPA·HCl. The attempts to synthesize the cyclic dimer of bisphenol A, the cyclo-di-BADGE were not successful because of the polymerization reaction that occurred. Regarding the synthesis of isotopically labeled reference materials of bisphenol A based oligomers at least one single isotope label could be introduced in all BADGE·BPA-derivatives. The introduction of a d₄-isotopic label in the polyamide-6 monomer, ε-caprolactam, succeeded in a H/D exchange reaction of a precursor with heavy water. With the standard methods of peptide chemistry, it was possible to initially synthesize the di- and tri-6-aminohexanoic acids from ε-caprolactam and then the corresponding isotopically labeled standards from the d₄-labeled compound. The identity of the synthesis products could be confirmed with ¹H, ²H, ¹³C and 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and gas chromatography (GC-) or electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Furthermore, the purity of both the isotopically labeled and not labeled compounds were proven by high performance liquid chromatography (HPLC) using a UV detector before the use of the standards in the stable isotope dilution analysis (SIDA) as reference materials.

A further goal of this work was the application of the synthesized reference materials and their isotopologues in the trace analysis of NIAS in food. Within the framework of this study, two LC-MS/MS methods have been developed, one for the hydrophilic and one for the lipophilic matrices. The first method was specially developed for beer as a matrix. The method involved four higher molecular BADGE·BPA derivatives as well as the cyclo-di-BADGE, of which four could be quantified. Of the twenty investigated Pilsner beers, two contained cyclo-di-BADGE at a concentration level near the limit of quantification, in ten cases the findings were below the limit of quantification. In no case was the migration limit for cyclo-di-BADGE exceeded. The second method was validated for lipophilic matrices and could be successfully used in routine analyses. To increase the information content about the investigated food sample, some relevant low-molecular BADGE as well as bisphenol A derivatives were included in this method. The matrix calibration was performed for vegetable oil, which is a simulant for fatty foods. Therefore, the suitability of the method for the analysis of NIAS in foods which are preserved in oil medium like fruits, vegetables, fish and meat could be confirmed. In this method 23 analytes overall could be included: the biphenols (A, B, BP, E, FL, G, M, TMC and Z), BADGE and its reaction products with water and hydrogen chloride (BADGE·2H₂O, BADGE·HCl·H₂O, BADGE·HCl, BADGE·2HCl), BFDGE and its reaction products with water and hydrogen chloride (BFDGE·2H₂O and BFDGE·2HCl), 3-Ring NOGE as well as higher molecular oligomers. In total, 25 fatty foods have been analyzed. Positive findings of at least one of the investigated BADGE or bisphenol A derivatives were detected in 16 samples. The investigated food samples contained bisphenol A, BADGE, BADGE·2H₂O, BADGE·HCl·H₂O and cyclo-di-BADGE in small quantities and bisphenol G at concentrations between 11.5 and 451 µg/kg. The samples also contained BADGE·HCl, BADGE·2HCl, BFDGE, BADGE·BPA, BADGE·2BPA, BADGE·BPA·H₂O and BADGE·BPA·HCl, but the findings were below the limit of quantification. Since Bisphenol G is toxically not regulated, its concentration is not allowed to exceed

10 µg/kg food or food simulant.^[1] Therefore, the migration limits were exceeded in all four food samples.

A method for the quantification of NIAS from polyamide-6 in food, which would contain the synthesized compounds like ε-caprolactam-d₄ and the oligomers of 6-aminohexanoic acids as well as the corresponding isotopically labeled standards is in an early stage of development and remains a goal for future works.

Zusammenfassung

Eins der Hauptziele dieser Arbeit ist die Synthese von neuen Referenzsubstanzen für nicht absichtlich hinzugefügte Substanzen (NIAS) aus Polymeren, die in Lebensmittelkontaktmaterialien Einsatz finden, dem Epoxidharz und dem Polyamid-6. Durch Einsatz von Schutzgruppenstrategien konnten vier neue oligomere Referenzsubstanzen von Bisphenol A (BPA) erfolgreich synthetisiert werden: BADGE·BPA, BADGE·2BPA, BADGE·BPA·H₂O und BADGE·BPA·HCl. Die Versuche zur Synthese von Cyclo-di-BADGE, des cyclischen Dimers von Bisphenol A, waren aufgrund der eintretenden Polymerisationsreaktion nicht erfolgreich. Bezüglich der Synthese von isotope markierten Referenzmaterialien von Bisphenol A-Oligomeren konnte in allen BADGE·BPA-Derivaten mindestens eine einfache Isotopenmarkierung eingebracht werden. Die Einführung einer d₄-Markierung in dem Monomer des Polyamids-6, dem ε-Caprolactam, gelang in einer H/D-Austauschreaktion von einer Vorstufe in schwerem Wasser. Mittels Standardtechniken der Peptidchemie konnten zunächst aus dem nichtmarkierten ε-Caprolactam die linearen Di- und Tri-6-Aminohexansäuren sowie aus der d₄-markierten Verbindung die zugehörigen isotope markierten Standards hergestellt werden. Die Identität aller Syntheseprodukte konnte mittels ¹H-, ²H-, ¹³C- und 2D-Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Gaschromatographie- (GC-) oder Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestätigt werden. Weiterhin wurden beide, die isotope markierten und die nicht markierten Substanzen, vor dem Einsatz in der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) als Referenzmaterialien auf Reinheit mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion getestet.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in dem Einsatz der synthetisierten Referenzsubstanzen und deren Isotopologen in der Spurenanalytik von NIAS in Lebensmitteln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei LC-MS/MS-Methoden entwickelt, eine für hydrophile und eine für lipophile Matrices. Die erste Methode wurde speziell für das Bier als Matrix entwickelt. Die Methode umfasste vier höhermolekulare BADGE·BPA-Derivate sowie Cyclo-di-BADGE, wovon vier eine Quantifizierung zuließen. Von den zwanzig untersuchten Pilsner-Bieren konnten in zwei Proben positive Befunde von Cyclo-di-BADGE nah der Bestimmungsgrenze festgestellt werden, in zehn Fällen lag der Gehalt an Cyclo-di-BADGE unter der Bestimmungsgrenze. Bei keiner der untersuchten Proben wurde der Grenzwert für Cyclo-di-BADGE überschritten. Die zweite Methode wurde für lipophile Matrices validiert und konnte erfolgreich in der Routineanalytik eingesetzt werden. In diese Methode wurden relevante niedermolekulare BADGE- sowie BPA-Derivate aufgenommen, um den Informationsgehalt über die zu untersuchenden Lebensmittel zu erhöhen. Die Matrixkalibrierung wurde in Pflanzenöl als Simulanz für fettreiche Lebensmittel durchgeführt. Damit konnte die Eignung der Methode für die Analytik von NIAS in Lebensmitteln, die in ölhaltigen Medien haltbargemacht werden, wie z.B. Früchte, Gemüse, Fisch und Fleisch, bestätigt werden. In die Methode konnten insgesamt 23 Analyten aufgenommen werden: die Bisphenole A, B, BP, E, FL, G, M, TMC und Z; BADGE und seine Reaktionsprodukte mit Wasser und Chlorwasserstoff: BADGE·2H₂O, BADGE·HCl·H₂O, BADGE·HCl, BADGE·2HCl; BFDGE und seine Reaktionsprodukte mit Wasser und Chlorwasserstoff: BFDGE·2H₂O und BFDGE·2HCl; 3-Ring NOGE sowie die höhermolekularen Oligomere. Insgesamt wurden 25 fetthaltige Lebensmittel analysiert, davon konnten in 16 Proben positive Befunde von mindestens einem der untersuchten BADGE- oder BPA-Derivat nachgewiesen werden. In den untersuchten Lebensmittelproben wurden kleine Mengen von Bisphenol A, BADGE, BADGE·2H₂O, BADGE·HCl·H₂O, Cyclo-di-BADGE und hohe Mengen an Bisphenol G gefunden. Die Lebensmittelproben enthielten auch BADGE·HCl, BADGE·2HCl, BFDGE, BADGE·BPA, BADGE·2BPA, BADGE·BPA·H₂O und BADGE·BPA·HCl, die

Befunde lagen jedoch unter der Bestimmungsgrenze. Da das Bisphenol G nicht toxikologisch bewertet ist, kann seine Konzentration in einem Lebensmittel oder einer Lebensmittelsimulanz einen Wert von 10 µg/kg nicht übersteigen.^[1] Jeder der vier positiven Befunde von Bisphenol G lag über dem Migrationsgrenzwert.

Eine Methode zum Nachweis von NIAS aus Polyamid-6 in Lebensmitteln, die die synthetisierten Verbindungen wie ε-Caprolactam-d₄ und die Oligomere der 6-Aminohexansäuren sowie die zugehörigen isotoopenmarkierten Standards enthält, befindet sich in einer frühen Entwicklungsphase und bleibt ein Ziel zukünftiger Arbeiten.

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung.....	I
Eidesstattliche Erklärung.....	II
Abstract	III
Zusammenfassung.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VII
I. Allgemeiner Teil.....	1
I.1 Einleitung.....	1
I.1.1 Nicht absichtlich hinzugefügte Substanzen (NIAS).....	1
I.1.2 Einsatz der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) in der Lebensmittelanalytik.....	4
I.2 Zielsetzung.....	6
I.3 Ergebnisse	7
I.3.1 Synthese von Referenzmaterialien für NIAS aus dem Epoxidharz.....	7
I.3.1.1 Versuche zur Synthese von Cyclo-di-BADGE	7
I.3.1.2 Synthese von BADGE·BPA und BADGE·2BPA	10
I.3.1.3 Syntheseversuche von Cyclo-di-BADGE ausgehend von BADGE und Bisphenol A – Cyclisierungsversuche	14
I.3.1.4 Synthese von isotopenmarkiertem BADGE·BPA und BADGE·2BPA	15
I.3.1.5 Synthese von weiteren Referenzmaterialien mit BADGE·BPA-Grundgerüst sowie isotopenmarkierten Derivaten	19
I.3.2 Synthese von Referenzmaterialien für NIAS aus dem Polyamid-6.....	20
I.3.2.1 Synthese von isotopenmarkiertem ε-Caprolactam.....	20
I.3.2.2 Synthese von Di- und Tri-ε-Aminocapronsäure.....	23
I.3.2.3 Synthese von isotopenmarkierter Di- und Tri-6-Aminocapronsäure.....	25
I.3.3 Reinheitsbestimmung der synthetisierten Referenzmaterialien	26
I.3.4 Überprüfung der eingeführten Markierung in den synthetisierten Verbindungen und Bestimmung der Markierungsgrade.....	28
I.3.5 Stabilitätsuntersuchungen der synthetisierten Referenzmaterialien.....	34
I.3.6 Entwicklung der LC-MS/MS-Methode in hydrophilen Lebensmitteln	37
I.3.7 Validierung der LC-MS/MS-Methode in hydrophilen Lebensmitteln.....	41
I.3.7.1 Grundkalibrierung	41
I.3.7.2 Matrixkalibrierung.....	44
I.3.8 Entwicklung der LC-MS/MS-Methode in lipophilen Lebensmitteln.....	46

I.3.9	Validierung der LC-MS/MS-Methode in lipophilen Lebensmitteln	47
I.3.9.1	Grundkalibrierung	47
I.3.9.2	Matrixkalibrierung.....	49
I.4	Diskussion.....	51
I.4.1	Beurteilung der Befunde der NIAS in hydrophilen Lebensmitteln.....	51
I.4.2	Beurteilung der Befunde der NIAS in lipophilen Lebensmitteln	53
II.	Experimenteller Teil	57
II.1	Geräte.....	57
II.1.1	Kernresonanzspektroskopie.....	57
II.1.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	57
II.1.3	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie	58
II.2	Methoden.....	58
II.3	Chemikalien und Lösungsmittel	62
II.4	Versuchsvorschriften und spektroskopische Daten der synthetisierten Verbindungen	64
III.	Anhang	90
III.1	Literaturverzeichnis	90
III.2	Abkürzungsverzeichnis	92

I. Allgemeiner Teil

I.1 Einleitung

I.1.1 Nicht absichtlich hinzugefügte Substanzen (NIAS)

Eine Lebensmittelverpackung schützt das Füllgut vor äußeren Einflüssen wie Licht, Sauerstoff, Feuchtigkeit, mechanischer Beanspruchung und Verunreinigungen, bietet also stabile Lagerbedingungen und verlängert auf diese Weise die Haltbarkeit des Füllguts. Während der Lagerung können Substanzen aus der Verpackung auf das Füllgut übergehen, dabei kann es sich beispielsweise um Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess des Polymers, aus dem die Verpackung besteht, handeln. Die Migration von diesen nicht beabsichtigt hinzugefügten Substanzen (engl. Non-intentionally added substances, kurz NIAS) wird durch die EU-Verordnung 10/2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, reguliert.^[1] Die Anlage I der Verordnung (EU) 10/2011 enthält eine Liste der bei der Herstellung von Kunststoffen zugelassenen Substanzen (Unionsliste). Diese Stoffe dürfen die spezifischen Migrationsgrenzwerte (SML) nicht überschreiten. Darüber hinaus enthält eine Verpackung weitere nicht in der Unionsliste aufgeführte Stoffe, die toxikologisch nicht bewertet sind oder gar nicht aufgeklärte Substanzen. Die Gesamtheit der aus einem Polymer migrierenden Substanzen wird als Gesamtmigrat bezeichnet. Die Aufklärung der Substanzen im Gesamtmigrat, die analytische Erfassung von besonders besorgniserregenden Substanzen sowie schließlich eine toxikologische Bewertung dieser Stoffe stellt ein wachsendes Forschungsfeld dar.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Synthese und Analyse von NIAS aus dem Epoxidharz und dem Polyamid-6. Beide Polymere werden häufig in der Verpackung von Getränken und Lebensmitteln verwendet. Es sollen zunächst nicht isotopenmarkierte und im Anschluss isotopenmarkierte Referenzmaterialien hergestellt werden, die als NIA-Komponenten in Verpackungsmaterialien aus Epoxidharzen und Polyamid 6 (Abbildung 1) vermutet werden.

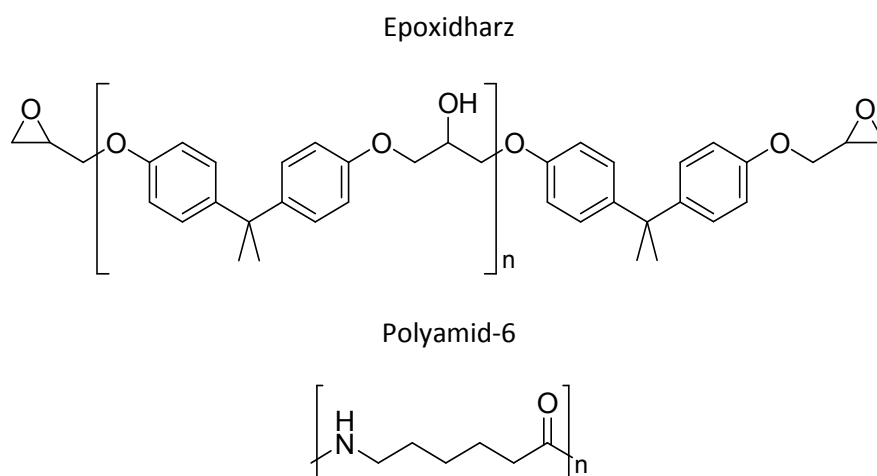


Abbildung 1: In Verpackungsmaterialien eingesetzte Polymermaterialien.

Im Folgenden sollen die in der Abbildung 1 aufgeführten Polymere, deren Einsatz als Lebensmittelverpackung kurz beschrieben werden sowie Beispiele für bereits untersuchte NIAS gegeben werden.

Beim Epoxidharz handelt es sich um einen Polyether mit einer oder mehreren endständigen Epoxidgruppen (Abbildung 1), es wird mittels Polyaddition aus Bisphenol A und Epichlorhydrin im alkalischen Milieu hergestellt.^[2] Das Epoxidharz wird neben Organosol (Polyvinylchlorid-Lack) als Lack für Doseninnenbeschichtung verwendet, um so den Kontakt zwischen dem Metall und dem Füllgut zu verhindern. Die Getränke- und Konservendosen stellen eine alternative Verpackung zu einer Glasflasche dar, sie sind leichter und bruchsicherer. Trotz einiger Vorzüge einer Dose gegenüber einer Glasflasche ist die Migration von NIAS aus der Doseninnenbeschichtung in Lebensmittel denkbar. Die NIAS aus der Doseninnenbeschichtung stellen ein potenzielles, gesundheitliches Risiko für den Verbraucher dar und sind ein Thema von zahlreichen Studien. Die Aufklärung des Gesamtmigrates aus dem Epoxidharz ist wegen der Überschreitung des zugelassenen Grenzwertes an Bisphenol A-diglycidylether (BADGE) in Thunfischkonserven^[3] ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt. Neben BADGE wurden in Doseninnenbeschichtungen noch seine Hydrolyseprodukte (BADGE·H₂O und BADGE·2H₂O), Hydrochloride (BADGE·HCl und BADGE·2HCl) und sein Wasser- und Hydrochlorid-Mischaddukt (BADGE·H₂O·HCl)^[4] als NIA-Komponenten nachgewiesen. D. Braun und D.W. Lee postulierten einen Mechanismus der Epoxidharzsynthese, in dem die genannten NIAS als Intermediate vorkommen.^[5] Die Hydrochlorid- und Hydrolyseprodukte können ebenfalls durch den Kontakt mit aciden und wässrigen Lebensmitteln entstehen.^[6] Die niedermolekularen NIAS wurden mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse in Getränken aus der Dose wie Bier^[7,8], Biermischgetränke^[8] und Alkopops auf Cola-Basis^[8] untersucht, wobei die Isotopenstandards BPA-d₄, BPF-d₄, BPS-d₄, BADGE-d₄, BADGE·H₂O-d₄ und BADGE·2H₂O-d₄ zum Einsatz kamen. Weitere in Analytik von Lebensmitteln häufig verwendete Isotopenstandards sind BPA-d₁₆^[9] und ¹³C₁₂-BPA^[10], für andere Matrices wie Blut, Urin und Fettgewebe wurden ¹³C₁₂-BPA und BADGE-d₆ verwendet^[11]. In dem Gesamtmigrat konnten neben den niedermolekularen Substanzen ebenfalls kettenförmige und cyclische Oligomere von BADGE und Bisphenol A identifiziert werden. Simat et al. gelang die Identifizierung von dem linearen di-BADGE, tri-BADGE, BADGE·BPA, BADGE·BPA·H₂O, BADGE·2BPA und Cyclo-di-BADGE mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektor.^[12] Untersuchungen in Lebensmitteln sowie Isotopenstandards für diese Substanzen sind nicht bekannt.

Das Poly-ε-caprolactam (Polyamid 6, PA 6, Handelsname Perlon) (Abbildung 1) wird mittels der Ringöffnungspolymerisation von ε-Caprolactam hergestellt. Im ersten Schritt wird ε-Caprolactam hydrolytisch geöffnet, die dabei gebildete 6-Aminohexansäure reagiert mit ε-Caprolactam zum gewünschten Polymer. Das PA-6 wird als Polyamidfolie verwendet, diese zeichnet sich über eine niedrige Durchlässigkeit für Gase, Fette und Aromen, gute mechanische Eigenschaften, eine hohe Chemikalienbeständigkeit und gute Verarbeitungseigenschaften aus, der Einsatz als Einkomponenten-Folie ist jedoch begrenzt. Häufig werden PA-Folien in Verbindung mit Polyethylen als Mehrschichtfolie eingesetzt, wobei Polyethylen wesentlich günstiger ist und eine sehr geringe Wasserdampfdurchlässigkeit zeigt^[13]. Des Weiteren findet das Polymer Anwendung als Vakuumverpackung für Fleisch, Wurst und Käse.^[14] Aufgrund der geringen Flexibilität des hochkristallinen Poly-ε-caprolactams, werden die Monomere als Weichmacher eingesetzt^[15], sodass das im Polymer enthaltene ε-Caprolactam in Lebensmittel migrieren kann. In der Literatur sind quantitative Untersuchungen der Migration von ε-Caprolactam^[16] und seinen cyclischen Oligomeren^[14] aus dem Polyamid 6 in Lebensmittelsimulanzien bekannt. Neben dem ε-Caprolactam und seinen zahlreichen cyclischen Oligomeren (n = 1–9) konnten in Ethanol/Wasser-Extrakten von Polyolefin-Multilayer-

Kunststoffolie, welche eine Polyamid 6-Schicht enthielt, das lineare Di- und Trimer nachgewiesen werden.^[17] Da vor allem das ϵ -Caprolactam und das lineare Di- und Trimer in einer Polyolefin-Kunststoffolie nachweisbar sind, ist es sinnvoll die Analyse in Lebensmitteln auf die genannten Analyten einzuschränken. Die Untersuchungen der Migration von linearen Oligomeren aus Polyamid 6 in Lebensmittelsimulanzien bzw. Lebensmittel sind nicht bekannt. Weiterhin konnte das ϵ -Caprolactam in Polycaproamid mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) bestimmt werden, wobei das ^{15}N - ϵ -Caprolactam als Standard eingesetzt wurde.^[18] Zu bekannten markierten ϵ -Caprolactamen, die als Standard in der SIVA fungieren können, zählt das ϵ -Caprolactam-6- d_1 **1**^[19], ^{18}O - ϵ -Caprolactam^[20] und ^{15}N - ϵ -Caprolactam^[21]. Für die Synthese der letztgenannten Standards sind relativ teure Reagenzien notwendig. Zur Synthese von ^{18}O - ϵ -Caprolactam benötigt man H_2^{18}O (97 Atom% ^{18}O : 249.5 Euro für 1 g, 99 Atom% ^{18}O : 1005 Euro für 1 g) und für ^{15}N - ϵ -Caprolactam wird ^{15}N -Hydroxylaminhydrochlorid (98 Atom% ^{15}N : 845 Euro für 1 g) benötigt. Neben der am Heteroatom eingebrachten Isotopenmarkierung sind ϵ -Caprolactame mit einem Deuterierungsgrad von d_1 bis d_{11} bekannt. Die hochdeutierten Verbindungen (ab 6 Deuteriumatomen) sind für die SIVA nicht optimal, da der hohe Markierungsgrad bereits zu Unterschieden in dem chromatographischen Verhalten der markierten und nicht markierten Verbindung führen kann. Daher besteht Bedarf nach der Synthese geeigneter isotopenmarkierter Referenzmaterialien, die in der SIVA der aus Polyamid-6 in Lebensmittel migrierenden Substanzen eingesetzt werden können.

Bezüglich der Auswahl von zu synthetisierenden Referenzmaterialien für NIA-Komponenten ist eine Betrachtung der für die Kontamination von Lebensmitteln relevanten Quellen von Bedeutung. Nerín et al. unterscheiden folgende Quellen von NIAS:

- (a) Zersetzungsprozesse z.B. des Polymers oder eines Additives,
- (b) Zersetzung von Additiven wie Antioxidantien oder Lichtstabilisatoren,
- (c) Verunreinigungen z.B. aus Rohmaterialien oder Additiven, die zur Herstellung des Polymers verwendet wurden,
- (d) Neuentstehende Komponenten z.B. infolge des Kontaktes der Polymere mit den wässrigen oder sauren Lebensmitteln sowie
- (e) Kontaminanten z.B. aus dem Recycling-Prozess.^[6]

Aufgrund der hohen Zahl der möglichen Quellen für NIAS, bleibt eine Vielzahl der aus dem Verpackungsmaterial migrierenden Substanzen unbekannt. Die Synthese von Referenzmaterialien für vermutete Zerfallsprodukte des für die Verpackung benutzten Polymers ist essentiell für die qualitative und quantitative Untersuchung von NIAS.

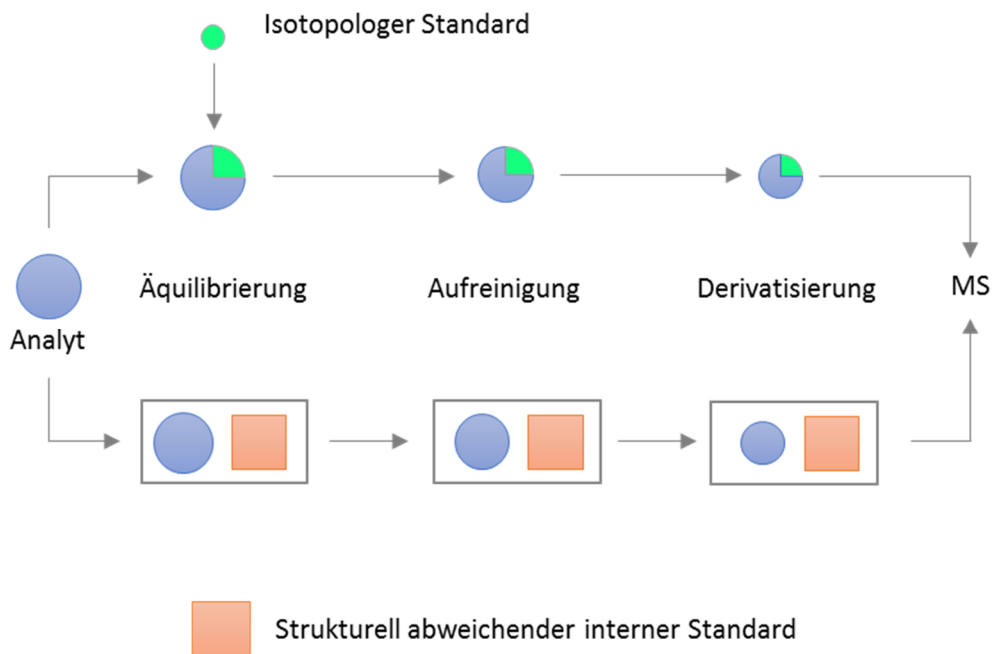
Der Wissenschaftliche Lebensmittelausschuss (engl. Scientific Committee on Food, kurz SCF) stuft die Stoffe, deren Molekülgröße kleiner als 1000 Da ist, als toxikologisch relevanter als solche deren Molekülgröße 1000 Da übersteigt, ein.^[22] Das hängt damit zusammen, dass sie aufgrund ihrer geringeren Größe vom Gastrointestinaltrakt einfacher absorbiert werden.^[23] Daher liegt ein besonderes Augenmerk auf der Synthese von niedermolekularen NIA-Komponenten.

Zusammenfassend bieten sich NIAS als Synthesziele an, die aus den von Nerín et al. genannten Quellen in das Produkt gelangen können, aufgrund der toxikologischen Relevanz eine Masse von

höchstens 1000 Da aufweisen und die kommerziell nicht verfügbar sind. Diese Arbeit soll folglich einen Beitrag zur chemischen Synthese von bisher unbekanntem, polymeren Verbindungen sowie zur analytischen Erfassung von NIAS in Lebensmittelkontaktmaterialien leisten. Weiterhin stellt der Nachweis von NIAS in den Lebensmitteln einen Ausgangspunkt für weitere Arbeiten dar, so kann im Anschluss eine toxikologische Bewertung von relevanten NIAS erfolgen, die wiederum eine Grundlage für die Festlegung von Migrationsgrenzwerten auf nationaler und/oder europäischer Ebene sein kann.

I.1.2 Einsatz der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) in der Lebensmittelanalytik

Zahlreiche Methoden basieren auf dem Einsatz von internen Standardsubstanzen. Diese werden zu Anfang der Analyse der Probe hinzugegeben. Unter der Annahme, dass sich der Analyt und der interne Standard während der Analyse gleich verhalten, wird der Gehalt des Analyten in der Probe über eine Kalibriergerade quantitativ bestimmt. Der interne Standard soll dem Analyten hinsichtlich der chemischen und physikalischen Eigenschaften, beispielsweise Löslichkeit, Polarität sowie dem Ansprechverhalten in der Messmethode ähneln, aber nicht identisch sein. Auf diese Weise lassen sich stochastisch unvermeidbare Abweichungen ausgleichen. Wie aus dem Schema 1 ersichtlich ist, kann diese Vorgehensweise aufgrund von unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften der Substanzen bei der Probenvorbereitung zu ungleichen Verlusten zwischen dem Analyten und dem internen Standard führen. Da das Verhältnis Analyt/interner Standard nicht während der gesamten Analyse konstant bleibt, liefert die Methode in geringerem oder größerem Ausmaß falsche Ergebnisse.



Schema 1: Das Prinzip der Stabilisotopenverdünnungsanalyse.^[24]

Die Stabilisotopenverdünnungsanalyse beruht auf dem Dotieren der Probe mit einem isotopologen Standard, welche die nicht markierte Verbindung als Analyten enthält. Infolge dessen wird die natürliche Isotopenverteilung verändert, man spricht von einer „Verdünnung“, woher der Name dieser Methode stammt. Bei der Verwendung von einem isotopologen internen Standard — der abgesehen

von dem Isotopeneffekt die gleichen chemischen sowie physikalischen Eigenschaften wie der Analyt aufweist — werden die Analytverluste kompensiert. Das führt zu deutlich sicheren und präziseren Ergebnissen als bei der Verwendung von einem strukturell unterschiedlichen internen Standard. Aufgrund dessen empfiehlt sich der Einsatz von SIVA insbesondere bei instabilen und flüchtigen Analyten. Neben der schon genannten Kompensierung der Analytverluste während der Probenaufarbeitung ist SIVA auch wegen der Kompensierung der Ionensuppression sowie des Carrier-Effektes anderen Analysemethoden überlegen. Auch bei der Messung mittels Massenspektrometrie kann es bei der Verwendung von strukturell abweichendem Standard zu Unterdrückung der Ionisierung des Analyten durch vorhandene Matrixkomponenten (Ionensuppression) kommen. Setzt man dagegen einen isotopologen Standard ein, so verhalten sich der Analyt und der Standard während der Messung gleich und der Fehler durch die störende Matrixkomponente wird über die Korrektur des internen Standards ausgeglichen. Der Carrier-Effekt spielt eine große Rolle in der Analyse von Rückständen. Unter der Voraussetzung, dass man im linearen Bereich der Kalibriergerade arbeitet, kann man den Standard im Überschuss zum Analyten zusetzen, wodurch der Analyt in kleinsten Mengen erfasst werden kann. Das bedeutet einen zusätzlichen Gewinn an Empfindlichkeit.^[24]

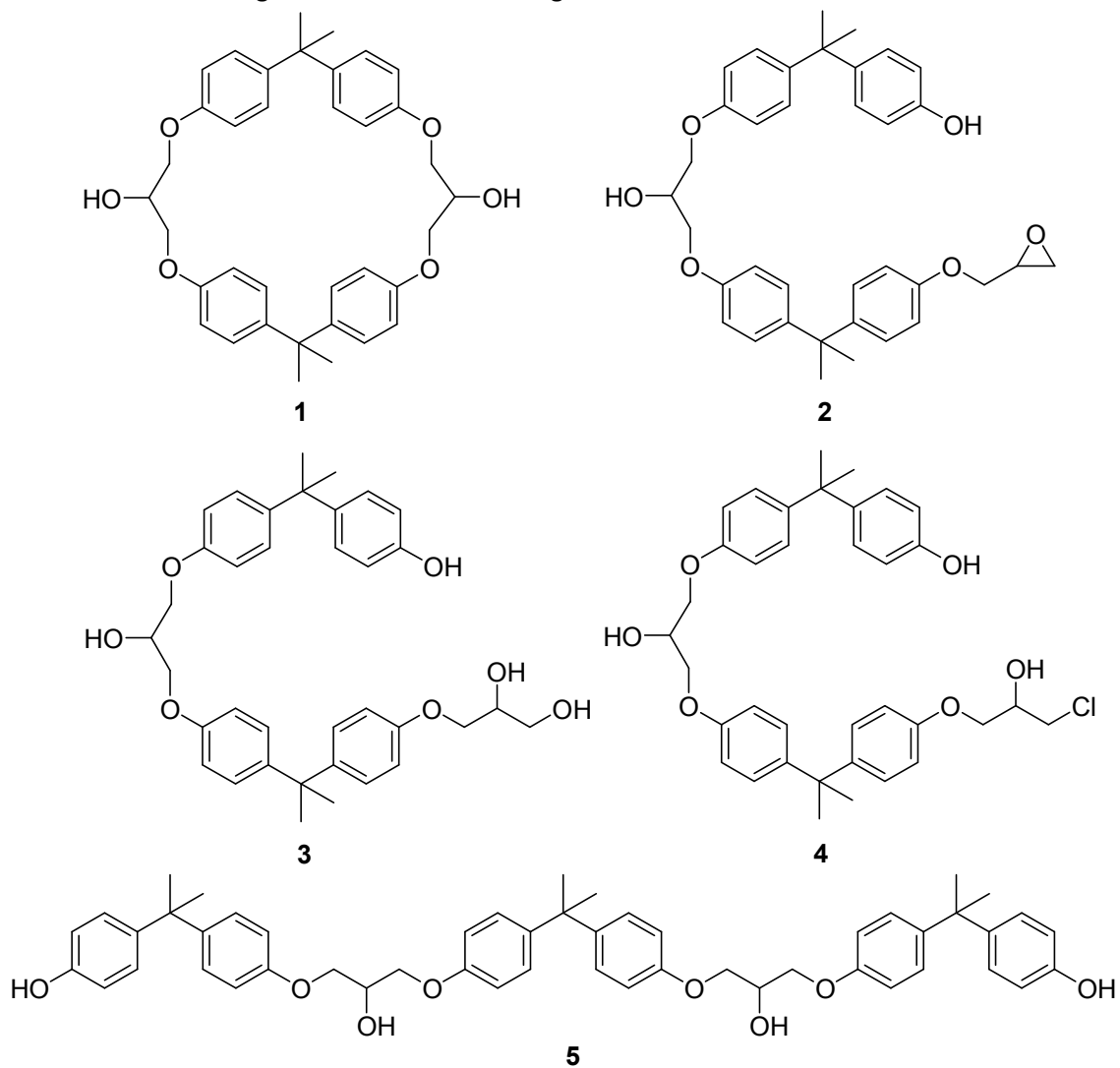
Bei der Methodenentwicklung muss beachtet werden, dass eine unvollständige Äquilibration des Standards mit der Probe sowie spektrale Interferenzen und Isotopeneffekte zu falschen Ergebnissen führen können. Nach der Zugabe des isotopologen Standards muss der Probe eine genügende Zeit gegeben werden, damit sich der in der Matrix eingeschlossene Analyt im Gleichgewicht mit dem Standard befindet (Äquilibration der Probe). Auf diese Weise kann gewährleistet werden, dass sich beide Substanzen während der Extraktion gleich verhalten. Weiterhin ist wichtig, dass der Isotopenstandard während der gesamten Analyse eine stabile Markierung aufweist. Vor allem an aciden Positionen eingeführte ^2H -Markierung sind problematisch, da sie während der Probenvorbereitung gegen Wasserstoff ausgetauscht werden können, sodass das Verhältnis zwischen dem Analyten und internem Standard während der Analyse nicht gleich bleibt. Das gleiche gilt für eine ^{18}O -Markierung in einer Carboxylgruppe. Vor der Synthesepaltung sollen mögliche spektrale Interferenzen ausgeschlossen werden. Die Fragmentierung des Analyten muss bekannt bzw. aufgeklärt werden, um sicherzustellen, dass die eingeführte Markierung entweder in einem ausreichend intensivem Moleküllionen- oder Fragmentionenpeak vorhanden sein wird, der dann zu Quantifizierung herangezogen wird. Zu spektralen Interferenzen kommt es, wenn sich die Isotopensignale der unmarkierten Verbindung z.B. ^{13}C -, ^{15}N -, ^{18}O -Sateliten mit den Moleküllionen- oder Fragmentionenpeaks der markierten Verbindung überlappen. In diesem Fall werden komplizierte Kalibrierverfahren angewandt oder entsprechend mehrere Markierungen einführt. Letzteres kann ebenfalls zur Verfälschung des Verhältnisses zwischen dem Analyten und internem Standard durch Isotopeneffekte führen. Dieser kommt vor allem bei ^2H -Markierung zum Vorschein, denn eine steigende Zahl der eingeführten markierten Atome resultiert in der Zunahme der Unterschiede in chemischen und physikalischen Eigenschaften. Dieser Effekt macht sich vor allem in der chromatographischen Trennung der Substanzen mittels HPLC bemerkbar, wo die mehrfach markierte Verbindung eine andere Retentionszeit als die unmarkierte Verbindung zeigt. Daher ist ein Mittelweg zwischen dem Ausschluss von spektralen Interferenzen und vom Isotopeneffekt zu finden.^[24]

Wegen der hohen Spezifität, der Kompensierung der Analytverluste während der Probenvorbereitung und der Messung mittels Massenspektrometrie hat sich SIVA als Methode in der Analytik von NIAS in Lebensmitteln etabliert. Die SIVA wurde u.a. für die Bestimmung von organischen Spurensubstanzen wie phenolischen Xenoestrogenen in Luftproben^[25], Mykotoxinen in Getränken^[26] sowie Aflatoxinen

in Lebensmittelproben^[27] verwendet. Aufgrund von fehlender Verfügbarkeit von Isotopenstandards fand SIVA bisher wenig Anwendung in der Analytik von oligomeren NIAS.

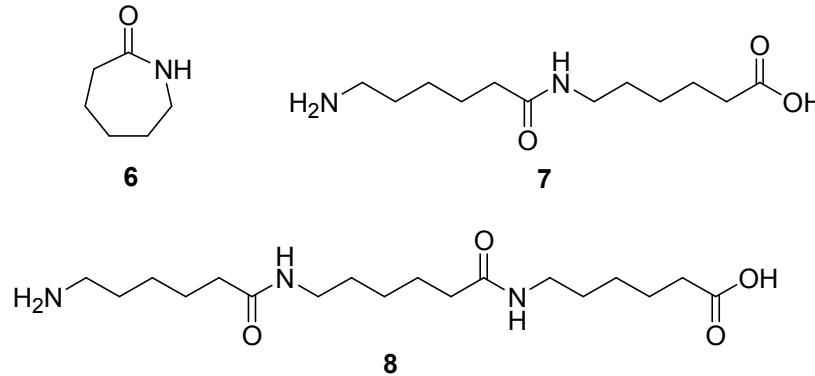
I.2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist die Entwicklung neuer Referenzmaterialien, die in der Stabilisotopenanalytik von NIAS Anwendung finden können. Als Syntheseeziele wurden die in dem Schema 2 und 3 dargestellten Verbindungen ausgesucht. Für die Untersuchungen der Lebensmittelkontaktmaterialien, die mit einer Epoxidharzbeschichtung versehen sind, wurden kurzkettige Reaktionsprodukte von BADGE und BPA als Syntheseeziele ausgesucht, deren Molekülgröße 1000 Da nicht überschreitet. BADGE·BPA (**2**), BADGE·BPA·H₂O (**3**) sowie BADGE·2BPA (**5**) wurden bereits von Simat et al. qualitativ in BPA-basierten Epoxidharzbeschichtungen nachgewiesen.^[12] BADGE·BPA·HCl (**4**) ist gleichermaßen wie BADGE·BPA·H₂O (**3**) ein Abbauprodukt von BADGE·BPA (**2**), die Verbindungen können durch den Kontakt der Beschichtung mit saurem bzw. wässrigem Lebensmittelmedium entstehen.



Schema 2: Oligomere des Epoxidharzes, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert werden sollen: 1: Cyclo-di-BADGE, 2: BADGE·BPA, 3: BADGE·BPA·H₂O 4: BADGE·BPA·HCl, 5: BADGE·2BPA.

Bei den Verbindungen **6** bis **8** (Schema 3) handelt es sich um NIAS aus dem Polyamid-6. Als Syntheseeziele wurden das isotoopenmarkierte Monomer und die linearen Oligomere sowie die zugehörigen Isotoopenstandards ausgesucht, da sie unzureichend untersucht sind.



Schema 3: Ein Monomer und Oligomere des Polyamids-6, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert werden sollen: 6: ϵ -Caprolactam, 7: Di-6-Aminohexansäure, 8: Tri-6-Aminohexansäure.

Generell sollen von jeder Substanzklasse mindestens ein cyclischer und ein linearer Vertreter als Isotoopenstandard synthetisiert werden, um das unterschiedliche chromatographische Verhalten und Ionisierungsverhalten zwischen linearen und cyclischen Oligomeren während einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse zu kompensieren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer SIVA-LC-MS/MS-Methode zum Nachweis der genannten Analyten in Lebensmitteln. Als Untersuchungsgegenstände für epoxidharzhaltige Verpackungen bieten sich Innenbeschichtungen von Dosen und für polyamidhaltige Verpackungen PA/PE-Mehrschichtfolien an. Im Falle von positiven Befunden kann unter Zuhilfenahme von gültigen Grenzwerten abgeleitet werden, inwiefern und für welche Matrices ein gesundheitliches Risiko besteht.

I.3 Ergebnisse

I.3.1 Synthese von Referenzmaterialien für NIAS aus dem Epoxidharz

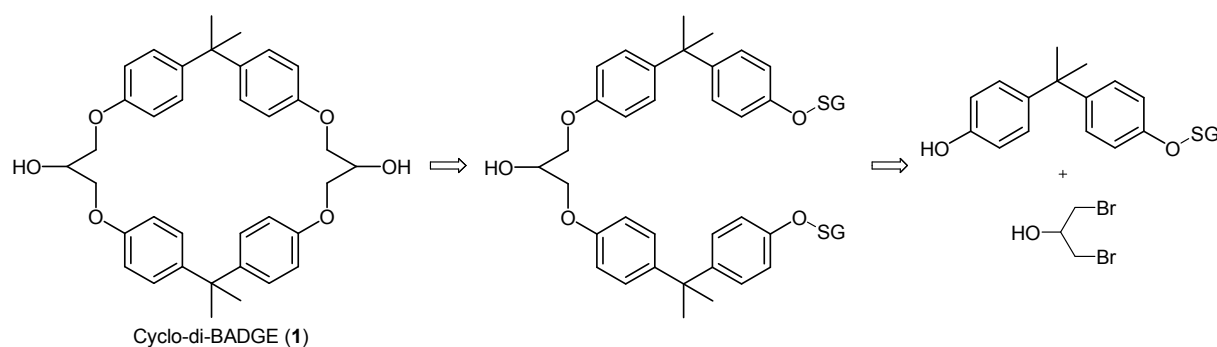
I.3.1.1 Versuche zur Synthese von Cyclo-di-BADGE

Zunächst wurde versucht das Cyclo-di-BADGE aus BADGE und Bisphenol A herzustellen. Das Cyclo-di-BADGE wurde von N. Mittag aus dem Epoxidharz isoliert und mittels NMR-Spektroskopie untersucht.^[28] Dieses Spektrum diente als Referenzspektrum für alle NMR-Untersuchungen der Rohprodukte bzw. alle isolierten Fraktionen.

Das Cyclo-di-BADGE wurde 1968 von Tanaka et al. erstmalig hergestellt^[29] und 2 Jahre später patentiert^[30], das Patent ist bis auf das Abstract nur auf Japanisch verfügbar. Als Reaktionsbedingungen wurden äquimolare Mengen der Edukte, Anwesenheit von Natronlauge und ein großer Überschuss an Methanol genannt, allerdings fehlen in der Literaturvorschrift Angaben zur Konzentration der Natronlauge, der Edukte im Lösungsmittel sowie die Ausbeute.^[2] In dem Abstract des genannten Patents wurden dagegen genauere Reaktionsbedingungen genannt: ein leichter Überschuss von BADGE (1.116 Äquiv.) gegenüber BPA, wenig Natriumhydroxid (0.380 Äquiv.) als 10%ige wässrige Lösung, eine Gesamtmassenkonzentration von BADGE und BPA zwischen 0.02 und 10 in 2-Butanon.

Nach dem Erhitzen der Reaktionslösung für 10 h bei 79 °C und Einengen des 2-Butanons auf das 60-fache des ursprünglichen Volumens sollte beim Abkühlen der Reaktionslösung das Produkt ausfallen. Diese Reaktionsvorschrift wurde angewandt, beim Abkühlen der Reaktionslösung fiel jedoch kein Feststoff aus. Die Reaktionslösung wurde dann eingeeengt, in Natronlauge aufgenommen und mit Dichlormethan extrahiert, um das nicht umgesetzte BPA zu entfernen. Die Dichlormethanextrakte wurden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie in zehn Fraktionen bzw. Mischfraktionen aufgeteilt und mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Die erhaltenen Spektren wurden mit dem NMR-Spektrum aus der Literatur verglichen. Da die Signale der CH_3 -Gruppen bei 1.519 ppm, der CH(OH) -Gruppen zwischen 5.415 und 5.368 ppm sowie der aromatischen Gruppen zwischen 7.243-6.987 ppm und 6.913-6.683 ppm fehlten, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei einer der isolierten Fraktionen um das gewünschte Produkt handelte.

Nach dem Misserfolg das Cyclo-di-BADGE aus BADGE und BPA herzustellen, folgten Versuchsansätze aus anderen Edukten. Das Ziel war die Reaktion kontrollierter führen zu lassen, deswegen sollte bei diesem Ansatz das Cyclo-di-BADGE stufenweise unter Verwendung von Schutzgruppen aufgebaut werden, die Retrosynthese zur geplanten Darstellung von Cyclo-di-BADGE ist in dem Schema 4 gezeigt.



Schema 4: Der geplante retrosynthetische Aufbau von Cyclo-di-BADGE (1) ausgehend von 1,3-Dibrom-2-propanol und monogeschütztem Bisphenol A.

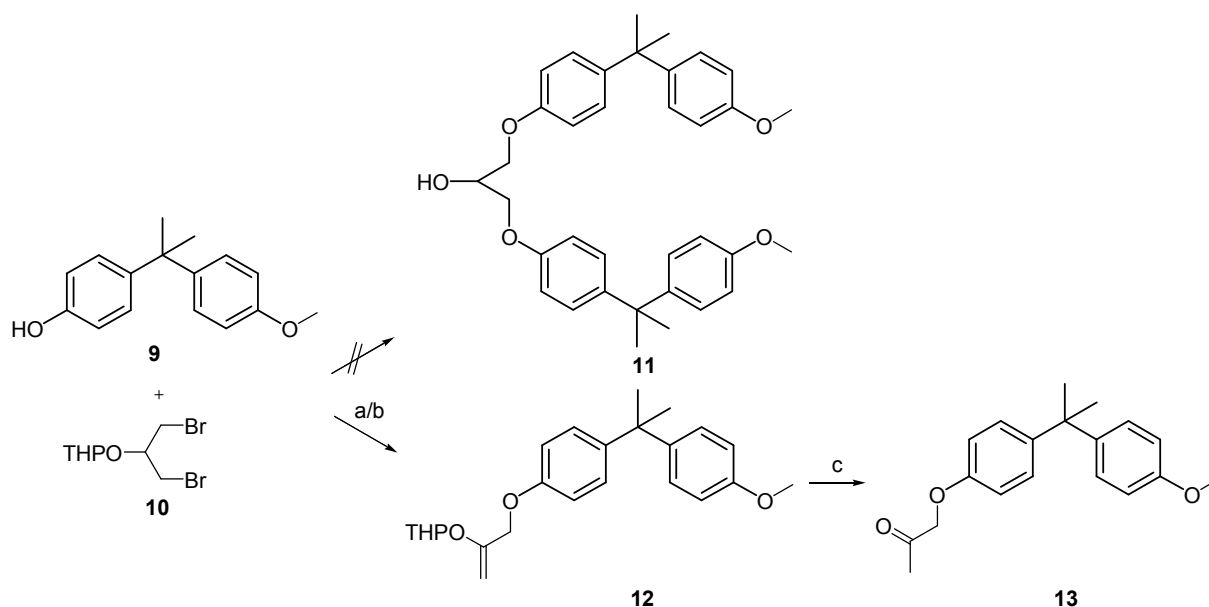
Als Ausgangsverbindungen wurden *tert*-Butyldimethylsilyl-geschütztes Bisphenol A (TBDMS-BPA) und 1,3-Dibrom-2-propanol ausgesucht. Im ersten Schritt soll jeweils ein mono-geschütztes Bisphenol A-Molekül nukleophil an den $\alpha\text{-CH}_2$ -Gruppen zu der Alkoholfunktion des 1,3-Dibrom-2-propanols angreifen. Nach dem Entfernen der Schutzgruppen wäre eine Cyclisierungsreaktion zum Cyclo-di-BADGE mit einem weiteren Äquivalent von 1,3-Dibrom-2-propanol möglich.

Für die Synthese der Ausgangsverbindung, des TBDMS-BPA, wurden Bisphenol A, *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und Imidazol in DMF bei Raumtemperatur nach der Vorschrift von De Meulenaer et al.^[31] zur Reaktion gebracht, dabei wurden 51 % des gewünschten Produktes erhalten. In der nachfolgenden Reaktion wurden 1.0 Äquivalent des TBDMS-BPA und 0.5 Äquivalente des 1,3-Dibrom-2-propanols mit Natriumhydrid als Base in absolutem Tetrahydrofuran für 50 min zum Sieden erhitzt. Nach einer Extraktion in Petroleumbenzin wurde das Rohprodukt eingeeengt und mittels GC-MS untersucht. Es stellte sich heraus, dass sich das 1,3-Dibrom-2-propanol wegen der basischen Reaktionsführung zum Epibromhydrin umgesetzt hat und dieses mit dem monogeschütztem Bisphenol A reagierte.

In einem alternativen Ansatz war der Schutz der Alkoholfunktion im 1,3-Dibrom-2-propanol geplant, so dass diese nicht an der Reaktion teilnehmen kann und beide CH_2 -Gruppen für den nukleophilen Angriff zur Verfügung stehen. Die Alkoholfunktion des 1,3-Dibrom-2-propanols wurde mit einer

Tetrahydropyranylgruppe geschützt. Nach der Extraktion und anschließender säulenchromatographischer Reinigung konnte das 1,3-Dibrom-2-(tetrahydropyran-2-yloxy)propan in einer Ausbeute von 89 % erhalten werden. Das geschützte 1,3-Dibrom-2-propanol wurde mit dem monogeschützten Bisphenol A zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wurde jedoch abgebrochen, da festgestellt wurde, dass sich das TBDMS-Bisphenol A zu Bisphenol A zersetzte und das zu unerwünschten Nebenprodukten führen könnte. Die Labilität der TBDMS-Schutzgruppe trotz basischer Reaktionsführung hängt vermutlich mit der Entstehung von Bromwasserstoff während der Reaktion zusammen.

Wegen der Labilität der TBDMS-Schutzgruppe wurde ein Methylgeschütztes Bisphenol A-Derivat synthetisiert. Das Methylgeschützte BPA (Me-BPA) wurde aus Bisphenol A (1.0 Äquiv.), Methyljodid (0.5 Äquiv.) und Kaliumcarbonat (5.0 Äquiv.) in Aceton nach einer modifizierten Vorschrift von MacKenzie et al.^[32] in einer 21 %iger Ausbeute erhalten. Das Methylgeschützte Bisphenol A wurde mit THP-geschütztem 1,3-Dibrom-2-propanol mit K_2CO_3 als Base in Aceton und NaH als Base in absolutem Tetrahydrofuran zur Reaktion gebracht, die Reaktion ist in dem Schema 5 gezeigt. Die erste Reaktion lieferte nach der säulenchromatographischen Reinigung eine Ausbeute von 11 % und die zweite 80 %, in beiden Fällen bestand das Produkt aus drei Substanzen. Weiterhin war das isolierte Produkt unpolarer als das im Rohprodukt enthaltene Reaktionsprodukt. Die 1H -NMR-spektroskopische Untersuchung des Reaktionsgemisches vor und nach der Aufreinigung ergab die Strukturen des THP-Enolethers **12** im Rohprodukt und des Ketons **13** im isolierten Produkt. Daher wird angenommen, dass das THP-1,3-Dibrom-2-propanol (**10**) von dem Me-BPA (**9**) nukleophil angegriffen wurde und die zweite Bromidgruppe als Bromwasserstoff abgespalten wurde, wobei sich der THP-Enolether **12** bildete. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung konnte sich vermutlich aufgrund der Acidität des Kieselgels unter Abspaltung der THP-Gruppe das Keton **13** gebildet haben.



Schema 5: Die Entstehung des Nebenproduktes **12** bei der Umsetzung von THP-geschütztem 1,3-Dibrom-2-propanol (**10**) mit Methyl-geschütztem Bisphenol A (**9**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) Me-BPA (2.5 Äquiv.), THP-1,3-Dibrom-2-propanol (1.0 Äquiv.), K_2CO_3 (7.5 Äquiv.), Aceton, 11 %; b) Me-BPA (2.5 Äquiv.), THP-1,3-Dibrom-2-propanol (1.0 Äquiv.), NaH (2.5 Äquiv.), abs. THF, 80 %; c) die angenommene Zersetzung nach der säulenchromatographischen Reinigung.

Sowohl das 1,3-Dibrom-2-propanol als auch das THP-geschützte Derivat haben sich als ungeeignet für die Kupplung mit monogeschütztem Bisphenol A erwiesen. Als Nächstes wurde das 1,3-Dichlor-2-

propanon als Ausgangsverbindung ausgewählt, welches ein quartäres anstatt eines tertiären Kohlenstoffatoms aufweist und somit keine Eliminierungsreaktion zum Alken eingehen kann. Die geplante Syntheseroute beinhaltet a) einen Schutz des 1,3-Dichlor-2-propanons als Ketal, b) eine Kupplung mit dem monogeschütztem Me-BPA, c) Entfernung der Methylschutzgruppen, d) eine Cyclisierungsreaktion mit einem weiteren Äquivalent des geschützten 1,3-Dichlor-2-propanons, e) Acetalspaltung unter Zurückbildung der Ketogruppen sowie f) Reduktion der Ketogruppen zu den entsprechenden Alkoholgruppen. Das 1,3-Dichlor-2-propanon als Edukt bietet den Vorteil, dass die letzte Reaktion, die Reduktion mit einem deuteriumhaltigen Reagenz wie Lithiumaluminiumhydrid oder Natriumborhydrid durchgeführt werden kann und ein einfacher Zugang zum isotopenmarkierten Derivat gegeben ist.

Neben TBDMS- und Me-geschütztem Bisphenol A wurde noch der Tetrahydropyranylether von Bisphenol A (THP-BPA) in einer säurevermittelten Reaktion von Bisphenol A mit 3,4-Dihydro-2H-pyran in Diethylether synthetisiert.^[33] Zunächst wurde das 1,3-Dichlor-2-propanon mit Ethylenglykol unter sauren Katalyse nach bekannter Vorschrift von P. Pferfer und K. Bauer^[34] zum 1,3-Dioxolan-Derivat in einer 54 %igen Ausbeute umgesetzt. Nach dem Einführen der Schutzgruppe wurde 2,2-Bis-chloromethyl-[1,3]dioxolan mit THP-BPA unter folgenden Bedingungen umgesetzt: a) THP-BPA (2.1 Äquiv.), 2,2-Bis-chloromethyl-[1,3]dioxolan (1.0 Äquiv.), Kaliumiodid (4.0 Äquiv.), Kaliumcarbonat (6.3 Äquiv.), 18-Krone-6 (0.1 Äquiv.) in Toluol, Rückfluss, 3 d 15 h und b) THP-BPA (1.00 Äquiv.), 2,2-Bis-chloromethyl-[1,3]dioxolan (0.48 Äquiv.), Natriumiodid (1.92 Äquiv.), Kaliumhydroxid (1.00 Äquiv.), 18-Krone-6 (0.10 Äquiv.) in *N,N*-Dimethylformamid/Ethanol (6:1, v/v), 60 °C, 2 d 8 h. Der Kronenether diente der Verbesserung der Löslichkeit des Kaliumsalzes von THP-BPA und Kalium- bzw. Natriumiodid sollte das mäßig reaktive 2,2-Bis-chloromethyl-[1,3]dioxolan in einer Finkelsteinreaktion *in situ* zum Iodid-Derivat umsetzen. Die erste Reaktion lieferte keine Produktbildung und unter den Reaktionsbedingungen der zweiten Reaktion hat sich das THP-BPA zersetzt. Als nächstes wurde versucht das 2,2-Bis-chloromethyl-[1,3]dioxolan in ein reaktiveres Iodid-Derivat umzusetzen und dann in einer Kupplungsreaktion mit dem stabileren Me-BPA einzusetzen. Die Reaktion mit Natriumiodid in Aceton lieferte das 2,2-Bis-iodoomethyl-[1,3]dioxolan in einer 46%igen Ausbeute. Die Reaktion des 2,2-Bis-iodoomethyl-[1,3]dioxolans (1.0 Äquiv.) mit Me-BPA (2.1 Äquiv.) mit Natriumhydrid als Base in absolutem Tetrahydrofuran wurde zunächst für 2 d 19 h bei Raumtemperatur, dann für 25 h bei 40 °C und schließlich für 22 h bei 60 °C gerührt, dabei fand keine Reaktion statt. Von weiteren Versuchen wurde abgesehen.

Nach den Misserfolgen zur Synthese von Cyclo-di-BADGE wurde geplant, zuerst das lineare Dimer, das BADGE·BPA, herzustellen und dieses in Cyclisierungsreaktionen einzusetzen.

1.3.1.2 Synthese von BADGE·BPA und BADGE·2BPA

Die erfolgreiche Syntheseroute von BADGE·BPA (**2**) beinhaltet drei Schritte ausgehend von dem Monomer, dem Bisphenol A: a) eine Einführung einer Schutzgruppe an der Phenolgruppe des Bisphenols A, b) eine Kupplungsreaktion zwischen dem monogeschützten Bisphenol A und BADGE sowie c) eine Entfernung der Schutzgruppe.

Für die Synthese des BADGE·BPA (**2**) sollte im zweiten Syntheseschritt ein monogeschütztes Bisphenol A eingesetzt werden, dafür wurden drei literaturbekannte, bereits synthetisierte, monogeschützte Bisphenol A-Derivate verwendet. Zur Verfügung standen *tert*-Butyldimethylsilyl-geschütztes Bisphenol

A (TBDMS-BPA)^[31], Methyl-geschütztes Bisphenol A (Me-BPA)^[32] und der Tetrahydropyranylether von Bisphenol A (THP-BPA)^[33]. Diese sollten im Kupplungsschritt mit Bisphenol A Diglycidylether (BADGE) getestet werden.

Um zu überprüfen, ob saure oder basische Reaktionsbedingungen für die nukleophile Öffnung des Epoxids besser geeignet sind, wurden mehrere Testreaktionen unter gewählten sauren und basischen Bedingungen im kleinen Maßstab durchgeführt. Als Referenz zur Verfolgung des Reaktionsfortschrittes mittels Dünnschichtchromatographie diente das in einer Testreaktion erhaltene Methyl-geschützte BADGE-BPA, welches nach den in der Tabelle 2, Eintrag 1 genannten Reaktionsbedingungen synthetisiert wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Optimierung des Kupplungsschrittes von Me-BPA (1 Äquiv.) mit BADGE (1 Äquiv.)

Eintrag	Säure/Base/Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur	Reaktionszeit	Ausbeute [%]
1	konz. H ₂ SO ₄ (1 Tropfen)	Dioxan	Rückfluss	1h	[a]
2	NEt ₃ (5 mol%)	Ethanol	Rückfluss	41.5 h	22
3	Pyridin (3 Äquiv.)	Ethanol	Rückfluss	41.5 h	18
4	NaH (1.1 Äquiv.)	abs. THF	Rückfluss	4.5 d	45
5	DMAP (10 mol%)	Toluol	2d bei 80 °C, 3d bei 100 °C	5 d	9
6	BF ₃ Et ₂ O (1.1 Äquiv.)	abs. THF	RT	1.5 h	[b]

[a] Das BADGE hat sich zersetzt. [b] Es bildete sich ein Polymer.

Die Reaktionsansätze wurden unter den in der Tabelle 1 genannten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Ansätze 1 und 6 wurden nach der genannten Reaktionszeit abgebrochen und nicht weiter aufgereinigt, da es zu keiner Produktbildung kam. Die Ansätze 2 bis 5 wurden am Rotationsverdampfer eingengt und von dem erhaltenen Rückstand eine methanolische Stammlösung angesetzt. Jeweils ein Viertel der Lösung wurde auf einer präparativen DC gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1), die Produktfraktion abgetrennt und ausgewogen. Beim Ansatz 1 hat sich das BADGE zersetzt und es konnte zu keiner Produktbildung kommen, deswegen wurden keine weiteren Versuche zur Kupplung von BADGE und monogeschütztem BPA unter sauren Reaktionsbedingungen durchgeführt. Beim Ansatz 6 hat eines der Edukte mit Tetrahydrofuran zum Polymer reagiert, das gummiartige Produkt war unlöslich in den meisten organischen Lösungsmitteln und wurde nicht weiter behandelt. Von den Ansätzen 2 bis 5 lieferten die Ansätze mit Natriumhydrid und Pyridin die besten Ausbeuten. Da bei dem Ansatz mit Pyridin als Base ein sehr komplexes Reaktionsgemisch entstand und eine Aufreinigung von größeren Ansatzgrößen mittels Säulenchromatographie schwieriger als bei den anderen Ansätzen wäre, wurde auch diese Kupplungsmöglichkeit verworfen und weitere basische Bedingungen getestet (siehe Tabelle 2).

In weiteren Versuchen wurde zunächst getestet, welches der monogeschützten Bisphenol A-Derivate die besten Ausbeuten liefert. Bei der Kupplung von TBDMS-BPA mit BADGE zersetzte sich das TBDMS-BPA wieder zu Bisphenol A, welches zu ungewünschten Nebenprodukten und Polymerisation führte, das erschwerte die Produktaufreinigung, so dass das Produkt nicht isoliert werden konnte. Vergleicht man die Einträge 1, 2 und 3 aus der Tabelle 2, so fällt auf, dass bei dem THP- und Me-geschützten Bisphenol A die besten Resultate erzielt werden konnten. Da für die Entschützung von THP-BADGE-BPA (**15**) eine sehr gute Methode gefunden wurde, wurden weitere Reaktionen mit THP-BPA (**14**) als Edukt durchgeführt. In den Einträgen 3, 4 und 5 wurden die eingesetzten Basen variiert, es stellte sich heraus, dass die Verwendung von Kaliumcarbonat die besten Ausbeuten liefert. Die Reaktionsbedingungen,

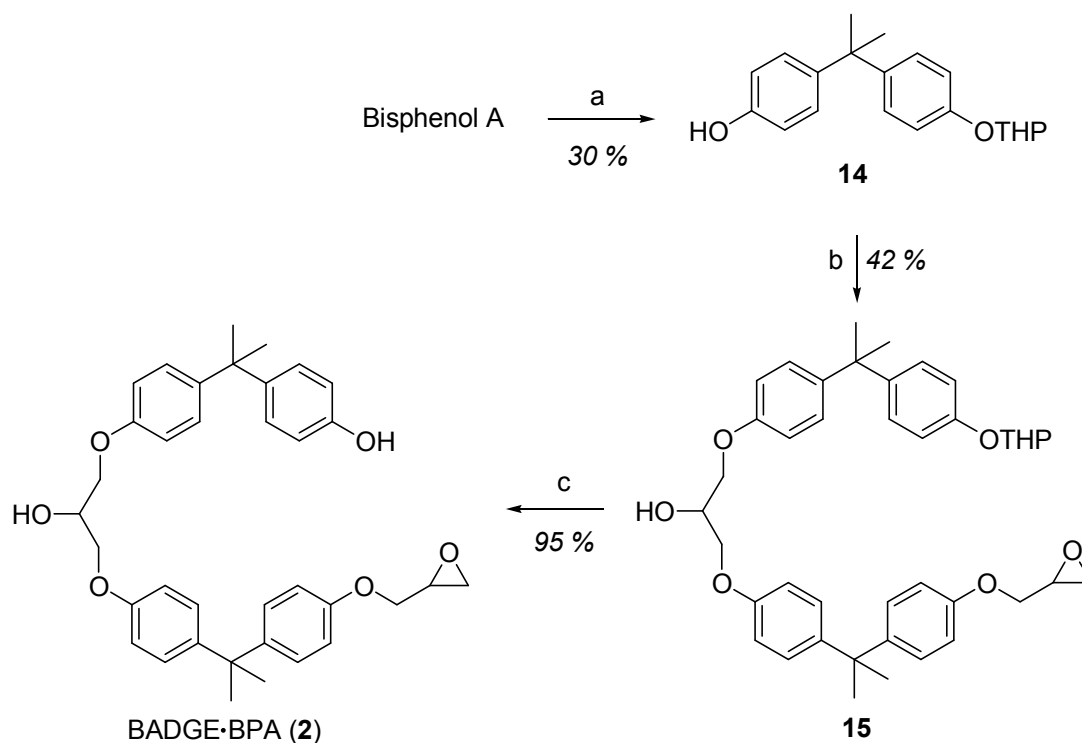
die die besten Ergebnisse lieferten, wurden auf die Kupplung zwischen BADGE und THP-BPA (**14**) zum THP-BADGE-2BPA (**16**) übertragen. Beide Kupplungsreaktionen funktionierten besser mit K_2CO_3 in abs. Aceton als mit NaH in abs. THF und wurden für die Synthese von BADGE-BPA (**2**) und BADGE-2BPA (**5**) verwendet.

Tabelle 2: Optimierung des Kupplungsschrittes von diversen monogeschützten Bisphenol A-Derivaten mit BADGE. Bei jeder Reaktion wurde 1 Äquivalent von BADGE eingesetzt.

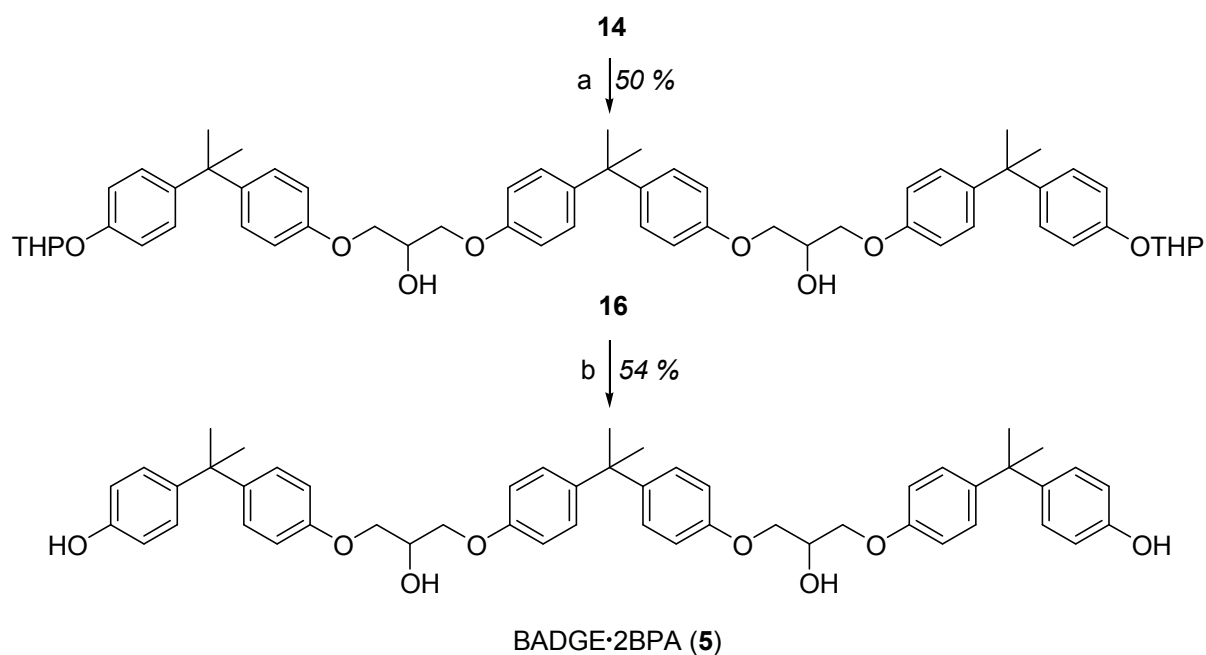
Eintrag	Edukt	Base	Lösungsmittel	Reaktionszeit	Ausbeute [%]
Reaktionen zum geschützten BADGE-BPA					
1	Me-BPA (1 Äquiv.)	K_2CO_3 (3 Äquiv.)	abs. Aceton	1 d	25
2	TBDMS-BPA (1 Äquiv.)	K_2CO_3 (3 Äquiv.)	Aceton	1 d	[a]
3	THP-BPA (1 Äquiv.)	K_2CO_3 (3 Äquiv.)	abs. Aceton	4.5 d	42
4	THP-BPA (1 Äquiv.)	DBU (3 Äquiv.)	THF	3 d	[a]
5	THP-BPA (1 Äquiv.)	NaH (1.1 Äquiv.)	abs. THF	4 d	32
Reaktionen zum geschützten BADGE-2BPA					
6	THP-BPA (4 Äquiv.)	NaH (4.4 Äquiv.)	abs. THF	4 d	28
7	THP-BPA (4 Äquiv.)	K_2CO_3 (12 Äquiv.)	abs. Aceton	4.5 d	50

[a] kaum Produktbildung.

Um die Entfernung der THP-Schutzgruppe zu optimieren wurden drei Vorversuche in kleinem Maßstab durchgeführt und der Reaktionsfortschritt mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Zur Überprüfung der Stabilität der Epoxidfunktion wurde das BADGE, welches zwei Epoxidgruppen enthält, mit dem getesteten Reagenz versetzt. Zur Überprüfung der Entfernung der THP-Gruppe wurde das THP-BPA (**14**) eingesetzt. Als Reagenzien wurden $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ in Methanol^[35], Montmorillonit K-10 in Methanol und das Montmorillonit K-10 in Aceton/Wasser (95:5, v/v) eingesetzt.^[36] Alle Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion mit Montmorillonit K-10 wurde ausgesucht, weil die Autoren von der Beibehaltung der Epoxidfunktion bei der Entfernung der THP-Gruppe berichtet haben.^[36] Die Zersetzung von BADGE trat bei allen Vorversuchen ein, diese war bei der Verwendung von $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ am stärksten ausgeprägt. Die Entschützung verlief am schnellsten bei der Verwendung von Montmorillonit K-10 in Methanol, so dass die beiden Versuche mit Montmorillonit K-10 in Methanol und in Aceton/Wasser (95:5, v/v) bei Raumtemperatur mit dem geschützten THP-Dimer **15** wiederholt wurden, um die Ausbeuten zu bestimmen. Die Reaktion in Aceton/Wasser (95:5, v/v) lieferte nach 3.5 h keinen vollständigen Umsatz und nur eine 16 %ige Ausbeute. Die Reaktion in Methanol war nach 15 min vollständig und es konnten 95 % des gewünschten Produktes **2** isoliert werden. Die Syntheseroute zum BADGE-BPA (**2**) ist im Schema 6 dargestellt.



Schema 6: Der Syntheseweg zum BADGE·BPA (**2**) ausgehend von Bisphenol A. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) DHP (1 Äquiv.), kat. HCl, Et₂O, 0 °C → RT; b) THP-BPA **14** (1 Äquiv.), K₂CO₃ (3 Äquiv.), abs. Aceton, Rückfluss, 4.5 d; c) Montmorillonit K-10, MeOH, RT, 15 min.



Schema 7: Der Syntheseweg zum BADGE·2BPA (**5**) ausgehend von Bisphenol A. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) BADGE (0.25 Äquiv.), K₂CO₃ (3 Äquiv.), abs. Aceton, Rückfluss, 4.5 d; b) Montmorillonit K-10, MeOH/EtOAc (1:1, v/v), RT, 5 h.

Zusammenfassend konnten die besten Resultate mit dem Tetrahydropyranyl- und Methyl-geschützten Bisphenol A (THP-BPA und Me-BPA) erzielt werden. Bei der Kupplungsreaktion wurde unter sauren und basischen Bedingungen gearbeitet, die besten Ausbeuten wurden unter Verwendung von Kaliumcarbonat in absolutem Aceton erzielt. Einen kritischen Schritt dieser Syntheseroute stellte die Entfernung der Schutzgruppe im letzten Syntheseschritt dar, weil THP-BADGE·BPA (**15**) eine säure- und

basenlabile Gruppe, ein Epoxid, enthält. Die Entfernung der THP-Gruppe mit einem schwachsauren Schichtsilikat, dem Montmorillonit K-10, konnte erfolgreich durchgeführt werden, ohne dass das Epoxid geöffnet wurde.^[36] Die erzielte Gesamtausbeute der Synthese von BADGE-BPA (**2**) lag bei 12 %. Die Modifizierung der Reaktionsbedingungen in dem Kupplungsschritt und bei der Entfernung der Tetrahydropyranylgruppe ermöglichte den Zugang zum BADGE-2BPA (**5**), die Syntheseroute ist im Schema 7 zusammengestellt.

Die Synthese von BADGE-2BPA (**5**) wurde analog zu der von BADGE-BPA (**2**) durchgeführt, mit der Ausnahme, dass bei der nukleophilen Substitution das THP-BPA (**14**) im Überschuss (4 Äquiv.) eingesetzt wurde. Weiterhin musste wegen zwei reagierenden Gruppen im Molekül die Menge des eingesetzten Montmorillonits K-10 verdoppelt werden und die Reaktionszeiten sind länger ausgefallen. Zwecks Löslichkeitserhöhung wurde bei der Entschützung eine Mischung von EtOAc/MeOH = 1:1 (v/v) verwendet. Die geringere Ausbeute trotz einer Reaktionsführung zum vollständigen Umsatz lässt sich damit erklären, dass sich das Produkt bei einer säulenchromatographischen Reinigung auf der leicht sauren Silikagelphase zum Teil zersetzt hat. Das lineare Trimer **5** wurde in einer Gesamtausbeute von 8 % erhalten.

I.3.1.3 *Syntheseversuche von Cyclo-di-BADGE ausgehend von BADGE und Bisphenol A – Cyclisierungsversuche*

Nach den Misserfolgen zur Synthese von Cyclo-di-BADGE (siehe Abschnitt I.3.1.1.) wurde versucht das cyclische Dimer aus einer linearen Vorstufe, dem BADGE-BPA, herzustellen. Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die getesteten Reaktionsbedingungen in der Kupplungsreaktion.

Tabelle 3: Übersicht über die durchgeführten Versuche zur Cyclisierung von BADGE-BPA zum Cyclo-di-BADGE

Eintrag	Base	Lösungsmittel	Temperatur	Reaktionszeit	Konzentration von BADGE-BPA [mol/l]
1	NaH (1.1 Äquiv.)	abs. EtOH	Rückfluss	5 d 15 h	$1.00 \cdot 10^{-2}$
2	K ₂ CO ₃ (3.0 Äquiv.)	Aceton	Rückfluss	3 d 17 h	$1.00 \cdot 10^{-3}$
3	K ₂ CO ₃ (3.0 Äquiv.)	Aceton	Rückfluss	3 d 17 h	$1.00 \cdot 10^{-4}$
4	NaH (2.0 Äquiv.)	abs. THF	Rückfluss	5 d	$1.02 \cdot 10^{-4[a]}$
5	NaH (1.1 Äquiv.)	abs. EtOH	Rückfluss	3 d 15 h	$1.00 \cdot 10^{-4[b]}$
6	Cs ₂ CO ₃ (3.0 Äquiv.)	Benzol	Rückfluss	3 d	$1.20 \cdot 10^{-4[c]}$

Das BADGE-BPA wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe innerhalb von [a] 35 min/[b] 2 d/[c] 3 d zugegeben.

Die in der Tabelle 3 vorgestellten Ansätze zur Umsetzung von BADGE-BPA zum Cyclo-di-BADGE erfolgten in Anlehnung an bereits bekannte Strategien, die die Bildung des linearen Polymers zurückdrängen und des cyclischen begünstigen sollen.^[37] Bei der Umsetzung von BADGE-BPA handelt es sich um eine heterodifunktionale, unimolekulare Kupplung, d.h. dass sich an beiden Enden eines Moleküls zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen befinden, die miteinander reagieren können. Der Vorteil dieser Methode gegenüber früheren Ansätzen (vgl. Abschnitt I.3.1.1) liegt darin, dass hier eine ausreichend geringe Endkonzentration des Edukts vorliegen muss, damit die Reaktion intra- und nicht intermolekular abläuft. Bei den früheren Ansätzen musste zuerst eine inter- und dann eine intramolekulare Reaktion stattfinden, das ist insofern problematisch, als dass beide Reaktionen in Konkurrenz stehen. Man kann die Reaktion in Richtung Kupplung zweier Moleküle (intermolekular) lenken, wenn die Konzentration der Edukte hoch ist oder in Richtung Cyclisierung (intramolekular) lenken, wenn die Konzentration gering ist. Folgend diesem Prinzip wurden verschiedene

Reaktionsbedingungen angewandt, bei denen die Konzentration des Edukts jeweils um eine Zehnerpotenz erniedrigt wurde (Einträge 1 bis 3). Um eine noch höhere Verdünnung zu erreichen wurde unter Bedingungen einer „pseudo hohen Verdünnung“ gearbeitet, dabei wurde das Edukt als Lösung aus einer Spritzenpumpe über einen Zeitraum von 35 min (Eintrag 4), 2 d (Eintrag 5) und 3 d (Eintrag 6) in den Reaktionskolben gegeben. Bei allen Versuchen wurden mittels säulenchromatographie und/oder präparativer Dünnschichtchromatographie zwischen drei und neun Fraktionen bzw. Mischfraktionen isoliert und diese mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Die so erhaltenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden mit dem Spektrum aus der Literatur^[28] verglichen, jedoch konnte in keiner der isolierten Fraktionen bzw. Mischfraktionen Cyclo-di-BADGE nachgewiesen werden. Die Versuche zeigten, dass es sich als nicht möglich erwiesen hat, in den zahlreichen niedermolekularen Polymerisationsprodukten das gewünschte Produkt zu finden und zu isolieren, deswegen wurde von weiteren Versuchen abgesehen.

1.3.1.4 Synthese von isotopenmarkiertem BADGE·BPA und BADGE·2BPA

Synthese von BADGE·BPA- d_1

Die Synthese von BADGE·BPA- d_1 (**19**) gelang in fünf Schritten ausgehend von Bisphenol A, also nur in zwei Schritten mehr als die der nicht markierten Verbindung. Die geplante Syntheseroute beinhaltete a) die Einführung einer Schutzgruppe an Phenolgruppe des Bisphenols A, b) eine Kupplungsreaktion von dem monogeschütztem Bisphenol A mit BADGE, c) eine Oxidation des sekundären Alkohols zum Keton, d) eine Entfernung der Schutzgruppe und e) eine Reduktion des Ketons mit einem Deuteriumhaltigen Reduktionsmittel zum sekundären Alkohol.

Als Ausgangsverbindung wurde das Syntheseprodukt **15** aus BADGE und dem monogeschützten BPA verwendet, dabei handelt es sich gleichzeitig um die Vorstufe zum BADGE·BPA (siehe Schema 6). Als erstes wurde die Oxidation des sekundären Alkohols optimiert. Die ersten Ansätze wurden mit 2-Iodobenzoesäure (kurz IBX) nach einer Vorschrift von More und Finney^[38] durchgeführt. Bei den Vorversuchen wurde die Menge von IBX bestimmt, es wurden 1, 2 und 3 Äquivalente zugegeben und die Produktbildung mittels DC verfolgt. Die besten Umsätze konnten mit 2 Äquivalenten IBX erreicht werden. Die Reaktion lieferte mäßig gute und nicht reproduzierbare Ausbeuten, das lag an dem komplexen Reaktionsgemisch und folglich einer erschwerten Aufarbeitung. Die Rohprodukte mussten bis zu drei Mal säulenchromatographisch gereinigt werden, um eine akzeptable Reinheit zu erzielen. Aufgrund der aufwendigen Aufarbeitung wurde von weiteren Versuchen abgesehen. Die Menge des isolierten Produktes reichte jedoch aus, um die Identität mittels NMR-Spektroskopie zu bestätigen. Es folgten weitere Versuche mit anderen gängigen Oxidationsreagenzien, die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Die Reaktion wurde unter Bedingungen einer Swern-Oxidation mit Oxalylchlorid, Dimethylsulfoxid und Triethylamin (Eintrag 2) und einer Omura-Sharma-Swern Oxidation mit Trifluoressigsäureanhydrid, Dimethylsulfoxid und Triethylamin (Eintrag 3) durchgeführt. Beide Reaktionen erforderten Badtemperaturen von etwa $-78\text{ }^\circ\text{C}$, um das aktivierte Dimethylsulfoxid zu erzeugen, die Kältebäder bestanden aus einem Gemisch von flüssigem Stickstoff und Isopropanol. Laut DC konnte in beiden Reaktionen kein Umsatz festgestellt werden. Da es sich hier um Mehrkomponentenreaktionen handelte und nicht klar war, ob der Misserfolg auf das Substrat oder auf die verwendeten Reagenzien zurückzuführen ist, wurde auch hier von weiteren Versuchen abgesehen.

Der Einsatz von Pyridiniumchlorochromat (kurz PCC, auch Corey-Reagenz genannt) lieferte ein Produkt, welches eine höhere Polarität als das Edukt zeigte (Eintrag 4). Es konnte sich also nicht um das gewünschte Produkt handeln, da die Umwandlung einer Alkohol- in eine Ketogruppe die Polarität der Verbindung senken müsste. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte, dass in der entstandenen Verbindung die Signale der Epoxidgruppe fehlen, es kam folglich zu einer Epoxidöffnung.

Tabelle 4: Die getesteten Reaktionsbedingungen für die Oxidation von Kupplungsprodukt **15**

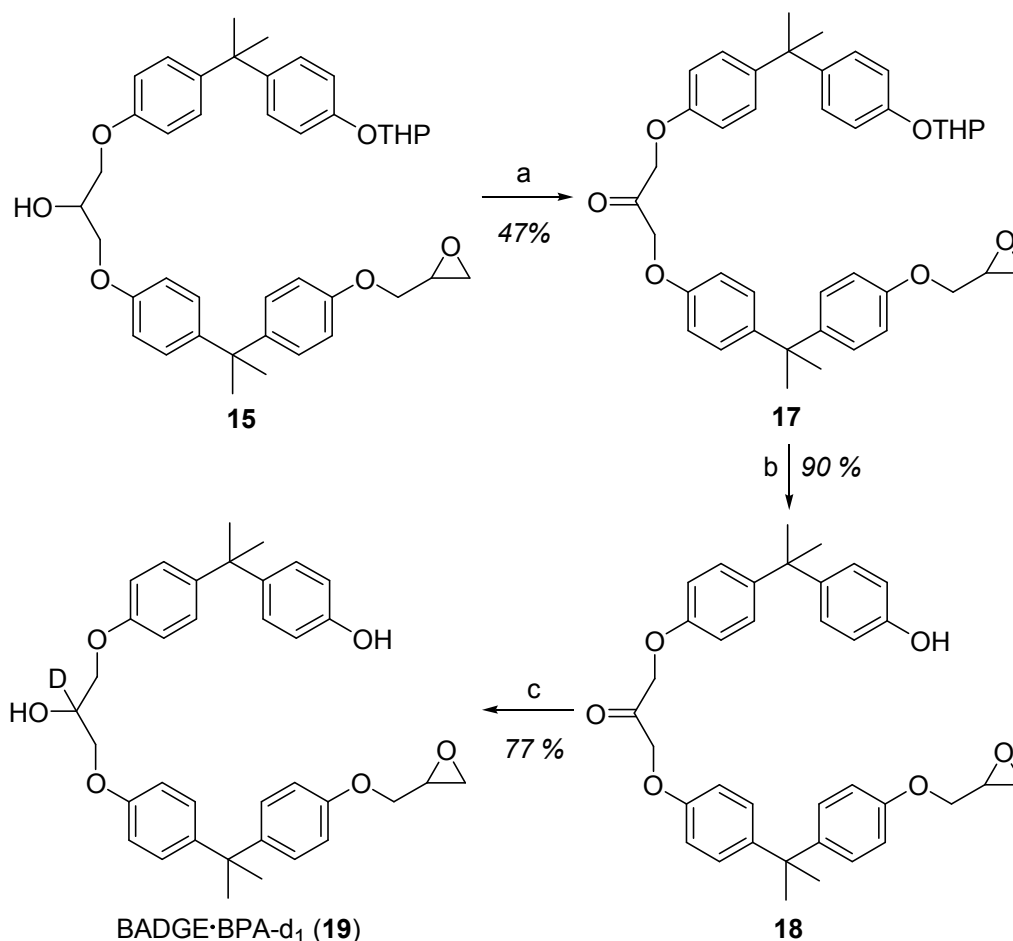
Eintrag	Reagenz/ Additiv	Menge [Äquiv.]	Lösungs- mittel	Reaktions- temperatur [°C]	Reaktions- zeit	Ausbeute [%]	Lit.
1	IBX	2.00	EtOAc	80	3 h	17–30 ^[a]	[38]
2	(ClCO) ₂	1.50	-	-78 → 0	45 min	[b]	[39]
	DMSO	3.00					
3	NEt ₃	4.50	abs. CH ₂ Cl ₂	-60–(-67) → 0	50 min	[b]	[40]
	TFAA	1.50					
	DMSO	2.00					
4	NEt ₃	2.90	abs. CH ₂ Cl ₂	RT	22 h	[c]	[41]
	PCC	1.50					
	NaOAc	0.30					
5	PDC	1.50	abs. CH ₂ Cl ₂	RT	5 d	[d]	[42]
6	PDC	6.00	abs. CH ₂ Cl ₂	RT	2 d	[d]	-
7	PDC	1.50	abs. CH ₂ Cl ₂	RT	5 h	47	[43]
	AcOH	1.74					
	Molsieb	800 mg/ 3 Å					
		1 mmol					

[a] komplexes Reaktionsgemisch; [b] kein Umsatz; [c] Nebenproduktbildung; [d] kein vollständiger Umsatz.

Der nächste Testansatz erfolgte mit Pyridiniumdichromat (kurz PDC, auch Cornforth-Reagenz genannt) als Oxidationsmittel (Eintrag 5). Da die Reaktion mit 1.5 Äquivalenten von PDC nach fünf Tagen immer noch nicht vollständig war, wurde die Menge an Reagenz auf 6.0 Äquivalente erhöht (Eintrag 6). Obwohl die Erhöhung der Menge von PDC ebenfalls nicht zu einem höheren Umsatz führte, war das Reaktionsgemisch nicht so komplex wie im Falle der Reaktion mit IBX, so dass dieser Ansatz weiter optimiert wurde. Die Gruppe von S. Czernecki befasste sich mit dem Problem der unvollständigen und nicht effizienten Oxidationen von Alkoholen zu Ketonen mit PDC und fand heraus, dass eine Zugabe kleiner Mengen wasserfreier Essigsäure sowie von frisch aktiviertem Molsieb zu kürzeren Reaktionszeiten führt und geringere Mengen an Oxidationsmittel erfordert.^[43] Die Verwendung dieser Reaktionsbedingungen bei der Oxidation von Kupplungsprodukt **15** (Eintrag 7) lieferte nach einer Reaktionszeit von fünf Stunden das Oxidationsprodukt **17** in einer akzeptablen Ausbeute von 47 %.

Im nächsten Schritt wurde die Tetrahydropyranyl (THP)-Schutzgruppe, die für den Kupplungsschritt notwendig war, entfernt. Hierfür wurden Reaktionsbedingungen angewandt, die sich bereits bei der Entschützung im letzten Schritt der BADGE-BPA-Synthese bewährt haben, nämlich mit dem schwach sauren Tonmineral Montmorillonit K-10 (pH 3–4) in Methanol^[36]. Es musste lediglich die Reaktionszeit auf 42 min erhöht werden, das Produkt **18** konnte nach dem Abfiltrieren von Montmorillonit K-10 in einer 90 %-igen Ausbeute erhalten werden. Im letzten Schritt wurde in einer Reduktionsreaktion mit Natriumbordeuterid ein Deuteriumatom eingebracht und somit die Alkoholfunktion wiederhergestellt werden. Die Reduktionsreaktion wurde zunächst bei Raumtemperatur^[44] durchgeführt, das führte jedoch zu einem Nebenprodukt, welches über sehr ähnliche chromatographische Eigenschaften wie das Produkt verfügte und sich somit sehr schwer entfernen ließ. Der Zusatz von Tetrahydrofuran zur

ethanolischen Lösung des Eduktes verbesserte die Löslichkeit bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und verkürzte die Reaktionszeit von zwei auf eineinhalb Stunden. Die Durchführung der Reaktion bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ reduzierte die Bildung von unerwünschtem Nebenprodukt, so dass sich die Zielverbindung **19** in einer Ausbeute von 77 % isolieren ließ. Das BADGE-BPA- d_1 konnte ausgehend von Bisphenol A in einer Gesamtausbeute von 4 % erhalten werden (siehe Schema 8).

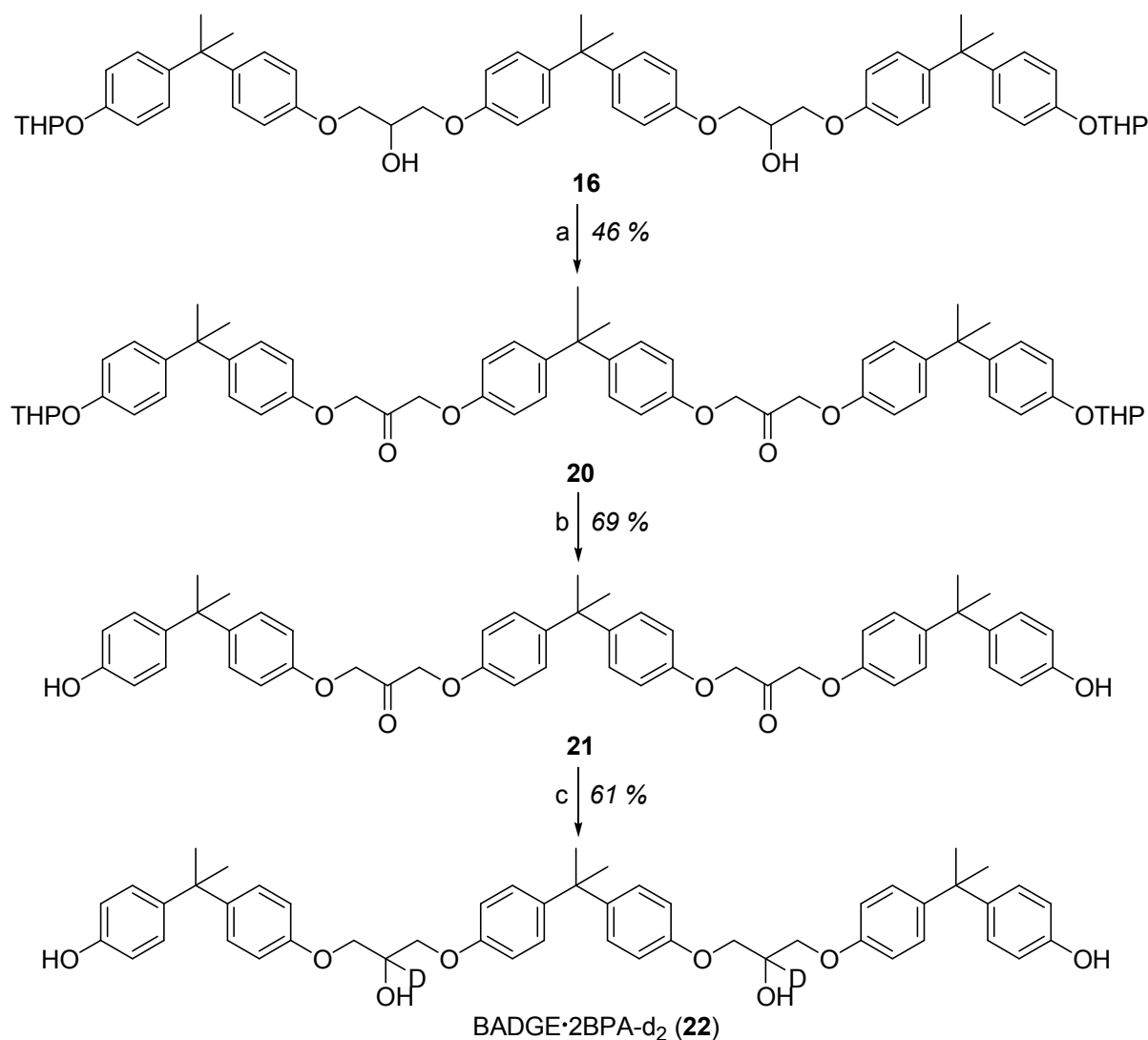


Schema 8: Der Syntheseweg von BADGE-BPA- d_1 (**19**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) PDC (1.50 Äquiv.), AcOH (1.74 Äquiv.), Molsieb 3 Å (800 mg/1 mmol), abs. CH_2Cl_2 , RT, 5 h; b) Montmorillonit K-10, MeOH, RT, 42 min; c) NaBD_4 (2 Äquiv.), EtOH/THF (8:1, v/v), $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1.5 h.

Synthese von BADGE-2BPA- d_2

Für die Synthese von BADGE-2BPA- d_2 (**22**) wurde das THP-geschützte BADGE-2BPA (**16**) verwendet, wobei es sich hier um eine Zwischenstufe zur Synthese von BADGE-2BPA handelt (siehe Schema 7). Ähnlich wie bei der Synthese von BADGE-BPA- d_1 (**19**) besteht die Reaktionsfolge aus einem Oxidations-, Entschützungs- und Reduktionsschritt (siehe Schema 8). Im Oxidationsschritt wurden mit Ausnahme der Menge von Pyridiniumdichromat dieselben Reaktionsbedingungen wie bei der Synthese von BADGE-BPA- d_1 angewandt. Da im Edukt zwei Alkoholgruppen oxidiert werden mussten, wurde die doppelte Menge an Oxidationsmittel eingesetzt, die Reaktionsdauer hat sich ebenfalls erhöht. Das Produkt **20** konnte nach einer Reaktionszeit von 24 h in einer Ausbeute von 46 % erhalten werden. Die Entschützung der Verbindung **20** erfolgte in Ethylacetat und Methanol im Volumenverhältnis von zwei zu eins, da das Edukt in reinem Methanol nicht löslich war. Weiterhin

wurde eine doppelte Menge an Reagenz verwendet, um die Reaktion zu beschleunigen. Nach einer Reaktionszeit von 6 h konnte das Produkt **21** in einer 69 %-igen Ausbeute erhalten werden. Die Reduktion der beiden Ketogruppen in der Verbindung **21** wurde mittels Natriumbordeuterid erreicht, wobei vier anstatt von zwei Äquivalenten des Reduktionsmittels eingesetzt wurden. In den Vorversuchen wurde getestet, welche Reaktionstemperatur, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, besser geeignet ist. Da die Reaktionstemperatur keinen Einfluss auf die Reaktionsausbeute hatte, wurde wegen einfacherer Durchführbarkeit die Variante bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgesucht. Die Ausbeute an BADGE-2BPA- d_2 betrug 61 %, damit ergab sich ausgehend von Bisphenol A eine Gesamtausbeute von 3 %, die Synthese ist in dem Schema 9 dargestellt.

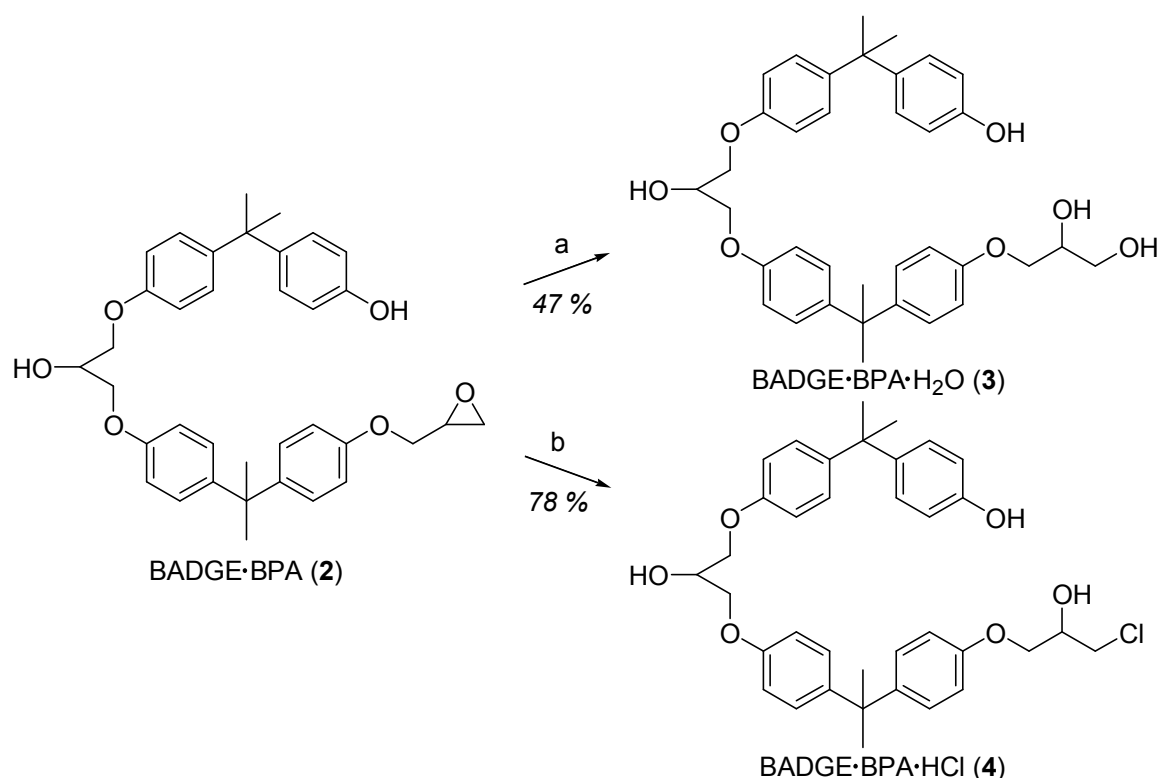


Schema 9: Der Syntheseweg von BADGE-2BPA- d_2 (**22**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) PDC (3.00 Äquiv.), AcOH (1.79 Äquiv.), Molsieb 3 Å (800 mg/1 mmol), abs. CH_2Cl_2 , RT, 24 h; b) Montmorillonit K-10, EtOAc/MeOH (2:1, v/v), RT, 6 h; c) NaBD_4 (4 Äquiv.), THF/EtOH (3:1, v/v), $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min.

I.3.1.5 Synthese von weiteren Referenzmaterialien mit BADGE·BPA-Grundgerüst sowie isotopenmarkierten Derivaten

Synthese von BADGE·BPA·H₂O und BADGE·BPA·HCl

Die Synthese des Hydrolyse- und Hydrochloridproduktes ist in dem Schema 10 dargestellt, sie gelang mittels einer nukleophilen Öffnung des Epoxids mit den entsprechenden Reagenzien. Die Synthese des Hydrolyseproduktes von BADGE·BPA (**3**) gelang nach einer Synthesevorschrift von H. Petersen, die zur partiellen Hydrolyse von BADGE zum BADGE·H₂O diente.^[45] Das BADGE·BPA (**2**) wurde in einem Aceton/Wasser-Gemisch gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure versetzt und bei Raumtemperatur zum vollständigen Umsatz reagieren lassen. Die Reaktion lieferte zwei Produkte, deswegen ließ sich das Produkt **3** in einer Ausbeute von lediglich 47 % isolieren. Das Hydrochloridprodukt **4** wurde in einer Reaktion mit Cer(III)-chlorid-Heptahydrat unter Rückflussbedingungen erhalten, auch hier wurde eine Vorschrift angewandt, die sich bei der partiellen Addition von Chlorwasserstoff an BADGE bewährte.^[46] Bei dieser Umsetzung sind ebenfalls zwei Produkte entstanden, wobei die R_F-Werte von Edukt und Produkt nur um 0.05 auseinanderlagen. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung wurden 78 % des BADGE·BPA·HCl (**4**) isoliert.

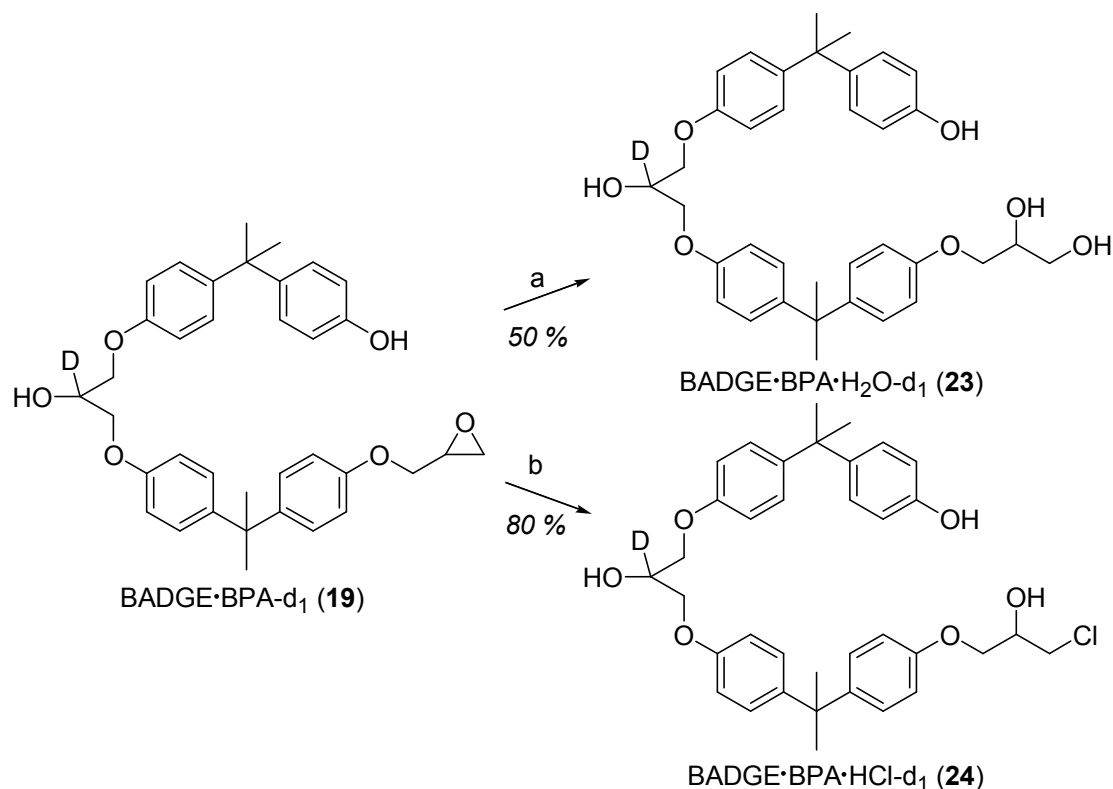


Schema 10: Der Syntheseweg zum H₂O- und HCl-Addukt von BADGE·BPA. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 2 M H₂SO₄, Aceton/H₂O (5:1, v/v), RT, 26 h; b) CeCl₃·7H₂O (1 Äquiv.), MeCN, Rückfluss, 23.5 h.

Synthese von BADGE·BPA·H₂O-d₁ und BADGE·BPA·HCl-d₁

Das Produkt **19** diente als Ausgangsverbindung für die Synthese von zwei weiteren isotopenmarkierten Standards, nämlich des BADGE·BPA·H₂O-d₁ (**23**) und des BADGE·BPA·HCl-d₁ (**24**) (siehe Schema 11). Das BADGE·BPA·H₂O-d₁ wurde analog zu der nicht markierten Verbindung **3** mittels einer nukleophilen Öffnung des Epoxids im sauren Milieu in Anlehnung an die Vorschrift von H. Petersen^[45] hergestellt.

Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung konnte das Produkt **23** in einer Ausbeute von 50 % erhalten werden, zum Vergleich wurde bei der nicht markierten Verbindung eine Ausbeute von 47 % erzielt. Die Verbindung **24** wurde in einer nukleophilen Öffnung des Epoxids mit Cer(III)-chlorid-Heptahydrat ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) als Chlorid-Quelle^[46] hergestellt, das Hydrochlorid wurde in einer Ausbeute von 80 % erhalten. Wie bei der Verbindung **23** wurden Reaktionsbedingungen aus der Literatur angewandt, wobei diese ursprünglich für die Synthese von BADGE·H₂O bzw. BADGE·HCl entwickelt wurden. Zum Vergleich betrug die Ausbeute bei der nicht markierten Verbindung **4** 78 %, so dass im Falle beider Synthesen eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt wurde. Die Gesamtausbeuten lagen bei 2 % für BADGE·BPA·H₂O-d₁ und bei 3 % für BADGE·BPA·HCl-d₁.



Schema 11: Der Syntheseweg von BADGE·BPA·H₂O-d₁ (**23**) und BADGE·BPA·HCl-d₁ (**24**) ausgehend von BADGE·BPA-d₁ (**19**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 2 M H₂SO₄, Aceton/H₂O (5:1, v/v), RT, 23.5 h; b) CeCl₃·7H₂O (1 Äquiv.), MeCN, Rückfluss, 23.5 h.

I.3.2 Synthese von Referenzmaterialien für NIAS aus dem Polyamid-6

I.3.2.1 Synthese von isotopenmarkiertem ε-Caprolactam

Synthese von ε-Caprolactam-d₁

Das ε-Caprolactam-d₁ sollte nach einer bekannten Syntheseroute hergestellt werden. Die Idee war, die Zielverbindung ausgehend von 5-Hexensäure in drei Schritten herzustellen. Die 5-Hexensäure sollte zunächst aktiviert werden, indem sie in ein Säurechlorid überführt wird und mit flüssigem Ammoniak zum Hex-5-enamid umgesetzt werden.^[47] Im nächsten Schritt sollte unter Bildung von *N*-(Phenylthio)hex-5-enamid eine Fluchtgruppe für die anschließende radikalische Reaktion eingeführt werden.^[19] Die Cyclisierung von *N*-(Phenylthio)hex-5-enamid sollte laut Literatur zwei Produkte liefern, das 6-exo-Produkt und das 7-endo-Produkt, also die Zielverbindung. Da die Bildung von 7-Ringen laut

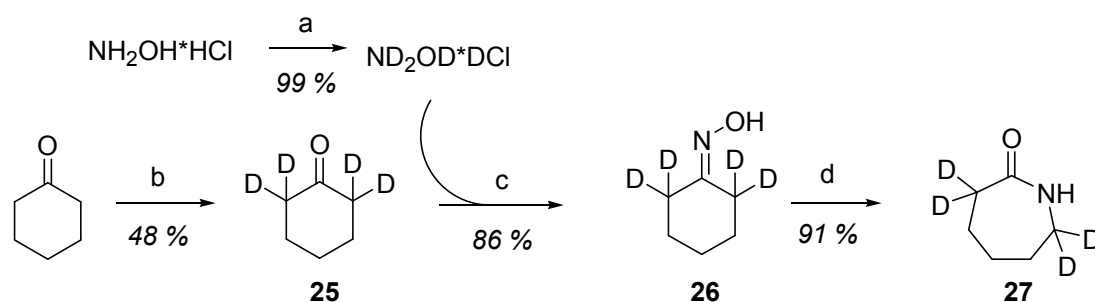
Baldwin-Regeln weniger bevorzugt ist, soll ϵ -Caprolactam-6- d_1 nur mit einer Ausbeute von 16 % zu isolieren sein.^[19]

Für den ersten Schritt wurde eine Apparatur zur Verflüssigung von Ammoniak gebaut, bei der das Ammoniakgas aus Ammoniumchlorid und konzentrierter, wässriger Natronlauge (30 % w/w) hergestellt und in den Reaktionskolben geleitet wurde. Dort wurde das Gas mit einer Mischung aus flüssigem Stickstoff und *iso*Propanol (Außentemperatur -40 – -50 °C) gekühlt, anschließend wurde aus einem Tropftrichter das zuvor hergestellte Carbonsäurechlorid in abs. Toluol tropfenweise zugegeben. Mit der beschriebenen Reaktionsapparatur konnte nicht ausreichend Ammoniak für die Reaktion kondensiert werden, bei der Reaktion entstand ein komplexes Reaktionsgemisch. Von weiteren Versuchen zur Verflüssigung von Ammoniak wurde abgesehen. Stattdessen wurde das Hex-5-enamid nach einer Literaturvorschrift hergestellt, die sich für das Pent-4-enamid bewährt hat.^[48] Dazu wurde die 5-Hexensäure in abs. Toluol vorgelegt, Oxalylchlorid in abs. DMF bei 0 °C zugetropft und anschließend der Ansatz bei Raumtemperatur gerührt. Das nach dem Einengen erhaltene Säurechlorid wurde in abs. THF aufgenommen und zur eisgekühlter, wässriger 25 %iger Ammoniaklösung zugetropft. Nach der Aufreinigung wurden 85 % des Hex-5-enamids erhalten. Die Einführung der Phenylthio-Gruppe am Stickstoffatom gelang wie zuvor geplant nach der Vorschrift von Li et al.,^[19] wobei nur die Hälfte der Literatúrausbeute erreicht wurde (22 %). Das für den dritten Schritt der Synthese benötigte Tri-*n*-butylzinndeuterid wurde von beiden Anbietern aus dem Verkauf genommen und musste synthetisiert werden. In der Literatur waren zwei Synthesemöglichkeiten für Tri-*n*-butylzinndeuterid beschrieben, aus Tri-*n*-butylzinchlorid und Lithiumaluminiumdeuterid sowie aus Bis(tri-*n*-butylzinn)oxid und Natriumbordeuterid, es wurde die zweite Option ausgewählt, da Natriumbordeuterid günstiger erhältlich war. Das Bis(tri-*n*-butylzinn)oxid wurde nach der Vorschrift in abs. Ethanol vorgelegt und Natriumbordeuterid bei 0 °C zugegeben, nach dem Auftauen auf Raumtemperatur wurde noch für 1 h gerührt.^[49] Nach einer Kugelrohrdestillation konnten 87 % des Tri-*n*-butylzinndeuterids erhalten werden. Das in Chloroform-*d* aufgenommene ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von Tri-*n*-butylzinndeuterid stimmte nicht mit der Literatur überein, weil das in der Publikation genannte Spektrum vom Zersetzungsprodukt, dem Tri-*n*-butylzinchlorid, stammte. Es hat sich gezeigt, dass die Zersetzung von Tri-*n*-butylzinndeuterid in Chloroform-*d* zum Tri-*n*-butylzinchlorid innerhalb von wenigen Stunden stattfindet, d.h. die Probe muss so schnell wie möglich nach dem Ansetzen vermessen werden oder inertes, nicht Chlorhaltiges Lösungsmittel wie Benzol-*d*₆ oder Aceton-*d*₆ verwendet werden. Die Identität des Produktes konnte mit dem ²H-NMR-Spektrum bestätigt werden, welches ein Signal bei 4.74 ppm zeigte. Im dritten und letzten Schritt sollte das *N*-(Phenylthio)hex-5-enamid in einer radikalischen Reaktion mit Tri-*n*-butylzinndeuterid nach der Vorschrift von Li et al. cyclisiert werden.^[19] Bei der Reaktion ist ein sehr komplexes Reaktionsgemisch entstanden, eine GC-MS-Messung bestätigte die Bildung von 7-endo-trig- (ϵ -Caprolactam-6- d_1) und 6-exo-trig-Cyclisierungsprodukt. Es gelang jedoch nicht das Produkt mittels Säulenchromatographie zu isolieren, die beiden Produkte zeigten zu ähnliche *R_f*-Werte, deswegen wurde Syntheseweg nicht weiterverfolgt und ein neuer Syntheseweg zur Darstellung von ϵ -Caprolactam- d_4 verfolgt (siehe Schema 12).

Synthese von ϵ -Caprolactam- d_4

Die Synthese von ¹⁵N-markiertem ϵ -Caprolactam ist literaturbekannt,^[50] diese wurde als erstes mit unmarkierten Edukten durchgeführt, um die Ausbeuten der einzelnen Schritte zu bestimmen. Das ϵ -Caprolactam konnte in zwei Schritten ausgehend von Cyclohexanon erhalten werden. Im ersten Schritt wurde Cyclohexanon mit Hydroxylaminhydrochlorid unter basischen Bedingungen zum

Cyclohexanonoxim umgesetzt, nach einer Extraktion wurden 98 % des Produktes erhalten. Das Cyclohexanonoxim wurde in der Folgestufe einer säurekatalysierten Beckmann-Umlagerung unterworfen, die saure Lösung des Eduktes wurde für 2 min bei einer Innentemperatur von 120 bis 125 °C erhitzt. Das Rohprodukt wurde neutralisiert, extrahiert und der eingedampfte Rückstand mittels Kugelrohr destilliert, es wurden 93 % des ϵ -Caprolactams erhalten. Nachdem die Ausbeuten bestimmt wurden, wurde die isotopenmarkierte Verbindung synthetisiert. Da es eine literaturbekannte Vorschrift für die Deuterierung von Cyclohexanon an den α -CH₂-Gruppen gab,^[51] wurde dieses Substrat als Ausgangsstoff ausgesucht, der Syntheseweg ist in dem Schema 12 dargestellt.



Schema 12: Der Syntheseweg zum ϵ -Caprolactam-d₄ (**27**) ausgehend von Cyclohexanon. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 3 x (D₂O, 80 °C, 1.5 h); b) K₂CO₃, D₂O, Rückfluss, 2 d 16 h; c) Na₂CO₃, D₂O, RT; d) D₂SO₄/D₂O, 140 °C, 20 min, NH₃(aq), H₂O, 0 °C.

Das Cyclohexanon-d₄ (**25**) wurde nach einer Vorschrift von Pellicciari et al. synthetisiert^[51], wobei die Literatursausbeute von 95 % nicht erreicht werden konnte. Bei dieser Reaktion wurden vier α -Protonen in einer basischen Austauschreaktion mit schwerem Wasser ausgetauscht. Obwohl das Cyclohexanon erst bei 156 °C siedet, hat es eine relativ hohe Verdunstungszahl von 40 (Diethylether = 1), d.h. dass dasselbe Volumen an Cyclohexanon nur 40-mal mehr Zeit zur Verdunstung benötigt wie das Volumen an Diethylether. Das führte zu Problemen bei der Aufarbeitung, die aus einer Extraktion mit Diethylether, Einengen der Lösung am Rotationsverdampfer und einer anschließenden Kugelrohrdestillation besteht. Um die Reaktionsführung effektiver zu gestalten, wurde der Diethylether durch das flüchtigere *n*Pentan als Extraktionslösungsmittel ersetzt. Das Cyclohexanon-d₄ (**25**) wurde in einer Ausbeute von 48 % erhalten. Da die α -CD₂-Gruppen erst im Produkt nicht austauschbar sind, wurden die zwei Folgestufen mit deuteriummarkierten Lösungsmitteln und Reagenzien durchgeführt. Das deuteriummarkierte Hydroxylaminhydrochlorid wurde nach einer literaturbekannten Vorschrift hergestellt,^[52] dabei wurde das Hydroxylaminhydrochlorid in D₂O gelöst, für 20 min bei 80 °C gerührt bis eine klare Lösung entstand und das überschüssige D₂O am Rotationsverdampfer entfernt. Diese Austauschreaktion wurde dreimal durchgeführt und das Produkt für mehrere Stunden im Feinvakuum getrocknet. Das so hergestellte Reagenz wurde für die Reaktion zum Cyclohexanonoxim-d₄ (**26**) verwendet. Diese Reaktion wurde nach einer Vorschrift von Glans und Hartfield^[50] durchgeführt, mit der Ausnahme, dass hier ein deuteriummarkiertes anstatt eines ¹⁵N-markierten Hydroxylaminhydrochlorids verwendet wurde, das Produkt konnte in 86 %iger Ausbeute erhalten werden. In der letzten Stufe wurde das Cyclohexanonoxim-d₄ (**26**) mit D₂SO₄/D₂O anstatt von H₂SO₄/H₂O für 20 min bei einer Innentemperatur von 120 bis 123 °C erhitzt, die Zielverbindung **27** wurde nach der Aufarbeitung in einer Ausbeute von 91 % erhalten, die Gesamtausbeute der Synthese lag bei 38 %.

Die Identität von ϵ -Caprolactam-d₄ (**27**) konnte mittels Kernresonanzspektroskopie (¹H, ¹³C-NMR) und Massenspektrometrie (GC-MS) bestätigt werden (siehe Abschnitt II.3).

I.3.2.2 *Synthese von Di- und Tri- ϵ -Aminocaprinsäure*

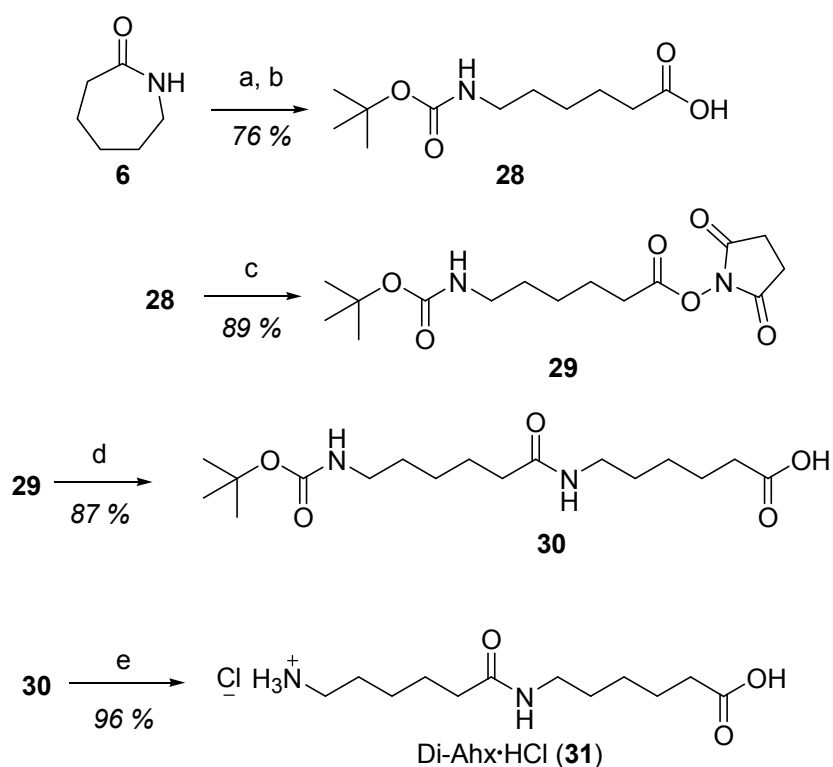
Synthese von Di- und Tri-6-Aminohexansäure

Im ersten Versuch zur Synthese der Di- und Tri-6-Aminocaprinsäure wurde eine literaturbekannte Methode der gemischten Anhydride getestet.^[53] Diese beinhaltet Einführung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Cbz-Schutzgruppe) am *N*-Terminus der 6-Aminocaprinsäure, Umsetzung mit Chlorameisensäureisobutylester zum gemischten Anhydrid, eine anschließende Kupplung mit dem Natriumsalz von 6-Aminocaprinsäure zum linearen Dimer sowie Entfernung der Schutzgruppe.

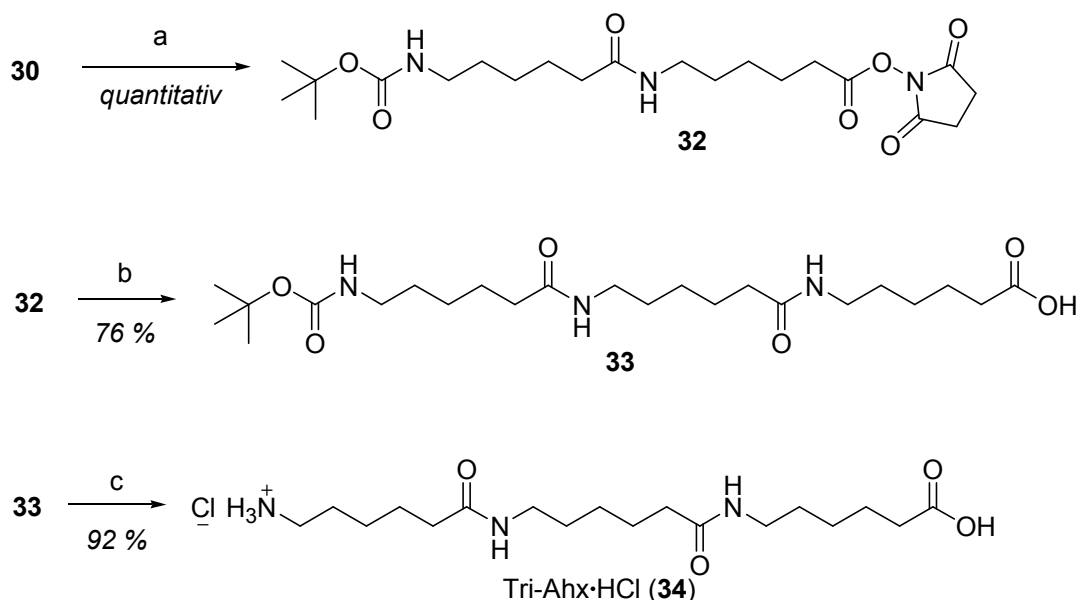
Die kommerziell erhältliche Cbz- ϵ -Aminocaprinsäure wurde im ersten Teilschritt der Reaktion mit Chlorameisensäureisobutylester/Triethylamin in absolutem Tetrahydrofuran behandelt. Zu dem so hergestellten, gemischten Anhydrid wurde bei -20 °C (Badtemperatur) eine alkalische Lösung der ϵ -Aminocaprinsäure zugetropft, welche zuvor aus ϵ -Caprolactam in einer basischen Hydrolyse dargestellt wurde. Die Cbz-di- ϵ -Aminocaprinsäure wurde in einer Ausbeute von 35 % erhalten, das entspricht der Hälfte der Literatúrausbeute. Die Entfernung der Cbz-Schutzgruppe verlief ebenfalls in zwei Teilschritten, im ersten wurde das Edukt mit Bromwasserstoff in Eisessig (33 %) versetzt und im zweiten das entstandene Hydrobromidsalz mit konzentriertem Ammoniak (25 %) versetzt, um das freie Amin der Di- ϵ -Aminocaprinsäure zu erhalten. Nach der Zugabe des Ammoniaks fiel ein Niederschlag aus, der sich bald wieder löste und folglich nicht abfiltriert werden konnte. Der nach Entfernen der Lösungsmittel erhaltene Feststoff, der unter anderem aus dem Produkt und Ammoniumsalzen bestand wurde mehrmals aus Aceton umkristallisiert, konnte jedoch auf diese Weise nicht aufgereinigt werden. Es wurde ein inhomogener weißer und gelber Feststoff erhalten, welcher laut Dünnschichtchromatographie aus mehreren Verbindungen bestand. Da die Isolierung des Produktes nicht gelang, wurde ein alternativer Syntheseweg verfolgt, welcher in dem Schema 13 und 14 gezeigt ist.

Die Deuterierung in der Di- und Tri-6-Aminohexansäure soll aus dem zuvor hergestelltem ϵ -Caprolactam stammen, daher bot es sich an, bei der Synthese der unmarkierten Verbindung von demselben Edukt auszugehen. Der erste Schritt beinhaltete die nukleophile Öffnung des cyclischen ϵ -Caprolactams und der zweite die Einführung einer Boc-Schutzgruppe am *N*-Terminus der Verbindung. In der ersten Testreaktion wurde das Edukt in einer verdünnten Natronlauge gelöst und für eine halbe Stunde zum Sieden erhitzt,^[53] zu dem entstandenen Natriumsalz der Aminohexansäure wurde aus einem Tropftrichter Di-*tert*-Butyloxycarbonat (Boc₂O) in absolutem Tetrahydrofuran bei 0 °C zugetropft und zur Vervollständigung der Reaktion für 24 h bei Raumtemperatur gerührt.^[54] Nach einer Extraktion wurden 76 % der Boc-6-Aminohexansäure (**28**) erhalten. Die nächsten zwei Schritte des alternativen Syntheseweges für die Di- (**31**) und Tri-6-Aminocaprinsäure (**34**) wurden nach einer Literaturvorschrift^[55] durchgeführt. Die Boc-6-Aminocaprinsäure wurde zur Aktivierung der Carbonsäuregruppe mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC-HCl) zum *O*-Acyloisoharnstoff-Intermediat umgesetzt, welches dann spontan mit dem *N*-Hydroxysuccinimid zum NHS-Ester **29** reagierte. Bei der Reaktion entstand ein Harnstoff-Derivat als Hydrochloridsalz, welches sich aus der Reaktionslösung als braunes Öl abschied. Der NHS-Ester **29** wurde mit einer weiteren ϵ -Aminocaprinsäure gekuppelt, wobei die Boc-Di-6-Aminocaprinsäure (**30**) in einer 87 %iger Ausbeute entstand. In der Literatur wurde die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure/Wasser (1:1, v/v) entfernt, wobei das Trifluoracetat der Di- ϵ -Aminocaprinsäure entstand.^[55] Bei vorliegender Synthese wurde anstatt des Trifluoracetats das Hydrochlorid hergestellt. Die Entschützung zum Hydrochlorid

des Dimers **31** wurde mit einem selbsthergestellten Reagenz, dem Chlorwasserstoffgas in Ethylacetat, durchgeführt. Die Darstellung des Reagenzes gelang durch das Entwässern von konzentrierter Salzsäure mit Calciumchlorid und Einleiten des Gases in Ethylacetat.



Schema 13: Der Syntheseweg zum Di-6-Aminocapronsäurehydrochlorid (**31**) ausgehend von ϵ -Caprolactam. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 4 M NaOH_{aq}, 0.5 h, Rückfluss; b) 0.5 M NaOH_{aq}, Boc₂O in abs. THF, 0 °C → RT, 24 h; c) *N*-Hydroxysuccinimid, EDC·HCl, abs. CH₂Cl₂, RT, 17.5 h; d) 6-Aminohexansäure, abs. NEt₃, abs. DMF, RT, 18.5 h; e) HCl_(g) in abs. EtOAc, RT, 6.5 h.



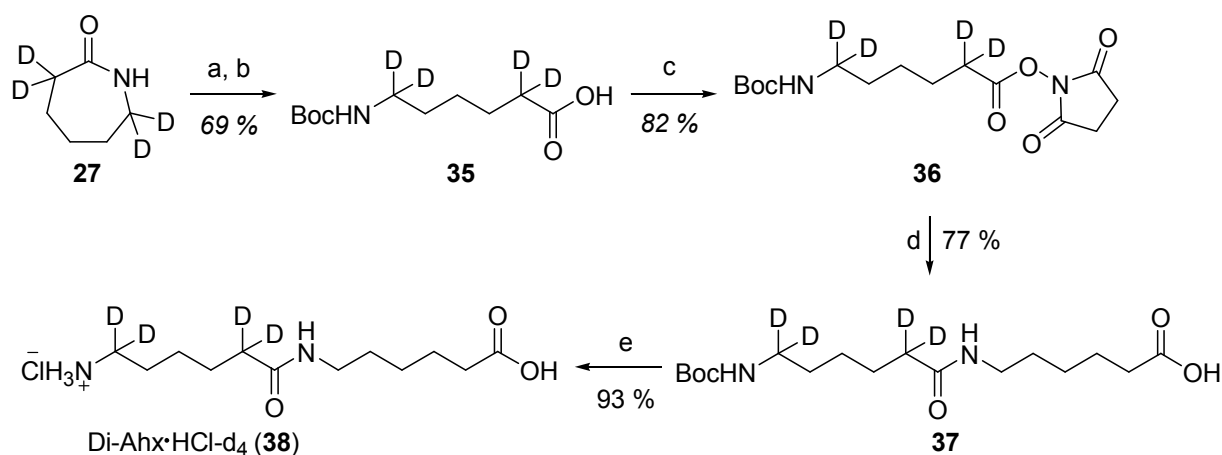
Schema 14: Der Syntheseweg zum Tri-6-Aminocapronsäurehydrochlorid (**34**) ausgehend von *N*-Boc-di- ϵ -Aminocapronsäure (**30**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) *N*-Hydroxysuccinimid, EDC·HCl, abs. CH₂Cl₂, RT, 17.5 h; b) 6-Aminocapronsäure, abs. NEt₃, abs. DMF, RT, 18 h; c) HCl_(g) in abs. EtOAc, RT, 6 h.

Das Zwischenprodukt **30** wurde ebenfalls zur Synthese des Hydrochlorids der Tri-6-Aminocapronsäure (**34**) eingesetzt, indem die Reaktionssequenz zur NHS-Esterbildung, Kupplung mit einer weiteren ϵ -Aminocapronsäure und anschließender Entschützung wiederholt wurde. Bei der Synthese des Dimers **31** ergab sich eine Gesamtausbeute von 56 %, das Trimer **34** konnte aufgrund höherer Anzahl von Reaktionsschritten in einer Gesamtausbeute von 41 % erhalten werden.

1.3.2.3 Synthese von isotopenmarkierter Di- und Tri-6-Aminocapronsäure

Synthese der isotopenmarkierten 6-Aminohexansäure-Derivate

Die Synthese der isotopenmarkierten 6-Aminohexansäure-Derivate gelang ausgehend von dem cyclischen Monomer. Das ϵ -Caprolactam ist eine Vorstufe des Polymers, des Polyamids 6, welches in der ringöffnenden Polymerisation entsteht. Um eine Polymerisation zu unterdrücken, musste, ähnlich wie bei den BADGE-BPA-Derivaten, Schutzgruppen gearbeitet werden. Hierfür wurde die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc-Schutzgruppe) ausgesucht, welche unter basischen Reaktionsbedingungen stabil ist.



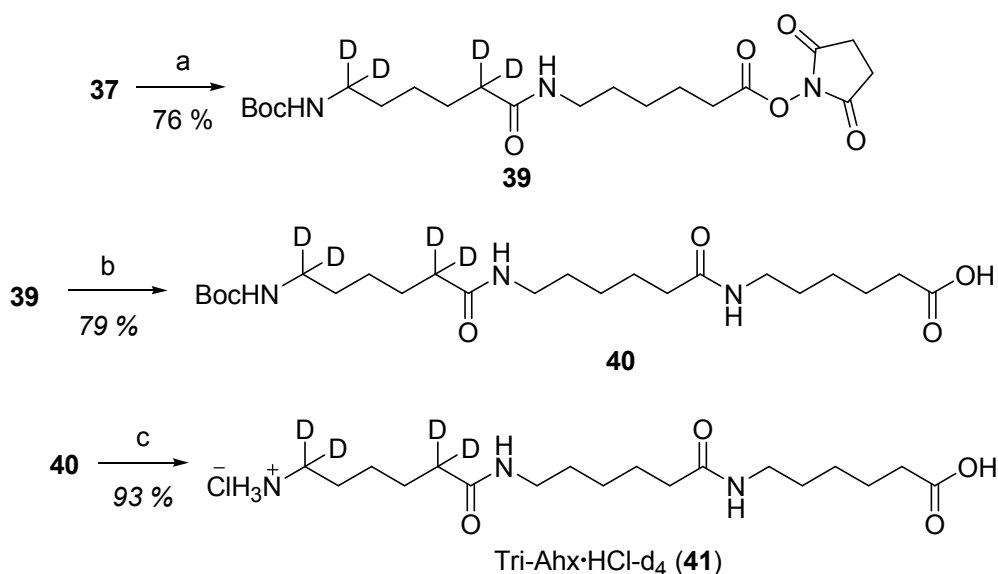
Schema 15: Der Syntheseweg von Di-Ahx·HCl-d₄ (**38**) ausgehend von ϵ -Caprolactam-d₄ (**27**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) 4 M NaOD in D₂O, Rückfluss, 0.5 h; b) 0.5 M NaOD in D₂O, Boc₂O in abs. THF, 0 °C → RT, 18.5 h; c) *N*-Hydroxysuccinimid, EDC·HCl, abs. CH₂Cl₂, RT, 18 h; d) 6-Aminohexansäure, abs. NEt₃, abs. DMF, RT, 19 h; e) HCl_(g) in abs. EtOAc, RT, 4 h.

Die Darstellung des Hydrochlorids der Di-6-Aminohexansäure-d₄ (**38**) (Di-Ahx·HCl-d₄) ist im Schema 15 zusammengestellt. Wie bei der Synthese der nicht markierten Verbindung **31** waren die ersten beiden Schritte eine basische Hydrolyse des ϵ -Caprolactams und eine anschließende Einführung einer Boc-Schutzgruppe an der Aminofunktion. Diese Reaktionsbedingungen wurden auf das isotopenmarkierte ϵ -Caprolactam **27** angewandt. Die Analyse des Produktes mittels ¹H-NMR-Spektroskopie zeigte einen partiellen Austausch der Deuteriumatome am α -Kohlenstoffatom zur Carboxylgruppe, daher wurde die Reaktion mit Natriumdeuteroxid in Deuteriumoxid durchgeführt.

Die Aktivierung der Carbonsäuregruppe von Boc-6-Aminohexansäure-d₄ (**35**) sowie die Kupplung zur Boc-di-6-Aminohexansäure-d₄ (**37**) wurden nach einer Vorschrift von Huang et al.^[55] durchgeführt. Dabei wurde die Boc-geschützte 6-Aminosäure-d₄ **35** mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC·HCl) in eine reaktive Zwischenstufe überführt, die spontan mit *N*-Hydroxysuccinimid zum Ester **36** abreagierte. Der Vorteil der Verwendung von EDC·HCl besteht darin, dass das als Nebenprodukt entstehende Hydrochlorid des Harnstoff-Derivates nach der Extraktion in der wässrigen Phase zurückbleibt. Der Aktivester **36** konnte dann mit einer weiteren 6-

Aminocapronsäure zu Boc-di-6-Aminohexansäure-d₄ (**37**) umgesetzt werden. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde mit einem selbsthergestellten Reagenz, dem Chlorwasserstoffgas in Ethylacetat, durchgeführt. Die als Hydrochlorid erhaltene Di-6-Aminohexansäure-d₄ (**38**) wurde ausgehend von Cyclohexanon in einer Gesamtausbeute von 15 % erhalten.

Das deuterierte Trimer der 6-Aminohexansäure **41** wurde analog zum Dimer **38** synthetisiert (siehe Schema 16), wobei das Boc-geschützte Dimer **37** als Ausgangsverbindung diente. Die Verbindung **37** wurde zum Succinimidyl-Ester **39** umgesetzt und mit einer weiteren 6-Aminohexansäure gekuppelt. Nach dem Entfernen der Boc-Schutzgruppe bildete sich das Hydrochlorid der Tri-6-Aminohexansäure-d₄ (**41**). Ausgehend von Cyclohexanon lag die Gesamtausbeute nach 9 Stufen bei 9 %.



Schema 16: Der Syntheseweg von Tri-Ahx·HCl-d₄ (**41**) ausgehend von *N*-Boc-di-6-Aminocapronsäure (**37**). Reagenzien und Reaktionsbedingungen: a) *N*-Hydroxysuccinimid, EDC·HCl, abs. CH₂Cl₂, RT, 17.5 h; b) 6-Aminohexansäure, abs. NEt₃, abs. DMF, RT, 19 h; c) HCl(g) in abs. EtOAc, RT, 3 h.

I.3.3 Reinheitsbestimmung der synthetisierten Referenzmaterialien

Der Einsatz der synthetisierten Verbindungen als Referenzmaterialien erforderte die Durchführung der Reinheitsbestimmung. Diese erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion mit einer 100 %-Methode. Um die richtige Detektionswellenlänge zu ermitteln, wurden UV-Spektren der synthetisierten Verbindungen aufgenommen, die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Für die BADGE·BPA-Derivate wurde eine Detektionswellenlänge von 288 nm ausgewählt. Für das ϵ -Caprolactam wurde eine sehr geringe Extinktion im gewählten Wellenlängenbereich gemessen. Laut der Literatur zeigt das ϵ -Caprolactam im fernen UV-Bereich einen $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang bei 196 nm (gemessen in 1×10^{-4} molarer Lösung in Wasser).^[56] Daher wurden 210 nm als Messwellenlänge für die Detektion des ϵ -Caprolactams-d₄ ausgesucht, wobei es sich um eine maximal zulässige Messwellenlänge handelt, bei der noch mit Methanol/Wasser-Gemischen als Laufmittel gearbeitet werden kann. Die Di- und Tri-6-Aminohexansäure zeigten ebenfalls eine geringe Extinktion, was – ähnlich wie bei ϵ -Caprolactam – auf das Vorhandensein von nur einem Chromophor, nämlich einer Peptidbindung, zurückzuführen ist. Daher wurde für die Aminohexansäure-Derivate ebenfalls eine Messwellenlänge von 210 nm ausgesucht.

Tabelle 5: Die UV- (λ_{\max}), Extinktionsmaxima (E_{\max}) sowie die molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{\max}) der synthetisierten Verbindungen und des gekauften Caprolactams (Die UV-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 400 nm aufgenommen).

Verbindung	Konzentration [mol/l]	Lösungsmittel	λ_{\max} [nm]	E_{\max}	ϵ_{\max} [$\frac{l}{mol \cdot cm}$]
BADGE·BPA	$1.765 \cdot 10^{-3}$	MeOH _{LC-MS}	288	1.7804	1008
BADGE·BPA-d ₁	$1.773 \cdot 10^{-3}$		288	1.7997	1015
BADGE·2BPA	$1.255 \cdot 10^{-3}$	MeOH _{LC-MS}	289	1.8530	1476
BADGE·2BPA-d ₂	$1.252 \cdot 10^{-3}$		289	1.8449	1473
BADGE·BPA·H ₂ O	$1.756 \cdot 10^{-3}$	MeOH _{LC-MS}	289	1.8047	1027
BADGE·BPA·H ₂ O-d ₁	$1.753 \cdot 10^{-3}$		288	1.8027	1028
BADGE·BPA·HCl	$1.636 \cdot 10^{-3}$	MeOH _{LC-MS}	288	1.8137	1108
BADGE·BPA·HCl-d ₁	$1.666 \cdot 10^{-3}$		288	1.7992	1079
ϵ -Caprolactam	$8.749 \cdot 10^{-3}$	MeCN _{LC-MS}	243	0.0495	5
ϵ -Caprolactam-d ₄	$8.534 \cdot 10^{-3}$		243	0.0468	5
Di-Ahx·HCl	$3.526 \cdot 10^{-3}$	H ₂ O _{LC-MS}	224	0.0149	4
Di-Ahx·HCl-d ₄	$3.546 \cdot 10^{-3}$		222	0.0158	4
Tri-Ahx·HCl	$2.538 \cdot 10^{-3}$	H ₂ O _{LC-MS}	225	0.0178	7
Tri-Ahx·HCl-d ₄	$2.538 \cdot 10^{-3}$		224	0.0175	6

Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels HPLC-UV, wobei mit den zuvor bestimmten Detektionswellenlängen gearbeitet wurde (für Geräteparameter siehe II.1.2, für Methodenparameter siehe II.2). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Mittels HPLC-UV bestimmte Reinheiten der synthetisierten Verbindungen

Verbindung	Reinheit [%]	Mittelwert der Reinheit [%]	RSD [%]
BADGE·BPA	96.0	96.0	0.10
	95.9		
	96.1		
BADGE·BPA-d ₁	95.9	95.6	0.37
	95.2		
	95.6		
BADGE·2BPA	97.1	97.2	0.16
	97.2		
	97.4		
BADGE·2BPA-d ₂	99.3	99.2	0.12
	99.1		
	99.1		
BADGE·BPA·H ₂ O	97.4	97.5	0.24
	97.8		
	97.4		
BADGE·BPA·H ₂ O-d ₁	99.9	99.8	0.12
	99.9		
	99.7		
BADGE·BPA·HCl	98.5	98.3	0.21
	98.1		
	98.2		

Tabelle 6: Fortsetzung

Verbindung	Reinheit [%]	Mittelwert der Reinheit [%]	RSD [%]
BADGE·BPA·HCl-d ₁	99.8	99.8	0.06
	99.9		
	99.8		
ε-Caprolactam-d ₄	99.0	99.0	0.20
	98.8		
	99.2		
Di-Ahx·HCl	100	100.0	0.00
	100		
	100		
Di-Ahx·HCl-d ₄	100	100.0	0.00
	100		
	100		
Tri-Ahx·HCl	97.6	98.0	0.41
	98.4		
	97.9		
Tri-Ahx·HCl-d ₄	99.4	99.3	0.10
	99.2		
	99.3		

Die Reinheiten von Di- und Tri-Aminohexansäure wurden zunächst aus methanolischen Stammlösungen bestimmt, die erhaltenen Chromatogramme zeigten jedoch zwei Signale. Nach einer NMR-spektroskopischen Untersuchung stellte sich heraus, dass sich die Verbindungen in Methanol zu den Methylestern umsetzten. Die Bildung eines Esters ist unter sauren Bedingungen in wasserfreiem Alkohol als Lösungsmittel denkbar, dabei stammt die Säure aus der Verbindung selbst, denn es handelt sich um Hydrochlorid-Addukte. Die Reinheitsbestimmung der 6-Aminohexansäuren wurde erneut aus einer wässrigen Stammlösung bestimmt, da die Bildung des Methylesters durch Wasser gehindert wird.

Die Reinheit wurde als prozentualer Anteil der Peakfläche der synthetisierten Verbindung bezogen auf die Gesamtfläche aller integrierten Peaks im Chromatogramm angegeben. Die Reinheiten aller BADGE·BPA- und Aminohexansäure-Derivate liegen zwischen 95.6 % bei BADGE·BPA-d₁ und 100.0 % bei Di-Ahx·HCl und Di-Ahx·HCl-d₄. Die bestimmten hohen Reinheiten sind konsistent mit den NMR-Spektren der Verbindungen. Insgesamt wurden sehr gute relative Standardabweichungen zwischen 0.00 und 0.41 % erzielt.

Aus den erhaltenen und im Abschnitt II.4 vorgestellten Daten zur Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen mittels NMR-Spektroskopie, GC- bzw. ESI-MS, Dünnschichtchromatographie, HPLC-UV und UV-Spektroskopie folgt, dass es sich um die gewünschten Verbindungen handelt.

I.3.4 Überprüfung der eingeführten Markierung in den synthetisierten Verbindungen und Bestimmung der Markierungsgrade

Zwecks Überprüfung der Position der eingeführten Deuterierung wurden ¹H- und ²H-NMR-Spektren der markierten Verbindungen aufgenommen und mit den Daten aus den ¹H-NMR-Spektren der nicht

markierten Verbindungen verglichen. In Abbildung 2 werden exemplarisch die ^1H -NMR-Spektren von Di-6-Aminohexansäure und Di-6-Aminohexansäure- d_4 gezeigt, die Spektren entsprechen Tabelleneinträgen 16 und 17 aus Tabelle 7. Vergleicht man die beiden Spektren, so fällt auf, dass die Protonen H-1 und H-5 im Spektrum der markierten Verbindung fehlen, es erscheinen lediglich Restprotonensignale. Da das ^2H -NMR-Spektrum der markierten Verbindung bei den entsprechenden chemischen Verschiebungen zwei breite Singulets zeigt, die das integrale Verhältnis zwei zu zwei zeigen, konnte bestätigt werden, dass es sich um die gewünschte Substanz handelt.

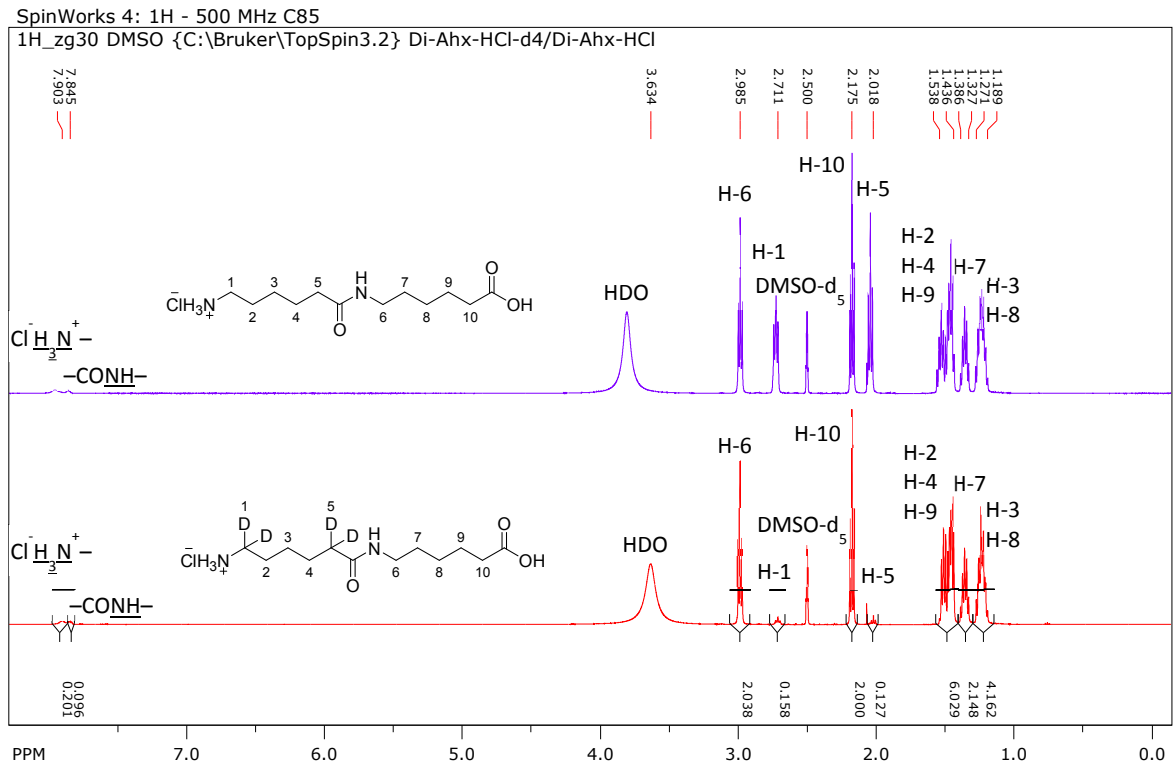


Abbildung 2: Gegenüberstellung der ^1H -NMR-Spektren von Di-6-Aminohexansäure (oben) und Di-6-Aminohexansäure- d_4 (unten) in $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$.

Die Daten zur Überprüfung der Einführung von Deuterierung wurden für alle synthetisierten Verbindungen in der Tabelle 7 dargestellt. In der Tabelle wurden nur die Bereiche des ^1H -NMR-Spektrums zusammengestellt, die für den Nachweis der Markierung relevant sind. Aufgrund von Überlagerungen der ^1H - und ^2H -Signale mit den Lösungsmittelsignalen war die Aufnahme aller Spektren in einem Lösungsmittel nicht möglich. Bei der Di- und Tri-6-Aminohexansäure wurden die δ -Wertepaare, die im selben Lösungsmittel aufgenommen wurden und somit miteinander verglichen werden können, farblich gekennzeichnet. Den zusammengestellten Daten aus der Tabelle 7 kann entnommen werden, dass die Einführung der Deuterierung bei allen Verbindungen an den gewünschten Positionen erfolgreich war, denn in allen ^1H -NMR-Spektren der markierten Verbindungen treten nur Restprotonensignale bei den entsprechenden δ -Werten auf. Betrachtet man beispielsweise das ^1H -NMR-Spektrum von BADGE-BPA (Eintrag 1) und BADGE-BPA- d_1 (Eintrag 2), so fällt auf, dass sich die integrale Intensität von 1 bei BADGE-BPA auf 0,022 (Restprotonensignal) bei BADGE-BPA- d_1 verringert hat, wobei sich die Lage des Multipletts geringfügig zu höheren δ -Werten verschoben hat. Das Auftreten eines breiten Singulets bei 4,35 ppm im ^2H -Spektrum von BADGE-BPA- d_1 (Eintrag 3) beweist das Einführen der Deuterierung an der gewünschten Position. Die Hochfeld-

Verschiebung (zu geringeren δ -Werten) der Signale im Spektrum der markierten Verbindung im Vergleich zum Spektrum der nicht markierten Verbindung wurde auch in dem ^{13}C -Spektrum von Di-6-Aminohexansäure- d_4 beobachtet (siehe Erläuterung zum ^{13}C -Spektrum von Di-6-Aminohexansäure- d_4 im Abschnitt II.3). Vergleicht man die δ -Werte aus den ^1H -NMR-Spektren von nicht markierten Verbindungen mit denen von markierten Verbindungen, erkennt man, dass die Hochfeld-Verschiebung bei markierten Verbindungen der Aminohexansäure-Derivate im Vergleich zu den BADGE-BPA-Derivaten größer ausfällt. Das liegt daran, dass das Ausmaß der Hochfeld-Verschiebung proportional zu der Anzahl der eingeführten Deuteriumatome ist, hier zwei Deuteriumatome bei Aminohexansäure-Derivaten versus ein Deuteriumatom bei BADGE-BPA-Derivaten. Weiterhin konnte bei vielen markierten Verbindungen eine Vereinfachung des ^1H -NMR-Spektrums in Bereichen der Protonen, die direkt mit einem Deuteriumatom benachbart sind, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Beispielsweise wurde die mit Proton benachbarte OH-Gruppe im ^1H -NMR-Spektrum von BADGE-BPA $\cdot\text{H}_2\text{O}$ als Dublett beobachtet (Kopplung mit einem weiteren Proton), die mit Deuterium benachbarte OH-Gruppe im ^1H -NMR-Spektrum von BADGE-BPA $\cdot\text{H}_2\text{O}$ - d_1 zeigte dagegen ein Singulett (kein Kopplungspartner, da Deuterium eingeführt).

Tabelle 7: Vergleich der ^1H -Signallagen in Spektren der unmarkierten mit ^1H - und ^2H -Signallagen der markierten Verbindungen (Alle ^2H -NMR-Spektren wurden bei 77 MHz aufgenommen).

Eintrag	Verbindung	Lösungsmittel	Chemische Verschiebung δ [ppm]	Integrale Intensität	Multiplizität	Zuordnung
1	BADGE-BPA	CDCl_3	^1H : 4.39–4.32	1H	m	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
2	BADGE-BPA- d_1	CDCl_3	^1H : 4.37–4.34	0.022H	m	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
3		$\text{CHCl}_3/\text{CDCl}_3$	^2H : 4.35	1D	br s	$-\text{CH}_2-\text{CD}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
4	BADGE-2BPA	CDCl_3	^1H : 4.39–4.35	2H	m	$2 \times (-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-)$
5	BADGE-2BPA- d_2	CDCl_3	^1H : 4.39–4.34	0.048H	m	$2 \times (-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-)$
6		$\text{CHCl}_3/\text{CDCl}_3$	^2H : 4.35	2D	br s	$2 \times (-\text{CH}_2-\text{CD}(\text{OH})-\text{CH}_2-)$
7	BADGE-BPA $\cdot\text{H}_2\text{O}$	Aceton- d_6	^1H : 4.32–4.27	1H	m	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
8	BADGE-BPA $\cdot\text{H}_2\text{O}$ - d_1	Aceton- d_6	^1H : 4.30–4.26	0.072H	m	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
9		Aceton/ Aceton- d_6	^2H : 4.28	1D	br s	$-\text{CH}_2-\text{CD}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
10	BADGE-BPA $\cdot\text{HCl}$	Aceton- d_6	^1H : 4.32–4.27	1H	m	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
11	BADGE-BPA $\cdot\text{HCl}$ - d_1	Aceton- d_6	^1H : 4.32–4.27	0.044H	m	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
12		Aceton/ Aceton- d_6	^2H : 4.28	1D	br s	$-\text{CH}_2-\text{CD}(\text{OH})-\text{CH}_2-$
13	CL	CDCl_3	^1H : 2.46–2.44	2H	m	$-\text{CH}_2-\text{CO}-$
			^1H : 3.21–3.17	2H	m	$-\text{CH}_2-\text{NH}-$
14		CDCl_3	^1H : 2.43–2.40	0.083H	m	$-\text{CH}_2-\text{CO}-$
	CL- d_4	$\text{CHCl}_3/\text{CDCl}_3$	^1H : 3.18–3.14	0.085H	m	$-\text{CH}_2-\text{NH}-$
15			^2H : 2.42	2D	br s	$-\text{CD}_2-\text{CO}-$
			^2H : 3.17	2D	br s	$-\text{CD}_2-\text{NH}-$

Tabelle 7: Fortsetzung

Eintrag	Verbindung	Lösungsmittel	Chemische Verschiebung δ [ppm]	Integrale Intensität	Multiplizität	Zuordnung
16	Di-Ahx·HCl	DMSO- d ₆ /D ₂ O	¹ H: 2.04	2H	t	–CH ₂ –CONH–
			2.73	2H	t	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CH ₂ –
17		DMSO- d ₆ /D ₂ O	¹ H: 2.02	0.127H	t	–CH ₂ –CONH–
			2.73	0.157H	t	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CH ₂ –
18	Di-Ahx·HCl-d ₄	D ₂ O	¹ H: 2.26	0.119H	t	–CH ₂ –CONH–
			3.00	0.137H	t	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CH ₂ –
19		H ₂ O/D ₂ O	² H: 2.21	2D	br s	–CD ₂ –CONH–
			2.96	2D	br s	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CD ₂ –
20	Tri-Ahx·HCl	DMSO- d ₆ /D ₂ O	¹ H: 2.04	2H	t	–CH ₂ –CONH–
			2.73	2H	t	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CH ₂ –
21		DMSO- d ₆ /D ₂ O	¹ H: 2.02	[a]	[a]	–CH ₂ –CONH–
			2.71	0.085H	t	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CH ₂ –
22	Tri-Ahx·HCl-d ₄	D ₂ O	¹ H: 2.26	[a]	[a]	–CH ₂ –CONH–
			3.00	0.139H	t	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CH ₂ –
23		H ₂ O/D ₂ O	² H: 2.20	2D	br s	–CD ₂ –CONH–
			2.96	2D	br s	Cl [–] H ₃ N ⁺ –CD ₂ –

[a] Die Peaklage und Multiplizität konnten wegen Überlagerung mit einem anderen Signal nicht bestimmt werden.

Die Markierungsgrade wurden aus den ¹H-NMR-Spektren der markierten und nicht markierten Verbindungen bestimmt. Bei der hier vorgestellten Methode wurde das Restprotonensignal auf ein normiertes Protonensignal im selben Molekül bezogen, es musste also kein weiterer Standard hinzugegeben werden. Das Verhältnis vom Restprotonensignal zum Referenzsignal im Spektrum der markierten Verbindung wurde um das Verhältnis der Signale im Spektrum der unmarkierten Verbindung korrigiert. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass beim Integrieren auch dieselben Verunreinigungen berücksichtigt werden, die das Ergebnis sonst verfälschen könnten. Dies war möglich, da sowohl die markierte als auch nicht markierte Verbindung unter gleichen Reaktionsbedingungen synthetisiert wurden und somit von gleichen Nebenprodukten ausgegangen werden konnte. Unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Signale im Spektrum der unmarkierten Verbindung ergibt sich folgende Gleichung für den prozentualen Markierungsgrad an der Position i:

$$\%(D/H)_i = \left(1 - \frac{I_{RPS,i} \cdot N_{Ref,m}}{I_{Ref,m} \cdot N_{RPS,i}} \cdot \frac{I_{Ref,u} \cdot N_{u,i}}{I_{u,i} \cdot N_{Ref,u}}\right) * 100 \% \quad (1)$$

Für die Berechnung der Markierungsgrade an der Position i werden folgende Größen aus dem ¹H-NMR-Spektrum der markierten Verbindung bestimmt:

$I_{Ref,m}$: Integral des Referenzsignals,

$N_{Ref,m}$: Anzahl der Protonen, die das Referenzsignal erzeugen,

$I_{RPS,i}$: Integral des Restprotonensignals an der Position i,

$N_{RPS,i}$: Anzahl der Protonen, die das Signal an der Position i erzeugen.

Folgende Größen werden aus dem ¹H-NMR-Spektrum der nicht markierten Verbindung bestimmt:

$I_{Ref,u}$: Integral des Referenzsignals,

$N_{Ref,u}$: Anzahl der Protonen, die das Referenzsignal erzeugen,

$I_{u,i}$: Integral des Signals an der Position i (die chemische Verschiebung dieses Signals entspricht der chemischen Verschiebung des Restprotonensignals im Spektrum der markierten Verbindung),

$N_{u,i}$: Anzahl der Protonen, die das Signal an der Position i erzeugen.

Als Referenzsignal wird im Spektrum der markierten und unmarkierten Verbindung dasselbe Proton herangezogen, so dass $N_{Ref,m}$ und $N_{Ref,u}$ sowie $I_{Ref,m}$ und $I_{Ref,u}$ gleich sind. Die Gleichung vereinfacht sich zu:

$$\% (D/H)_i = \left(1 - \frac{I_{RPS,i} N_{u,i}}{I_{u,i} N_{RPS,i}}\right) * 100 \% \quad (2)$$

Die Spektren der markierten und unmarkierten Verbindungen wurden in einer Dreifachbestimmung gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Spinworks 4.2.5, die Vorgehensweise der Auswertung für die Spektren der markierten Verbindungen soll hier kurz vorgestellt werden. Die Daten wurden einer Fourier-Transformation unterzogen und die Signale auf das Lösungsmittelsignal kalibriert. Als Nächstes wurden 15 Basislinienpunkte im Bereich des Referenzsignals Ref,m und des Restprotonensignals RPS,i ausgewählt und das Verfahren der kleinsten Quadrate zur Basislinienkorrektur angewandt. Das ausgewählte Referenzsignal Ref,m wurde integriert ($I_{Ref,m}$) und auf eine ganzzahlige Zahl der Protonen, die das Signal $N_{Ref,u}$ erzeugen, normiert. Danach wurde das Restprotonensignal integriert ($I_{RPS,i}$). Die Integration erfolgte ohne ^{13}C -Satelliten-Signale, in beiden Spektren im gleichen δ -Wertebereich und auf vier Nachkommastellen genau. Das Spektrum der nichtmarkierten Verbindung wurde analog dazu ausgewertet. Die erhaltenen Werte wurden in Gleichung 2 eingesetzt und der Markierungsgrad in Prozent an der markierten Position i ausgerechnet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 8: Mit der Gleichung 2 und 3 bestimmte Markierungsgrade

Messung	Verbindung		$\% (D/H)_i$	$\overline{\% (D/H)_i}$	RSD [%]
	nicht markiert	isotopenmarkiert			
	BADGE-BPA	BADGE-BPA-d₁			
	I_u	I_{RPS}			
1	1.046	0.025	97.61		
2	1.047	0.019	98.19	97.80	0.28
3	1.046	0.025	97.60		
	(mit $N_u = 1.000$)	(mit $N_{RPS} = 1.000$)			
	BADGE-2BPA	BADGE-2BPA-d₂			
	I_u	I_{RPS}			
4	2.004	0.048	97.60		
5	1.998	0.048	97.60	97.60	0.00
6	1.988	0.047	97.59		
	(mit $N_u = 2.000$)	(mit $N_{RPS} = 2.000$)			
	BADGE-BPA-H₂O	BADGE-BPA-H₂O-d₁			
	I_u	I_{RPS}			
7	1.047	0.072	93.12		
8	1.031	0.080	92.24	92.78	0.41
9	1.038	0.073	92.97		

Tabelle 8: Fortsetzung

Messung	Verbindung		$\% (D/H)_i$	$\overline{\% (D/H)_i}$	RSD [%]
	nicht markiert (mit $N_u = 1.000$)	isotopenmarkiert (mit $N_{RPS} = 1.000$)			
	BADGE·BPA·HCl	BADGE·BPA·HCl-d₁			
	I_u	I_{RPS}			
10	1.020	0.054	94.71		
11	1.020	0.055	94.61	94.68	0.05
12	1.020	0.054	94.71		
	(mit $N_u = 1.000$)	(mit $N_{RPS} = 1.000$)			
	CL	CL-d₄			
	$I_{u,-CH_2-NH-}$	$I_{RPS,-CH_2-NH-}$			
13	1.996	0.142	92.89		
14	1.999	0.145	92.75	92.82	0.06
15	2.002	0.144	92.81		
	(mit $N_u = 2.000$)	(mit $N_{RPS} = 2.000$)			
	$I_{u,-CH_2-CO-}$	$I_{RPS,-CH_2-CO-}$			
16	1.986	0.139	93.00		
17	1.986	0.136	93.15	93.06/ 95.9 ^[a]	0.07
18	1.984	0.138	93.04		
	(mit $N_u = 2.000$)	(mit $N_{RPS} = 2.000$)			
	Di-Ahx·HCl	Di-Ahx·HCl-d₄			
	$I_{u,Cl^-H_3N^+-CH_2-}$	$I_{RPS,Cl^-H_3N^+-CH_2-}$			
19	1.994	0.157	92.13		
20	1.994	0.164	91.72	91.93	0.18
21	1.994	0.161	91.93		
	(mit $N_u = 2.000$)	(mit $N_{RPS} = 2.000$)			
	$I_{u,-CH_2-CONH-}$	$I_{RPS,-CH_2-CONH-}$			
22	2.032	0.127	93.75		
23	2.033	0.131	93.55	93.65/ 86.6 ^[a]	0.09
24	2.032	0.129	93.65		
	(mit $N_u = 2.000$)	(mit $N_{RPS} = 2.000$)			
	Tri-Ahx·HCl	Tri-Ahx·HCl-d₄			
	$I_{u,Cl^-H_3N^+-CH_2-}$	$I_{RPS,Cl^-H_3N^+-CH_2-}$			
25	2.019	0.179	91.13		
26	2.025	0.213	89.48	90.13	0.79
27	2.027	0.207	89.79		
	(mit $N_u = 2.000$)	(mit $N_{RPS} = 2.000$)			
	$I_{u,-CH_2-CONH-}$	$I_{RPS,-CH_2-CONH-}$			
28	1.945 ^[b]	0.096 ^[b]	95.06		
29	1.945 ^[b]	0.106 ^[b]	94.55	94.77/ 84.4 ^[a]	0.22
30	1.948 ^[b]	0.103 ^[b]	94.71		
	(mit $N_u = 2.000$)	(mit $N_{RPS} = 2.000$)			

[a] Aus dem Verhältnis der Signale im ²H-NMR-Spektrum bestimmter Markierungsgrad (berechnet mit Gleichung 3); [b] Da sowohl das unmarkierte Signal $I_{u,-CH_2-CONH-}$ und das Restprotonensignal $I_{RPS,-CH_2-CONH-}$ von einer weiteren CH₂-Gruppe überlagert sind, konnte der Markierungsgrad an dieser Position nur näherungsweise bestimmt werden. Es wurde angenommen, dass die Protonenzahl der überlagernden CH₂-Gruppe exakt 2.000 beträgt.

Vergleicht man die Markierungsgrade der BADGE·BPA-Derivate untereinander (Tabelle 8, Messungen 1 bis 12), erkennt man, dass das prozentuale Verhältnis von Deuterium zu Wasserstoff beim

BADGE·BPA-d₁ und BADGE·2BPA-d₂ am höchsten ist. Das liegt daran, dass die Deuterierung im letzten Reaktionsschritt eingeführt wurde. Der Deuterierungsgrad von 97.80 % bei BADGE·BPA-d₁ bzw. 97.60 % bei BADGE·2BPA-d₂ stimmt mit dem erwarteten Wert überein, denn das für die Reaktion eingesetzte Reagenz besaß einen Markierungsgrad von 98 atom % D. Die Markierungsgrade bei BADGE·BPA·H₂O-d₁ und BADGE·BPA·HCl-d₁ sind kleiner als bei oben genannten Verbindungen, da sie in einer zusätzlichen Stufe aus dem markierten Dimer synthetisiert wurden. Der geringfügige Verlust der eingeführten Markierung ist auf die harschen Reaktionsbedingungen zurückzuführen. Vor allem die Reaktion zum Hydrolyseprodukt, dem BADGE·BPA·H₂O-d₁ erforderte stark saure Reaktionsbedingungen, das spiegelt sich in einem niedrigeren Markierungsgrad wider.

Bei den Aminohexansäure-Derivaten (Tabelle 8, Messungen 13 bis 30) wurde die Markierung in der ersten Stufe eingeführt, bis zum ε-Caprolactam-d₄, zur Di- und Tri-6-Aminohexansäure-d₄ folgten noch zwei, sechs bzw. acht Stufen. Insgesamt konnten ab der Stufe des ε-Caprolactams-d₄ trotz der mehrstufigen Synthesewege keine großen Verluste der eingeführten Markierung festgestellt werden. Bei der Tri-6-Aminohexansäure-d₄ konnte der Markierungsgrad an der Position der $-\text{CD}_2\text{-CONH-}$ Gruppe wegen der Überlagerung mit einem anderen Signal nur näherungsweise bestimmt werden. Für diese Verbindung wurde ein neuer Ansatz zur Markierungsgradbestimmung entwickelt, bei dem das ²H-NMR-Spektrum zur Hilfe genommen wurde. Wenn der Markierungsgrad von mindestens einer der Deuterium-haltigen Protonengruppe bestimmt werden kann ($\%(D/H)_1$), so kann dieser Wert zusammen mit dem Verhältnis der Deuteriumatome aus dem ²H-NMR-Spektrum zur Berechnung des Markierungsgrades von einer weiteren Deuterium-haltigen Protonengruppe ($\%(D/H)_2$) herangezogen werden. Es ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\%(D/H)_2 = \frac{I_{D,2} \cdot N_{D,1}}{I_{D,1} \cdot N_{D,2}} \cdot \%(D/H)_1 \quad (3)$$

Die Methode wurde für alle Aminohexansäure-Derivate angewandt und die erhaltenen Werte in der Tabelle 8 mit [a] gekennzeichnet. Vergleicht man die Ergebnisse aller drei Verbindungen mit den Ergebnissen der ersten Methode, so fällt auf, dass die mit Gleichung 3 bestimmten Werte große Abweichungen gegenüber den mit Gleichung 2 bestimmten Werten zeigen. Daraus folgt, dass die Empfindlichkeit der zweiten Methode (Berechnung mit Gleichung 3) nicht genügend war.

Betrachtet man die mit Gleichung 2 bestimmten Markierungsgrade, so liegen die Werte bei BADGE·BPA-Derivaten zwischen 92.78 und 97.80 % und bei Aminohexansäure-Derivaten zwischen 90.13 und 94.77 %, die relativen Standardabweichungen liegen zwischen 0.00 und 0.79 %.

I.3.5 Stabilitätsuntersuchungen der synthetisierten Referenzmaterialien

Als Erstes wurde die Stabilität der Reinsubstanzen in Methanol/Wasser-Gemischen untersucht. Der Test sollte Auskunft über die Lagerstabilität von verwendeten Stamm- und Arbeitslösungen geben. Alle Stabilitätsuntersuchungen erfolgten mittels der HPLC-DAD (für Geräteparameter siehe II.1.2, für Methodenparameter II.2). Die Reinsubstanzen wurden in Methanol/Wasser-Gemischen verschiedener Zusammensetzung gelöst und für 7 Tage entweder bei 4 °C (ohne Licht) oder Raumtemperatur gelagert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der Abbildung 3 dargestellt, die Wiederfindungen von allen Substanzen wurden in drei Gruppen und jede Gruppe in zwei Untergruppen untergeteilt. Jede Gruppe entspricht einer getesteten Lösungsmittelzusammensetzung, wobei der Wassergehalt

von links nach rechts zunimmt. Eine Untergruppe bilden Wiederfindungen der Substanzen nach der Lagerung für 7 Tage bei einer getesteten Temperatur.

Wie man der Abbildung 3 entnehmen kann, zeigten alle BADGE-BPA-Derivate eine langsame Zersetzung mit zunehmendem Wassergehalt im Gemisch. Dieser Effekt war vor allen bei BADGE-2BPA sehr ausgeprägt, nach einer Woche Lagerung bei 4 °C lagen die Wiederfindungsraten bei 100 % in einer Lösung mit einem Wasseranteil von 10 %, bei 90 % in einer Lösung mit einem Wasseranteil von 50 % und bei 50 % in einer Lösung mit einem Wasseranteil von 99 %. Nach der Lagerung bei Raumtemperatur zeigte das BADGE-2BPA eine Wiederfindung von 0 % in allen untersuchten Gemischen. Daraus lässt sich ableiten, dass wässrige Arbeitslösungen nur begrenzt haltbar sind. Die Stammlösungen der BADGE-BPA-Derivate wurden in Methanol angesetzt und bei -20 °C gelagert.

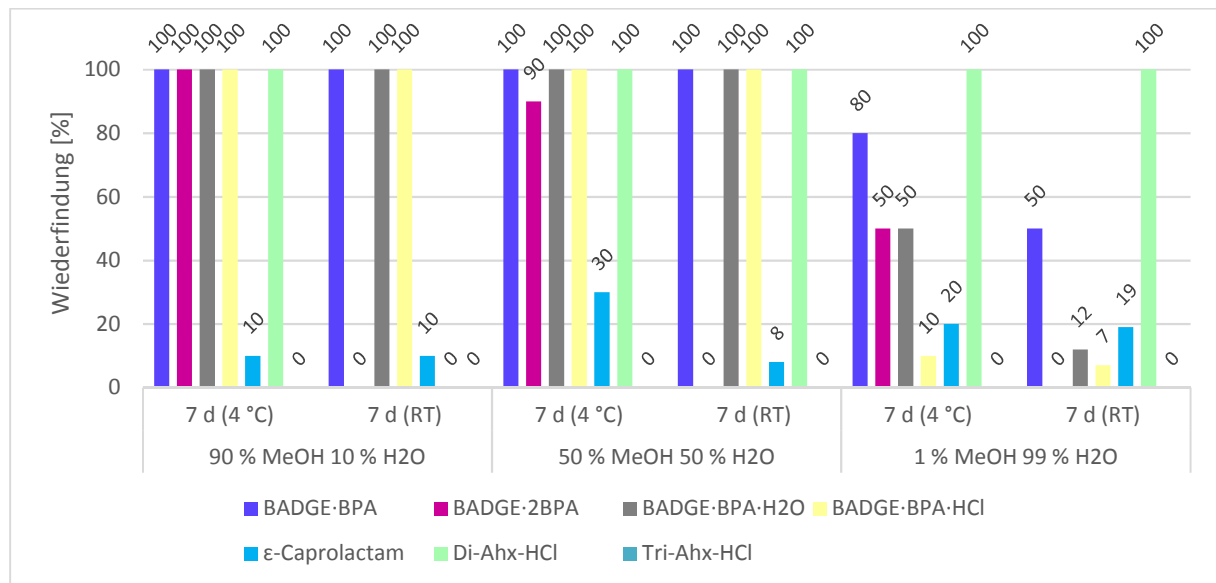


Abbildung 3: Stabilität der Reinsubstanzen in Methanol/Wasser-Gemischen nach 7 Tagen Lagerung.

Das ε-Caprolactam zeigte in Methanol/Wasser-Gemischen unabhängig vom Methanolanteil niedrige Wiederfindungsraten zwischen 7 und 30 %, es wird vermutet, dass die Verbindung unter diesen Bedingungen hydrolysiert. Folglich wurden die Stammlösungen des ε-Caprolactams in Acetonitril angesetzt und bei -20 °C gelagert. Die Di- und Tri-6-Aminohexansäuren zeigen nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur in 90 % Methanol und 10 % Wasser eine Wiederfindungsrate von 0 %, unter allen anderen Lagerungsbedingungen lag die Wiederfindungsrate von Di-6-Aminohexansäure bei 100 % und von Tri-6-Aminohexansäure bei 0 %. Daraus resultiert, dass sich ein hoher Methanolanteil im Gemisch negativ auf die Stabilität der Oligomere von 6-Aminohexansäuren auswirkt, dieser Effekt ist bei der Tri-6-Aminohexansäure deutlich ausgeprägter als bei der Di-6-Aminohexansäure. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Beobachtungen, die bei der Reinheitsbestimmung gemacht wurden, es konnte NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden, dass in Methanol gelösten 6-Aminohexansäuren zu den entsprechenden Methylestern abreagieren. Nun konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion auch bei einer 1%igen Methanol-Lösung in Wasser eintritt. Daher wurden die Stammlösungen der 6-Aminohexansäuren in Wasser angesetzt und bei 4 °C gelagert. Für die Herstellung von Arbeitslösungen wurde entweder Wasser oder Acetonitril verwendet.

Die Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse einer Modellstudie zur Stabilität der BADGE-BPA-Derivate in Lebensmittelsimulanzien. Der Hintergrund der Studie war zu untersuchen, inwiefern die synthetisierten Substanzen in Lebensmittelsimulanzien stabil sind und daraus auf die Stabilität in

Lebensmitteln mit unterschiedlichen Eigenschaften wie Alkoholgehalt, Acidität, hydrophiler oder lipophiler Charakter zu schließen. Die Reinsubstanzen wurden für 7 Tage bei 4 °C (ohne Licht) und bei Raumtemperatur gelagert. Als Medien dienten die von der Verordnung 10/2011^[1] genannten Lebensmittelsimulanzien, welche für die Prüfung der Migration aus Kunststoffverpackungen festgelegt wurden. Jede Lebensmittelsimulanz lässt sich einer Gruppe von Lebensmitteln zuordnen. Die Lebensmittelsimulanzien A (10 Vol.-% Ethanol), B (3 Gew.-% Essigsäure) und C (20 Vol.-% Ethanol) sollen Lebensmittel mit hydrophilen Eigenschaften und die Lebensmittelsimulanzien D1 (50 Vol.-% Ethanol) und D2 (pflanzliches Öl) Lebensmittel mit lipophilen Eigenschaften repräsentieren.

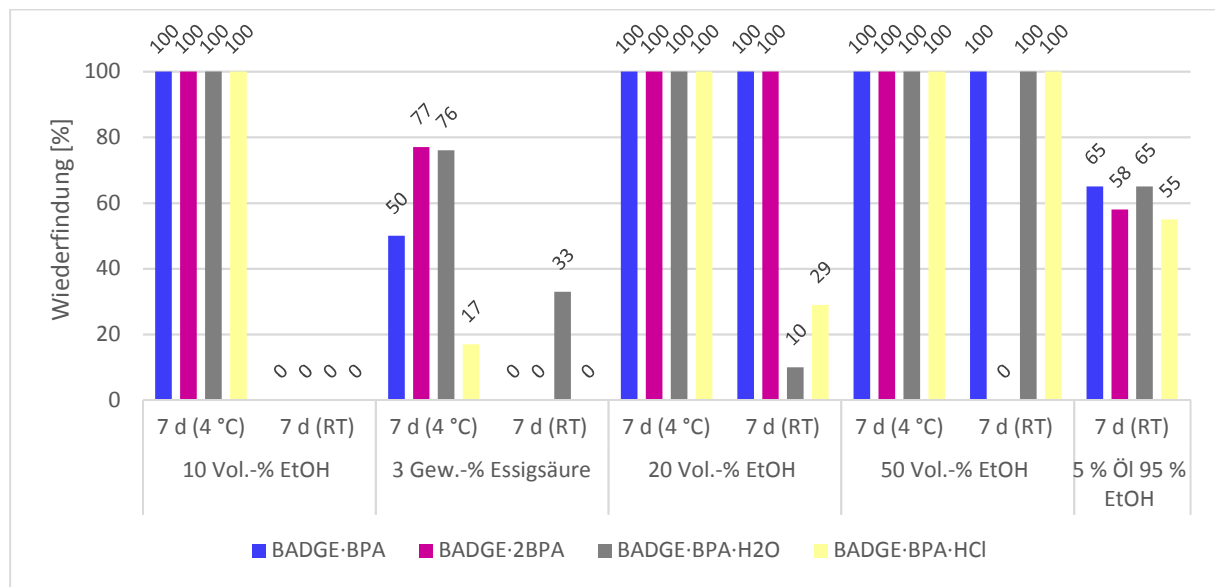


Abbildung 4: Stabilität der Reinsubstanzen in Lebensmittelsimulanzien nach 7 Tagen Lagerung.

Betrachtet man die Ergebnisse der Stabilität von BADGE-BPA-Derivaten bei Raumtemperatur in Lebensmittelsimulanzien A, C und D1 (sinkender Wassergehalt), so stellt man fest, dass die Stabilität der Reinsubstanzen – analog zu vorheriger Untersuchung in Methanol/Wasser-Gemischen – mit zunehmendem Wassergehalt abnimmt. Generell lässt sich sagen, dass die Lagerung in den Lebensmittelsimulanzien bei 4 °C zu keinem oder geringem Abbau führt. Verluste konnten bei den Lebensmittelsimulanzien B und D2 verzeichnet werden. Diese sind vermutlich bei dem Lebensmittelsimulanz B auf die Acidität des Mediums und bei dem Lebensmittelsimulanz D2 auf Reaktionen mit den Bestandteilen des Pflanzenöls zurückzuführen. Alle BADGE-BPA-Derivate zeigten nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur in Lebensmittelsimulanz D2 einen Doppelpeak. Aufgrund eines ähnlichen chromatographischen Verhaltens, kann angenommen werden, dass die Zersetzungsprodukte eine verwandte Struktur aufweisen. Daraus folgt, dass es sich empfiehlt die zu untersuchenden Proben bis zur Analyse kalt zu stellen, um einem Abbau der Analyten und möglichen Reaktionen mit Probeninhaltsstoffen vorzubeugen. Zusammenfassend konnte mit dieser Studie gezeigt werden, dass die Stabilität der BADGE-BPA-Derivate unabhängig vom Alkoholgehalt, jedoch abhängig von der Acidität sowie von den hydrophilen bzw. lipophilen Eigenschaften der Lebensmittelsimulanz war.

I.3.6 Entwicklung der LC-MS/MS-Methode in hydrophilen Lebensmitteln

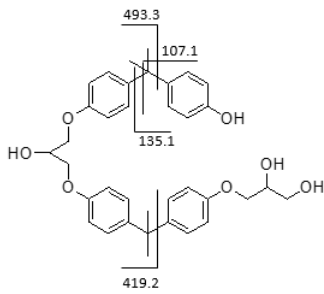
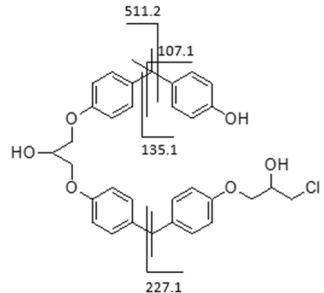
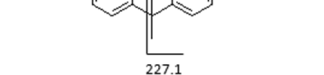
Tuning und Fließinjektionsanalyse

Das Einmessen der synthetisierten unmarkierten und markierten Standards erfolgte in einer geeigneten Konzentration mittels Direktinfusion in die ESI-MS/MS mit Hilfe einer Spritzenpumpe. Das Tuning wurde für alle Standards in Acetonitril und in Methanol als Lösungsmittel durchgeführt, dabei stellte sich heraus, dass die Lösungen der Analyten in Methanol deutlich intensivere Fragmente lieferten. Von jedem Analyten wurden $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ sowie $[M+Na]^+$ -Adduktionen untersucht. Die $[M+Na]^+$ -Adduktionen der Analyten haben sich als sehr stabil erwiesen und lieferten keine Fragmentionen. Die Ionisierung der Ammoniumaddukte war für alle Analyten deutlich stärker, weshalb ausschließlich diese in der weiteren Methodenentwicklung verwendet wurden.

Tabelle 9: Übersicht über die zwei bis vier intensivsten Fragmentionen der synthetisierten Standards

Analyt bzw. Isotopenstandard	Vorläuferion $[M+NH_4]^+$	Fragmentionen	Summenformel (berechnete Masse)	Fragmentierungsvorschläge für die synthetisierten Standards
Cyclo-di-BADGE	586.3	107.6 135.4 569.3	$C_7H_7O^+$ (107.1) $C_9H_{11}O^+$ (135.1) $C_{36}H_{41}O_6^+$ (569.3)	
BADGE ·BPA	586.3	135.4 191.0 419.0 474.9	$C_9H_{11}O^+$ (135.1) $C_{12}H_{15}O_2^+$ (191.1) $C_{27}H_{31}O_4^+$ (419.2) $C_{30}H_{35}O_5^+$ (475.3)	
BADGE ·BPA-d ₁	587.3	420.1 476.1	$C_{27}H_{30}DO_4^+$ (420.2) $C_{30}H_{34}DO_5^+$ (476.3)	
BADGE ·2BPA	814.4	106.9 135.2 419.3 703.4	$C_7H_7O^+$ (107.1) $C_9H_{11}O^+$ (135.1) $C_{27}H_{31}O_4^+$ (419.2) $C_{45}H_{51}O_7^+$ (703.4)	

Tabelle 9: Fortsetzung

Analyt bzw. Isotopenstandard	Vorläuferion [M+NH ₄] ⁺	Fragmentionen	Summenformel (berechnete Masse)	Fragmentierungsvorschläge für die synthetisierten Standards
BADGE ·2BPA-d ₂	816.4	420.3 705.3	C ₂₇ H ₃₀ DO ₄ ⁺ (420.2) C ₄₅ H ₄₉ D ₂ O ₇ ⁺ (705.4)	
BADGE ·BPA·H ₂ O	604.3	135.4 209.0 419.0 493.0	C ₉ H ₁₁ O ⁺ (135.1) C ₁₂ H ₁₇ O ₃ ⁺ (209.1) C ₂₇ H ₃₁ O ₄ ⁺ (419.2) C ₃₀ H ₃₇ O ₆ ⁺ (493.3)	
BADGE ·BPA·H ₂ O- d ₁	605.3	420.1 494.0	C ₂₇ H ₃₀ DO ₄ ⁺ (420.2) C ₃₀ H ₃₆ DO ₆ ⁺ (494.3)	
BADGE ·BPA·HCl	622.2	135.4 226.9 419.1 511.0	C ₉ H ₁₁ O ⁺ (135.1) C ₁₂ H ₁₆ ClO ₂ ⁺ (227.1) C ₂₇ H ₃₁ O ₄ ⁺ (419.2) C ₃₀ H ₃₆ ClO ₅ ⁺ (511.2)	
BADGE ·BPA·HCl-d ₁	623.2	420.0 512.0	C ₂₇ H ₃₀ DO ₄ ⁺ (420.2) C ₃₀ H ₃₅ DClO ₅ ⁺ (512.2)	

In der obenstehenden Tabelle wurden die beim Tuning erhaltenen zwei bis vier Fragmentationen zusammen mit einer zugehörigen Summenformel und der berechneten Masse zusammengestellt. Weiterhin wurde für jedes Fragmentation ein Strukturvorschlag gemacht. Wie aus der Tabelle 9 hervorgeht, zeigt jeder Analyt für BADGE- bzw. Bisphenol A-Derivate charakteristische Fragmentationen: m/z 107 und 135. Es fällt auf, dass im Gegensatz zum Cyclo-di-BADGE jedes der vier BADGE-BPA-Derivate das Fragmentation m/z 419.2 bildet. Darüber hinaus besitzt jedes untersuchte BADGE-BPA-Derivat ein charakteristisches Fragmentation: m/z 475.3 (BADGE-BPA), m/z 703.4 (BADGE·2BPA), m/z 493.3 (BADGE·BPA·H₂O) und m/z 511.2 (BADGE·BPA·HCl).

Die Fließinjektionsanalyse (FIA) wurde wie das Tuning für alle Analyten in Acetonitril und in Methanol durchgeführt, auch hier lieferten die im Methanol gelösten Analyten deutlich intensivere Fragmente. Die bestimmten MS/MS-Parameter sind in den Tabellen 10 und 11 dargestellt.

Tabelle 10: Bei der Fließinjektionsanalyse ermittelte MS/MS-Parameter, Teil 1. Als Lösungsmittel wurde Methanol verwendet.

Analyt bzw. Isotopenstandard	Optima					
	CUR	IS	TEM	GS1	GS2	CAD
Cyclo-di-BADGE	30	5500	750/625	90/70	90/70	High/Medium
BADGE·BPA	30	5500	750/625	90/70	90/70	High/Medium
BADGE·BPA-d ₁	36.6/40	5500	400	67.5/90	45/67.5	Low/Medium
BADGE·2BPA	30	4125/ 5500	300/400	22.5/67.5	90/67.5	Medium/High
BADGE·2BPA-d ₂	30	5500	750/625	70/90	90/70	Medium/High
BADGE·BPA·H ₂ O	30	5500	750/625	90/70	90/70	Medium/High
BADGE·BPA·H ₂ O-d ₁	30	5500	750/625	90/70	90/70	High/Medium
BADGE·BPA·HCl	30	5500	750/625	90/70	90/70	High/Medium
BADGE·BPA·HCl-d ₁	30	5500	750/625	90/70	70/90	Low/Medium
gewählte Parameter	30	550	625	90	90	High

Abkürzungen: CUR: Schutzgas; IS: Ionisierungsspannung; TEM: Temperatur; GS1: Zerstäubergas; GS2: Hilfgas; CAD: Kollisions-aktiviertes Dissoziationsgas.

Tabelle 11: Bei der Fließinjektionsanalyse ermittelte MS/MS-Parameter, Teil 2

Analyt bzw. Isotopenstandard	Massenübergang m/z	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Cyclo-di-BADGE	586.3 → 135.4 ^[a]	51	10	43	4
	586.3 → 569.3	51	10	25	16
BADGE·BPA	586.3 → 135.4 ^[a]	44	10	41	6
	586.3 → 419.0	44	10	27	16
BADGE·BPA-d ₁	587.3 → 420.1	96	10	26	10
BADGE·2BPA	814.4 → 135.2 ^[a]	56	10	61	12
	814.4 → 703.4	56	10	33	26
BADGE·2BPA-d ₂	816.4 → 705.3	1	10	31	20
BADGE·BPA·H ₂ O	604.3 → 135.4 ^[a]	49	10	53	4
	604.3 → 493.3	49	10	25	13
BADGE·BPA·H ₂ O-d ₁	605.3 → 494.0	51	10	25	14
BADGE·BPA·HCl	622.2 → 226.9 ^[a]	74	10	33	15
	622.2 → 511.0	74	10	25	17
BADGE·BPA·HCl-d ₁	623.2 → 512.0	56	10	25	10

[a] Quantifier-Ionen. Abkürzungen: DP: Declustering-Potential; EP: Eintrittspotential; CE: Kollisionsenergie; CXP: Zellaustrittspotential.

Entwicklung einer HPLC-Methode

Nachdem die ESI-MS/MS-Parameter für alle Verbindungen ermittelt wurden, wurde die chromatographische Trennung der Substanzen optimiert. Das Cyclo-di-BADGE und das BADGE·BPA sollten über den Massenübergang 586.3 → 135.4 quantifiziert werden. Aus diesem Grund müssen die beiden Analyten während der chromatographischen Trennung eindeutig unterschieden werden können. Die Analyten lieferten eine bessere Ionisierung in methanolischen Lösungen, daher wurde für die chromatographische Trennung Methanol und Wasser verwendet. Zunächst wurde ein Gradient mit 50 % Methanol und 50 % Wasser im Startgradienten getestet, es folgte eine Erhöhung des

Methanolanteils innerhalb von 25 min von 50 auf 100 %. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen eines Gradienten mit 75 % Methanol und 25 % Wasser im Startgradienten und einer Erhöhung des Methanolanteils innerhalb von 25 min von 75 auf 100 % verglichen. Da der Gradient mit einem Methanolanteil von 50 % im Startgradienten bessere Trennung von Cyclo-di-BADGE und BADGE-BPA lieferte, wurde dieser für die weitere Optimierung verwendet. Für diesen Gradienten wurden vier verschiedene Säulentemperaturen getestet: 25 °C, 30 °C, 35 °C und 40 °C. Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass die Methode bei einer Säulentemperatur von 35 °C die intensivsten Fragmente lieferte. Da jedoch die Trennung von Cyclo-di-BADGE und BADGE-BPA im Vordergrund stand, bot sich die Methode mit einer Säulentemperatur von 40 °C besser an. Als Nächstes wurden bei dem Gradienten Stufen mit unterschiedlichem Anstieg des Methanolanteils getestet. Somit konnte die Trennung von Cyclo-di-BADGE und BADGE-BPA von anfangs 0.20 min auf 0.35 min optimiert werden. Die chromatographische Trennung der Analyten und der Isotopenstandards in einer Konzentration von jeweils 5 µg/L ist in der untenstehenden Abbildung gezeigt.

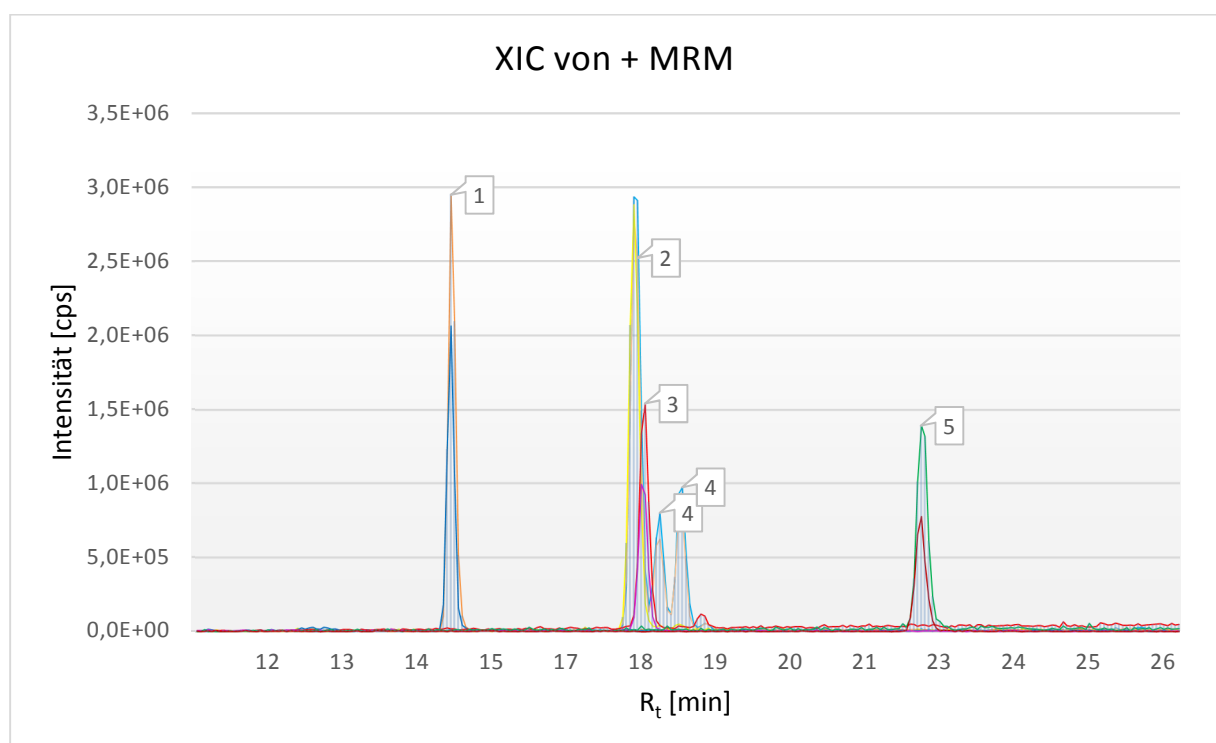


Abbildung 5: Das extrahierte Ionenchromatogramm (XIC) von vier BADGE-BPA-Derivaten, der zugehörigen Isotopenstandards und Cyclo-di-BADGE (jeweils $c = 5 \mu\text{g/L}$) im ESI (+) Modus. Abgebildet ist der Abschnitt zwischen 11 und 26 min. Zuordnung der Analyten: 1: BADGE-BPA-H₂O + NH₄⁺ (m/z 604.3 → 135.4) und BADGE-BPA-H₂O-d₁ + NH₄⁺ (605.3 → 494.0); 2: BADGE-BPA + NH₄⁺ (m/z 586.3 → 135.4) und BADGE-BPA-d₁ + NH₄⁺ (587.3 → 420.1); 3: BADGE-BPA-HCl + NH₄⁺ (m/z 622.2 → 226.9) und BADGE-BPA-HCl-d₁ + NH₄⁺ (623.2 → 512.0); 4: cis- und trans-Cyclo-di-BADGE (m/z 586.3 → 135.4); 5: BADGE-2BPA + NH₄⁺ (m/z 814.4 → 135.2) und BADGE-2BPA-d₂ + NH₄⁺ (816.4 → 705.3).

Weitere Geräte- und Methodenparameter wurden in den Abschnitten II.1.3 und II.2 zusammengestellt.

I.3.7 Validierung der LC-MS/MS-Methode in hydrophilen Lebensmitteln

I.3.7.1 Grundkalibrierung

Die Kalibriergeraden der BADGE·BPA-Derivate zeigten aufgrund der d₁-Isotopenmarkierung über den untersuchten Konzentrationsbereich von 0.1 bis 100 µg/L eine Regressionsgerade zweiter Ordnung. Für die Abweichungen von der Linearität gibt es zwei Gründe. Betrachtet man das Analytsignal bei einer Masse M + 1, so setzt sich die Signalintensität neben dem Analyten selbst aus dem nicht markiertem Anteil des Isotopenstandards. Wie im Abschnitt I.3.4. gezeigt, liegen die bestimmten Markierungsgrade der BADGE·BPA-Derivate zwischen 97.80 % für BADGE·BPA-d₁ und 92.78 % für BADGE·BPA·H₂O-d₁, daraus folgt, dass die Isotopenstandards von BADGE·BPA-Derivaten einen Anteil des Analyten enthalten, der je nach Derivat zwischen 2.20 und 7.22 % liegt. Ein weiterer Grund für die Abweichungen von der Linearität ist die spektrale Überlappung des Restkohlenstoffsignals des Analyten (1.1 % pro Kohlenstoffatom) bei einer Masse von M+1, die mit dem Molekülpeakion des d₁-markierten Standards identisch ist. Der Anteil der spektralen Überlappung der nicht markierten drei BADGE·BPA-Derivate bei einer Masse M + 1 mit den Molekülpeakionen der d₁-markierten Derivate, liegt bei 36 Kohlenstoffatomen bei ca. 40 %. Der Anteil der spektralen Überlappung des nicht markierten BADGE·2BPA bei einer Masse M + 2 mit den Molekülpeakionen des d₂-markierten Derivats, liegt bei 52 Kohlenstoffatomen bei ca. 17 %. Aufgrund dessen wurde ein rechnerischer Ansatz von Bush und Trager zur Linearisierung der Kalibrierfunktionen zweiter Ordnung^[57] angewandt. Dieser Ansatz beruht auf einer Korrektur des Verhältnisses der gemessenen Ionenintensitäten der unmarkierten Verbindung in der Probe zum verwendeten Isotopenstandard. Der Zusammenhang lautet:

$$y = \frac{c_{IS}}{c_A + c_{IS} \cdot l} = b \cdot \frac{A_{IS}}{A_A} + a \quad (4)$$

mit c_{IS} : molare Konzentration der isotopenmarkierten Verbindung, des Isotopenstandards; c_A : molare Konzentration der unmarkierten Verbindung, des Analyten; l : feste Fraktion des Isotopenstandards, welche mit dem nicht markierten Analyten identisch ist; b : die Steigung aus der linearen Regression; a : der Achsenabschnitt aus der linearen Regression; A_{IS} : die eigentlich gemessene Ionenintensität der markierten Verbindung bei einer Masse M + n; A_A : die eigentlich gemessene Ionenintensität der unmarkierten Verbindung.

Der Vorteil dieses Ansatzes gegenüber anderen Ansätzen liegt darin, dass keine Annahmen über die tatsächliche spektrale Überlappung gemacht werden müssen, es werden die gemessenen Ionenintensitäten für die Kalibriergerade verwendet.^[57] Weiterhin handelt es sich um einen linearen Zusammenhang und für die Nutzung der Gleichung in der Praxis müssen nur drei Konstanten bestimmt werden. Die Konstante l , welche die Überlappung des Isotopenstandards mit dem Analyten in der Probe beschreibt, kann bestimmt werden, indem das Spektrum des Isotopenstandards vor der eigentlichen Messung aufgenommen wird.^[57] Die verbleibenden zwei Konstanten b und a können aus der linearen Regression bestimmt werden.^[57] Der Ansatz von Bush und Trager wurde zusammen mit drei anderen Ansätzen zur Linearisierung der Kalibrierfunktionen zweiter Ordnung von Fay et al. getestet, dabei stellte sich heraus, dass der Ansatz von Bush und Trager die geringsten Variationskoeffizienten lieferte.^[58]

Für die Konzentration des Analyten in der Probe ergibt sich nach Umstellung der Gleichung 4:

$$\frac{c_{IS}}{c_A + c_{IS} \cdot l} = b \cdot \frac{A_{IS}}{A_A} + a \quad (4)$$

$$c_{IS} = \left(b \cdot \frac{A_{IS}}{A_A} + a \right) \cdot (c_A + c_{IS} \cdot l)$$

$$c_A + c_{IS} \cdot l = \frac{c_{IS}}{b \cdot \frac{A_{IS}}{A_A} + a}$$

$$c_A = \frac{c_{IS}}{b \cdot \frac{A_{IS}}{A_A} + a} - c_{IS} \cdot l = c_{IS} \cdot \left(\frac{1}{b \cdot \frac{A_{IS}}{A_A} + a} - l \right) \quad (5)$$

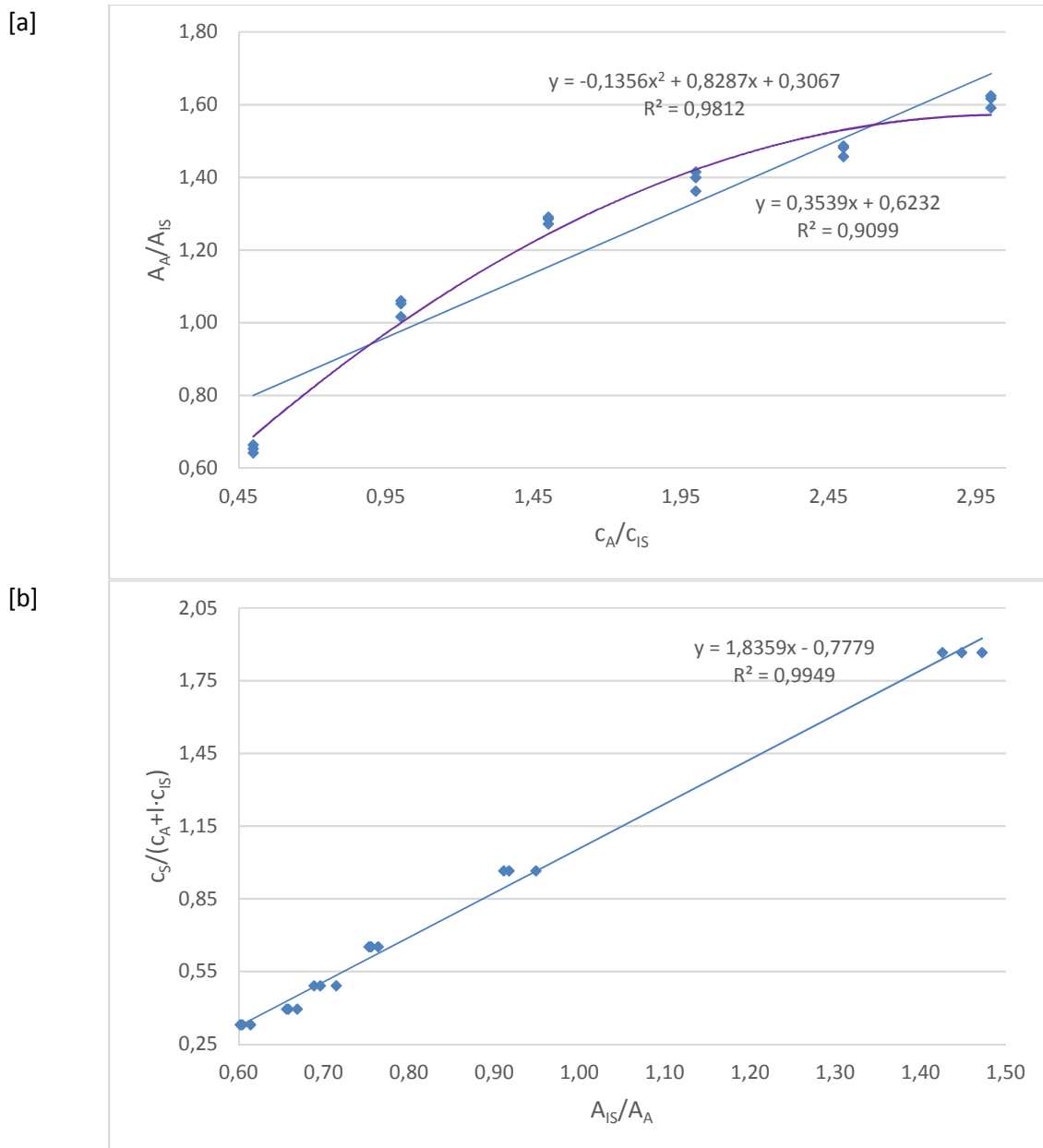


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Kalibriergeraden für BADGE-BPA + NH_4^+ (m/z 586.3 \rightarrow 135.4): [a] vor und [b] nach der Linearisierung mit Hilfe von Gleichung 4. Jeder Kalibrierpunkt wurde in Dreifachbestimmung gemessen.

In der Abbildung 6 ist exemplarisch das Ergebnis der Linearisierung der Kalibrierfunktion für BADGE·BPA + NH₄⁺ (Massenübergang m/z 586.3 → 135.4) gezeigt. In der Abbildung 6a ist die Kalibrierfunktion vor der Linearisierung gezeigt, welche mit Hilfe einer linearen und quadratischen Regression angepasst wurde, aufgetragen sind die Flächenverhältnisse $\frac{A_A}{A_{IS}}$ gegen die Konzentrationsverhältnisse $\frac{c_A}{c_{IS}}$. In der Abbildung 6b ist die Kalibrierfunktion nach der Linearisierung zu sehen, die Kalibrierkurve wurde unter Verwendung von Gleichung 4 erstellt. Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, wurde eine deutlich bessere Anpassung der Kalibrierfunktion durch die Verwendung von Gleichung 4 ($r^2 = 0.9949$) als bei der linearen ($r^2 = 0.9099$) und quadratischen ($r^2 = 0.9812$) Regression erreicht.

Zur Aufnahme der Lösungsmittelkalibration wurde unter Berücksichtigung der zuvor bestimmten Reinheiten eine Mischung aller Analyten und eine Mischung der Isotopenstandards jeweils in der Konzentration von 10 mg/L angesetzt. Die Kalibrierstandards wurden mit Verdünnungen der Standard- und Isotopenstandardmischung vorbereitet, wobei Konzentrationen aller Analyten von 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 und 15.0 µg/L und der Isotopenstandards von 5.0 µg/L in 50 % Methanol und 50 % Wasser resultierten. In der Tabelle 12 wurden die Ergebnisse der Grundkalibrierung vor und nach der Anwendung der Linearisierung von Bush und Trager für die Quantifier-Ionenspuren aller Analyten dargestellt. Zwecks besserer Vergleichbarkeit wurden für die nicht linearisierten Regressionsgeraden dieselben Konzentrationsbereiche verwendet. Alle nicht linearisierten Kalibriergeraden der BADGE·BPA-Derivate lieferten eine signifikant bessere Anpassung durch quadratische Regression wie in der Abbildung 6 am Beispiel von BADGE·BPA gezeigt ist. Da für Cyclo-di-BADGE kein Isotopenstandard zur Verfügung stand, wurden die Gehalte von diesem Analyten über eine externe Kalibrierung ausgewertet. Wie aus den in der Tabelle 12 zusammengestellten Bestimmtheitsmaßen ($r^2 > 0.99$) folgt, konnte für alle BADGE·BPA-Derivate ein besseres Ergebnis nach der Durchführung der Linearisierung erzielt werden.

Tabelle 12: Die Kenndaten der Grundkalibrierung für die Methode in hydrophilen Matrices. Es handelt sich um Daten der Quantifier-Ionenspuren. Jeder Kalibrierpunkt wurde in Dreifachbestimmung gemessen.

Analyt	Massen- übergang m/z	Steigung [L·count/µg bzw. µg/(L·count) ^[a]]	Achsen- abschnitt [count bzw. µg/L ^[a]]	Arbeits- bereich [µg/L]	r ²
Cyclo-di-BADGE	586.3 → 135.4	3477091	243441	0.5–12.5	0.9938
BADGE·BPA	586.3 → 135.4	1.8359 ^[a]	-0.7779 ^[a]	2.5–15.0	0.9949 ^[a]
		0.3539	0.6232	2.5–15.0	0.9099
BADGE·BPA·H ₂ O	604.3 → 135.4	2.2851 ^[a]	-0.7122 ^[a]	1.0–15.0	0.9913 ^[a]
		0.5355	0.6234	1.0–15.0	0.8817
BADGE·BPA·HCl	622.2 → 226.9	2.0997 ^[a]	-0.5417 ^[a]	1.0–15.0	0.9957 ^[a]
		0.6379	0.5611	1.0–15.0	0.9146
BADGE·2BPA	814.4 → 135.2	2.5987 ^[a]	-0.3924 ^[a]	1.0–15.0	0.9931 ^[a]
		1.1596	0.3998	1.0–15.0	0.9482

[a] Nach der Linearisierung erhaltenen Daten.

1.3.7.2 Matrixkalibrierung

Zur Untersuchung der Matrixeffekte wurde eine Leermatrix mit Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen dotiert. Da diese Methode für die Untersuchung von Bieren aus der Dose angewandt wurde, konnte als Leermatrix ein Flaschenbier verwendet werden.

Probenvorbereitung

Zum Homogenisieren der Probe wurde das Referenzbier umgeschwenkt und ca. 20 ml Probe in eine 50 ml Schottflasche überführt, für 10 min im Ultraschallbad entgast und anschließend über ein 0.2 µm PA Spritzenfilter filtriert. Jeweils 1 ml des Filtrats wurde mit Verdünnungen der Standard- und der Isotopenstandardmischung versetzt, es resultierten Analytkonzentrationen von 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 und 15.0 µg/L und Konzentrationen der Isotopenstandards von 5.0 µg/L. Die Ergebnisse der Kalibrierung über Matrixstandards sind in der untenstehenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 13: Die Kenndaten der Matrixkalibrierung für die Methode in hydrophilen Matrices. Es handelt sich um Daten der Quantifizier-Ionenspuren.

Analyt	Massen- übergang m/z	Steigung [L·count/µg bzw. µg/(L·count) ^[a]]	Achsen- abschnitt [count bzw. µg/L ^[a]]	Arbeits- bereich [µg/L]	r ²
Cyclo-di-BADGE	586.3 → 135.4	924880	587699	2.0–15.0	0.9913
BADGE·BPA	586.3 → 135.4	1.6037 ^[a]	-0.3656 ^[a]	2.0–15.0	0.9986 ^[a]
BADGE·BPA·H ₂ O	604.3 → 135.4	2.1763 ^[a]	-0.4388 ^[a]	2.0–15.0	0.9953 ^[a]
BADGE·BPA·HCl	622.2 → 226.9	1.3856 ^[a]	-0.2557 ^[a]	2.0–15.0	0.9946 ^[a]
BADGE·2BPA	814.4 → 135.2	0.9553 ^[a]	0.0513 ^[a]	2.0–15.0	0.9780 ^[a]

[a] Nach der Linearisierung erhaltenen Daten.

Vergleicht man die Daten aus Tabelle 12 mit denen aus Tabelle 13, so stellt man fest, dass für alle Analyten Matrixeffekte festgestellt werden konnten, daher erfolgte die Quantifizierung über die Matrixstandards. Als Nächstes wurde die Präzision von Serie zu Serie und Tag zu Tag für die Matrixkalibration untersucht, um herauszufinden wie häufig die Kalibration durchgeführt werden muss. Dazu wurden jeweils in Einfachbestimmung die Kalibrierstandards der Konzentrationen 2, 3, 5, 8, 10, 12 und 15 µg/L einmal an einem und zweimal am nächsten Tag gemessen. Beim Cyclo-di-BADGE konnten hohe Abweichungen bei der Präzision von Tag zu Tag festgestellt werden, mit Ausnahme von BADGE·2BPA zeigte kein Analyt Abweichungen bei der Präzision von Serie zu Serie. Aufgrund dessen wurde an jedem Messtag eine Kalibriergerade aufgenommen.

Da die Messung eines Standards bei einer Konzentration von 0 µg/L ein Messsignal ergab (es handelt sich um den nicht markierten Anteil des Isotopenstandards), weswegen auch das Linearisierungsverfahren angewandt wurde, konnte die Bestimmungsgrenze nicht mit der Blindwertmethode bestimmt werden. Daher wurde die Bestimmungsgrenze dem kleinsten Kalibrationspunkt gleichgesetzt, dieser betrug für alle Analyten 2 µg/L.

Wiederfindungsexperimente

Um die Matrixkalibrierung zu überprüfen wurden Dotierungsversuche mit drei realen Proben durchgeführt, die drei Dosenbiere enthielten Cyclo-di-BADGE in geringen Konzentrationen. Die

Dosenbiere wurden jeweils mit Standard- und Isotopenstandardlösungen dotiert, so dass Analytkonzentrationen von 0, 3 und 6 µg/L und Isotopenstandardkonzentrationen von 5 µg/ml resultierten. Anschließend wurden die Wiederfindungsraten berechnet, die Ergebnisse für die Quantifier-Ionen aller Analyten sind in der Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14: Ergebnisse der Wiederfindungsversuche für Cyclo-di-BADGE, BADGE·BPA, BADGE·BPA·H₂O und BADGE·BPA·HCl und BADGE·2BPA

Probe + dotierte Standard- konzentration [µg/L]	Cyclo-di- BADGE 586.3 → 135.4		BADGE·BPA 586.3 → 135.4		BADGE·BPA ·H ₂ O 604.3 → 135.4		BADGE·BPA ·HCl 622.2 → 226.9		BADGE·2BPA 814.4 → 135.2	
	\bar{c}_A [µg/L]	WDF [%]	\bar{c}_A [µg/L]	WDF [%]	\bar{c}_A [µg/L]	WDF [%]	\bar{c}_A [µg/L]	WDF [%]	\bar{c}_A [µg/L]	WDF [%]
Probe 1 + 0	0.74		-0.11		-0.13		-0.06		0.92	
Probe 1 + 3	3.57	94	3.32	114	2.79	97	3.47	118	4.97	135
Probe 1 + 6	7.76	117	6.48	110	6.05	103	6.89	116	7.65	112
Probe 2 + 0	1.35		-0.14		0.00		-0.18		0.57	
Probe 2 + 3	4.34	100	3.43	119	3.41	114	2.61	93	5.31	158
Probe 2 + 6	8.34	116	7.05	120	6.68	111	6.07	104	8.16	127
Probe 10 + 0	2.92		-0,11		0.00		-0.11		0.28	
Probe 10 + 3	6.68	125	3.37	116	3.14	105	3.47	120	2.63	78
Probe 10 + 6	9.68	113	5.27	90	6.59	110	5.46	93	6.00	95

Abkürzungen: \bar{c}_A : die mittlere Konzentration des Analyten aus einer Doppelbestimmung, WDF: die Wiederfindungsrate.

Wie aus der obenstehenden Tabelle hervorgeht, konnten für alle untersuchten Analyten mit Ausnahme von BADGE·2BPA akzeptable Wiederfindungsraten zwischen 90 und 125 % erreicht werden.

Messpräzision

Die Messpräzision wurde sowohl für eine Probe als auch für einen mittleren Kalibrationspunkt (5 µg/L) bestimmt. Aufgrund Nichtverfügbarkeit von realen Proben mit Gehalten an BADGE·BPA, BADGE·BPA·H₂O, BADGE·BPA·HCl und BADGE·2BPA wurde die Bestimmung der Messpräzision einer Probe nur für Cyclo-di-BADGE durchgeführt. Jede Probe wurde in Sechsfachbestimmung gemessen und über Matrixstandards ausgewertet. Der Kalibrierstandard einer mittleren Konzentration (5 µg/L) aller Analyten wurde bei allen späteren Messreihen als Qualitätskontrollstandard mitgeführt. Die Tabelle 15 gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse.

Tabelle 15: Überblick über die ermittelten Daten zur Messpräzision von einem mittleren Kalibrationspunkt und einer Probe

	Cyclo-di- BADGE 586.3 → 135.4		BADGE·BPA 586.3 → 135.4		BADGE·BPA ·H ₂ O 604.3 → 135.4		BADGE·BPA ·HCl 622.2 → 226.9		BADGE·2BPA 814.4 → 135.2	
	\bar{c}_A [µg/L]	RSD [%]	\bar{c}_A [µg/L]	RSD [%]	\bar{c}_A [µg/L]	RSD [%]	\bar{c}_A [µg/L]	RSD [%]	\bar{c}_A [µg/L]	RSD [%]
Probe 2	1.72	16								
Kalibrier- standard 5 µg/L	5.25	9	5.71	10	5.63	10	5.51	9	4.96	28

Abkürzungen: \bar{c}_A : die mittlere Konzentration des Analyten aus einer Doppelbestimmung, RSD: relative Standardabweichung.

Die Sechsfachbestimmung des Kalibrierstandards einer mittleren Konzentration lieferte bei allen Analyten mit Ausnahme von BADGE·2BPA (28 %) relative Standardabweichungen zwischen 9 und 10 %, die Messpräzision der Probe lag für Cyclo-di-BADGE bei 16 %. Die bestimmte Messpräzision der Probe für Cyclo-di-BADGE wurde als Messunsicherheit der Gehaltsbestimmung verwendet.

Aufgrund von nicht reproduzierbarem linearem Verhalten (Abweichungen der Präzision von Serie zu Serie der Matrixkalibration sowie Bestimmtheitsmaßen der Matrixkalibration $r^2 < 0.99$), hohen Wiederfindungsraten (78 und 135 %) und hoher Messpräzision (28 %) konnte das BADGE·2BPA in allen zukünftigen Messungen nur qualitativ erfasst werden.

I.3.8 Entwicklung der LC-MS/MS-Methode in lipophilen Lebensmitteln

Tuning und Fließinjektionsanalyse

Die Methode für fettreiche Matrices ist eine Weiterentwicklung der ersten Methode, wobei relevante Bisphenole und BADGE-Derivate und das 3-Ring NOGE in die Methode aufgenommen wurden. Basierend auf den Erkenntnissen aus der Literatur wurden Bisphenole im negativen und BADGE-Derivate im positiven Ionisierungsmodus gemessen.^[8,12] Zunächst wurden die MS/MS-Parameter der Analyten bestimmt. Bezüglich der Ionisierung lässt sich sagen, dass die Oligomere und das 3-Ring NOGE stabile $[M+NH_4]^+$ -Adduktionen, die BADGE-Derivate $[M+H]^+$ -Adduktionen und die Bisphenole $[M-H]^-$ -Adduktionen bildeten. Die während der Fließinjektionsanalyse ermittelten Parameter aller Verbindungen (Declustering-Potential, Eintrittspotential, Kollisionsenergie, Zellaustrittspotential) können dem Abschnitt II.2 entnommen werden. Einen Überblick über die Analyten gibt die untenstehende Tabelle, links sind Analyten aufgelistet, die im ESI(+)-Modus gemessen wurden (Einträge 1 bis 15) und rechts die die im ESI(-)-Modus gemessen wurden (Einträge 16 bis 25).

Tabelle 16: Zusammenstellung der untersuchten Analyten mit zugehörigen CAS-Nummern.

Eintrag	Analyt	CAS	Eintrag	Analyt	CAS
1	BADGE	1675-54-3	16	Bisphenol A	80-05-7
2	BADGE·H ₂ O	76002-91-0	17	Bisphenol B	77-40-7
3	BADGE·2H ₂ O	5581-32-8	18	Bisphenol BP	1844-01-5
4	BADGE·HCl·H ₂ O	227947-06-0	19	Bisphenol E	2081-08-5
5	BADGE·HCl	13836-48-1	20	Bisphenol FL	3236-71-3
6	BADGE·2HCl	4809-35-2	21	Bisphenol G	127-54-8
7	BFDGE	2095-03-6	22	Bisphenol M	13595-25-0
8	BFDGE·2H ₂ O	72406-26-9	23	Bisphenol S	80-09-1
9	BFDGE·2HCl	374772-79-9	24	Bisphenol TMC	129188-99-4
10	3-Ring NOGE	158163-01-0	25	Bisphenol Z	843-55-0
11	BADGE·BPA	194672-62-3			
12	Cyclo-di-BADGE	20583-87-3			
13	BADGE·BPA·H ₂ O	-			
14	BADGE·BPA·HCl	-			
15	BADGE·2BPA	-			

Entwicklung einer HPLC-Methode

Als Nächstes wurden die HPLC-Bedingungen optimiert. Um die hohe Anzahl der Analyten schnell erfassen zu können, wurde eine UPLC-Säule verwendet. Die ersten Versuche wurden mit 50 % Methanol und 50 % Wasser im Startgradienten durchgeführt. Der Methanolanteil von 50 % wurde zunächst für eine halbe Minute gehalten, es folgte eine Erhöhung des Methanolanteils innerhalb von 3.5 min von 50 auf 99 %, welcher für 2 min gehalten wurde. Anschließend wurde der Methanolanteil innerhalb von 0.01 min auf die Startzusammensetzung gebracht und die Säule für 2 min equilibriert. Die Methodendauer betrug insgesamt 8 min. Im Laufe weiterer Optimierungsversuche wurde der Gradient angepasst. Der Methanolanteil im Startgradienten betrug 65 %, welcher für eine halbe Minute gehalten wurde, es folgte eine Erhöhung des Methanolanteils innerhalb von 2.3 min von 65 auf 99 %, die Zusammensetzung der mobilen Phase von 99 % Methanol und 1 % Wasser wurde für 1.2 min gehalten und anschließend innerhalb von 2 min von 99 auf 65 % Methanol erniedrigt. Die Methodendauer konnte somit von 8 auf 6 min reduziert werden. Folglich konnte bei der UPLC-(ESI)-MS/MS-Methode die Zeiteffizienz bei gleichzeitiger Erfassung von insgesamt 25 Analyten im Vergleich zu der HPLC-(ESI)-MS/MS Methode enorm gesteigert werden.

I.3.9 Validierung der LC-MS/MS-Methode in lipophilen Lebensmitteln

I.3.9.1 Grundkalibrierung

Die Stammlösungen der synthetisierten oligomeren Verbindungen und des Cyclo-di-BADGE wurden in Methanol und die kommerziell erworbenen Standards in Acetonitril in einer Konzentration von 1 g/L angesetzt. Für die Kalibrierung wurden die Stammlösungen der Standards in einer Konzentration von 10 mg/L in Acetonitril gemischt und weiter auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt. Zunächst wurden Standards in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µg/L gemessen und die Kalibrierfunktion auf Linearität untersucht. Zur Prüfung der Linearität wurde der Test nach Mandel herangezogen, nach dem die lineare Anpassung eine signifikant bessere Übereinstimmung mit den Messwerten gegenüber einer quadratischen Anpassung liefern soll. Zusätzlich soll das Bestimmtheitsmaß r einen Wert von ≥ 0.99 aufweisen. Bei nichtlinearem Verhalten wurde ein Konzentrationsbereich von 10 bis 100 µg/L getestet.

In der Tabelle 17 sind die ermittelten Kenndaten der Kalibriergeraden: die Bestimmungsgrößen, die Nachweisgrenzen, die Messpräzision und die Wiederfindungsraten für jeden Analyten zusammengestellt. Das Vorgehen zur Untersuchung der Bestimmungsgrößen, der Nachweisgrenze, der Messpräzision und der Wiederfindungsrate ist im Abschnitt I.3.9.2 beschrieben.

Tabelle 17: Die Kenndaten der Grundkalibrierung für die Methode in lipophilen Matrices

Eintrag	Analyt	Steigung [L-count/ µg]	Achsen- abschnitt [count]	Arbeits- bereich [µg/L]	r	BG ^[a]	NG ^[a]	V_{rm} [%]	WDF [%]
1	Bisphenol A	602.9	1496	10–100	0.9801	37.34	18.67	16.6	109– 184
2	Bisphenol B	1069	29.91	1–9	0.9858	0.013	0.004	11.3	130– 217

Tabelle 17: Fortsetzung

Eintrag	Analyt	Steigung [L-count/ µg]	Achsen- abschnitt [count]	Arbeits- bereich [µg/L]	r	BG ^[a]	NG ^[a]	V _{rm} [%]	WDF [%]
3	Bisphenol BP	3852	-285.1	1–10	0.9890	0.035	0.012	9.50	102– 127
4	Bisphenol E	1016	6076	10–80	0.9847	0.132	0.044	19.0	80– 154
5	Bisphenol FL	8522	2774	1–10	0.9972	0.013	0.004	8.28	78– 111
6	Bisphenol G	986.8	13180	10–70	0.9855	0.334	0.111	5.96	147– 186
7	Bisphenol M	35370	320400	10–100	0.9956	0.106	0.035	3.58	100– 120
8	Bisphenol S	27600	7039	1–10	0.9954	0.041	0.014	36.3	88– 282
9	Bisphenol TMC	870.4	1644	1–7	0.9584	0.279	0.093	7.55	123– 155
10	Bisphenol Z	983.9	306.1	1–10	0.9824	0.224	0.075	19.4	98– 172
11	BADGE	100100	6083	1–9	0.9993	0.153	0.051	4.59	45– 52
12	BADGE ·H ₂ O	16340	-1149	1–10	0.9979	7.162	2.387	31.2	68– 153
13	BADGE ·2H ₂ O	36880	21130	1–10	0.9989	0.775	0.259	29.3	56– 108
14	BADGE ·HCl·H ₂ O	213500	171400	1–9	0.9926	0.225	0.075	12.3	53– 72
15	BADGE ·HCl	25180	-8347	1–10	0.9945	0.381	0.127	5.82	38– 53
16	BADGE ·2HCl	2868	-9758	20–90	0.9920	43.68	14.59	8.40	103– 137
17	BFDGE	22940	119200	30–100	0.9971	24.35	8.118	8.34	93– 100
18	BFDGE ·2H ₂ O	5948	196.2	1–6	0.988	21.16	7.054	32.9	-1– 507
19	BFDGE ·2HCl	1514000	1222000	1–9	0.9974	0.039	0.013	3.38	67– 75
20	3-Ring NOGE	5591000	878500	1–9	0.9996	0.010	0.003	4.26	49– 56
21	BADGE ·BPA	673000	112800	1–9	0.9997	0.225	0.075	15.5	10– 13
22	Cyclo-di- BADGE	715600	110400	1–9	0.9990	0.197	0.066	13.8	10– 13
23	BADGE ·BPA·H ₂ O	486600	-1173000	3–9	0.9932	0.330	0.1101	2.75	86– 97
24	BADGE ·BPA·HCl	212200	-8927	1–9	0.9996	0.127	0.042	12.5	9–13
25	BADGE ·2BPA	91250	101400	1–7	0.9842	0.529	0.176	14.2	17– 25

[a] Die Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) wurden mittels der Blindwertmethode ermittelt ($p = 95\%$, $m = 1$). Abkürzungen: V_{rm} : Variationskoeffizient, erzielt bei der Messpräzisionsbestimmung; WDF: Wiederfindungsrate.

Wie der Tabelle 17 entnommen werden kann, zeigten die Bisphenole A, E, G und M sowie BFDGE und BADGE·2HCl eine Linearität zwischen 10 und 100 $\mu\text{g/L}$. Die Oligomere mit Ausnahme von BADGE·BPA·H₂O, einige Derivate von BADGE und BFDGE sowie 3-Ring NOGE zeigten Wiederfindungsraten, die unter dem angestrebten Bereich zwischen 80 bis 120 % lagen. Die meisten Bisphenole zeigen dagegen zu hohe Wiederfindungsraten zwischen 78 und 282 %. Weiterhin waren die Ergebnisse der Messpräzision sowie die Bestimmungsgrenzen einiger Analyten auffällig hoch, besonders hervorzuheben sind Bisphenol A, Bisphenol S, BADGE·H₂O, BADGE·2H₂O, BADGE·2HCl sowie BFDGE·2H₂O. Folglich konnten die Ergebnisse nicht zufriedenstellend mit der Lösungsmittelkalibration beschrieben werden.

1.3.9.2 Matrixkalibrierung

Optimierte Probenvorbereitung

2 g Probe werden in einem 50 mL Falcontube mit 1 mL Cyclohexan versetzt. Die Probe wird mit 5 mL Acetonitril versetzt, auf einem Vortex homogenisiert und bei Raumtemperatur für 30 min in das Ultraschallbad gestellt. Danach werden die Falcontubes für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Acetonitrilphase (oben) wird abgenommen und aufgehoben. Die untere Cyclohexanphase durchläuft die Extraktion noch zweimal. Anschließend werden die Acetonitrilphasen vereinigt und für 1 Stunde bei -18 °C ausgefroren, um die Fettsäuren zu entfernen.

Für die Messung einer Matrixkalibrierung wurden aus den jeweiligen Stammlösungen drei Analytmischungen in der Konzentration von 10 mg/L in Methanol angesetzt. Die erste Analytmischung enthielt alle Bisphenole: A, B, BP, E, FL, G, M, S, TMC und Z, die zweite die Glycidylether und ihre Derivate: BADGE, BADGE·H₂O, BADGE·2H₂O, BADGE·HCl, 3-Ring NOGE, BADGE·HCl·H₂O, BFDGE·2H₂O, BFDGE, BFDGE·2HCl und BADGE·2HCl und die dritte Mischung die Oligomere: BADGE·BPA, Cyclo-di-BADGE, BADGE·BPA·H₂O, BADGE·BPA·HCl und BADGE·2BPA. Aus diesen Mischungen wurden Standardmischungen in Acetonitril in Konzentrationen von 1 und 0.1 mg/L angesetzt. Die Analyten, die in dem Bereich von 10 bis 100 $\mu\text{g/L}$ eine Linearität zeigten (Bisphenole A, E, G und M sowie BFDGE und BADGE·2HCl), wurden in den Standardmischungen in einer zehnfach höheren Konzentration hinzugegeben. Zum Ansetzen der Matrixstandards wurden 2 g Pflanzenöl mit den Standardmischungen (Bisphenole, Glycidylether und Derivate sowie Oligomere) der Konzentrationen 1 und 0.1 mg/L dotiert. Die Proben wurden dann wie bei der Probenvorbereitung beschrieben aufgearbeitet. Nach der Extraktion ergaben sich Konzentrationen von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 $\mu\text{g/L}$. Für die Analyten Bisphenol A, E, G und M sowie BFDGE und BADGE·2HCl lagen die Konzentrationen entsprechend zehnfach höher vor.

Für die Untersuchung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze nach DIN 32645 wurde eine Leerprobe in zehnfacher Bestimmung gemessen. Bei der Leerprobe handelte es sich um Pflanzenöl, welches nach der obengenannten Probenvorbereitung behandelt wurde. Für die Wiederfindungsversuche wurde analytfreie Matrix dotiert, jede Wiederfindung wurde achtfach angesetzt. Dazu wurden 2 g des Pflanzenöls mit den Standardmischungen (Bisphenole, Glycidylether und Derivate sowie Oligomere) der Konzentrationen 1 bzw. 10 mg/L dotiert. Die Wiederfindungen wurden weiter nach der oben beschriebenen Probenvorbereitung aufgearbeitet, nach der Extraktion ergab sich eine Konzentration

von 5 bzw. 50 µg/L. Zur Bestimmung der Messpräzision wurde eine Wiederfindung zwölffach injiziert. In der Tabelle 18 sind die ermittelten Kenndaten der Matrixkalibriergeraden: die Bestimmungsgrenzen, die Nachweisgrenzen, die Messpräzision und die Wiederfindungsraten zusammengestellt.

Tabelle 18: Die Kenndaten der Matrixkalibrierung für die Methode in lipophilen Matrices.

Eintrag	Analyt	Steigung [L·count/ µg]	Achsen- abschnitt [count]	Arbeits- bereich [µg/L]	r	BG ^[a] [µg/L]	NG ^[a] [µg/L]	V _{rm} [%]	WDF [%]
1	Bisphenol A	801.3	-1933	10–90	0.9703	0.217	0.072	2.12	91– 147
2	Bisphenol B	1460	426.5	1–10	0.9820	0.048	0.016	10.8	89– 153
3	Bisphenol BP	5096	-958.9	1–10	0.9960	0.027	0.009	9.26	80–99
4	Bisphenol E	1526	-5272	10–100	0.9854	0.083	0.028	16.5	68– 118
5	Bisphenol FL	10430	-157.1	1–7	0.9995	0.017	0.006	7.79	69–97
6	Bisphenol G	2058	-3057	10–70	0.9951	0.206	0.069	4.63	71–95
7	Bisphenol M	14290	-69720	10–90	0.9914	9.855	3.285	9.22	74–92
8	Bisphenol S	23200	18670	1–10	0.9761	0.046	0.015	38.5	94– 325
9	Bisphenol TMC	3999	-427.1	1–7	0.9907	0.210	0.070	9.84	76–98
10	Bisphenol Z	1358	880.9	1–10	0.9976	0.373	0.124	20.9	62– 116
11	BADGE	53160	7772	1–9	0.9974	0.278	0.093	4.62	83–97
12	BADGE·H ₂ O	23560	71260	1–8	0.9826	6.403	2.134	31.9	42–99
13	BADGE·2H ₂ O	53990	-43560	1–10	0.9937	0.285	0.095	4.52	65–94
14	BADGE·HCl·H ₂ O	37850	-23960	1–10	0.9975	0.325	0.108	1.71	69–99
15	BADGE·HCl	8999	7290	1–8	0.9973	0.983	0.328	5.04	72– 113
16	BADGE·2HCl	3238	-8543	10–70	0.9931	16.41	5.471	14.0	75–95
17	BFDGE	19340	293000	10–90	0.9964	22.13	7.378	3.73	93– 101
18	BFDGE·2H ₂ O	14440	12020	1–9	0.9733	0.616	0.205	8.94	69– 152
19	BFDGE·2HCl	1106000	1383000	1–10	0.9952	0.053	0.018	3.50	89– 100
20	3-Ring NOGE	3454000	282300	1–9	0.9994	0.017	0.006	4.07	82–94
21	BADGE·BPA	141300	-75570	1–9	0.9874	0.946	0.315	10.3	73–90
22	Cyclo-di-BADGE	142900	-69720	1–9	0.9914	0.986	0.329	9.22	74–92
23	BADGE·BPA·H ₂ O	217200	84860	1–9	0.9963	0.740	0.247	6.53	78– 102
24	BADGE·BPA·HCl	24320	963.9	1–9	0.9623	0.859	0.286	13.9	67– 101
25	BADGE·2BPA	48770	24230	1–8	0.9909	0.990	0.330	4.55	63–79

[a] Die Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) wurden mittels der Blindwertmethode ermittelt (p = 95%, m = 1). Abkürzungen: V_{rm}: Variationskoeffizient, erzielt bei der Messpräzisionsbestimmung; WDF: Wiederfindungsrate.

Bei den Analyten BADGE-2HCl und BFDGE wurde die untere Grenze des Arbeitsbereiches mit der entsprechenden Bestimmungsgrenze gleichgesetzt. Der Analyt BADGE-H₂O wurde aus der Methode entfernt, da die ermittelte Bestimmungsgrenze und Messpräzision (31.9 %) zu hoch waren und der Analyt nicht vollständig aus der Matrix extrahiert werden konnte. Bisphenol S zeigte sowohl bei der Auswertung mittels der Lösungsmittel- als auch mit Matrixkalibration zu hohe Wiederfindungsraten, so dass der Analyt ebenfalls nicht quantifiziert werden konnte. Vergleicht man die Ergebnisse der Validierung aus der Tabelle 17 mit denen aus der Tabelle 18, so stellt man fest, dass bei den Bisphenolen, die zu einer Überbestimmung tendierten (78–217 %), die Matrixeffekte etwas reduziert werden konnten (62–153 %). Die Quantifizierung über externe Matrixstandards zeigte auch bei den Diglycidylethern und ihren Derivaten positive Effekte, die Wiederfindungen lagen zwischen 65–152 %. Bei den Oligomeren, die bei der Auswertung mittels Lösungsmittelkalibration sehr niedrige Wiederfindungsraten gezeigt haben (9–97 %), konnten die Daten mit der Matrixkalibration deutlich besser beschrieben werden (63–102 %).

Zusammenfassend konnte eine leistungsfähige, zeit- und ressourceneffiziente Methode zur simultanen Erfassung von 23 relevanten bisphenolischen Substanzen in Lebensmitteln entwickelt werden.

I.4 Diskussion

I.4.1 Beurteilung der Befunde der NIAS in hydrophilen Lebensmitteln

Als die zu untersuchende Biersorte wurden Pilsner-Biere ausgesucht, da es sich um das meist getrunkene Bier Deutschlands handelt. Das Pilsner-Bier ist ein untergäriges Bier (die Gärung findet bei niedrigen Temperaturen statt), enthält einen Stammwürzegehalt von bis zu 12 % und einen Alkoholgehalt von ca. 4.8 Vol.-%. Bezüglich der Quellen für die NIAS in dem Pilsner-Bier sind neben der Kontamination aus der Doseninnenbeschichtung auch die eingesetzten Rohstoffe sowie der Brauprozess selbst denkbar. Als Rohstoffe werden Wasser, Hopfen, Pilsner Malz und Hefe eingesetzt, der einzige Rohstoff aus dem eine Kontamination durch den Kontakt mit Epoxidharz möglich ist, ist aufgrund des flüssigen Zustands das eingesetzte Wasser.

Das Wasser wird vor dem Einsetzen als Brauwasser vorbehandelt und gerade diese Vorbehandlung kann zum möglichen Eintrag der ungewünschten Substanzen in das Produkt führen. Zum Entsalzen wird der Rohstoff einer Umkehrosmose unterworfen, dabei wird das Wasser unter hohem Druck durch eine semipermeable Membran gepresst, welche die Wassersalze zurückhält. Der Einsatz von Membranfiltern ist auch während des Brauprozesses möglich. Das gereifte Bier wird von den Hefezellen und anderen Trübungspartikeln filtriert, um das Produkt auf lange Sicht haltbar zu machen. Als Filtermaterial werden unter anderem Membrane verwendet, sie bestehen aus Polyethersulfon, Polyurethan, Polyacrylat, Polyamid, Polyethylen, Polycarbonat, Celluloseacetat und anderen Materialien.^[59]

Als Gefäße im Brauprozess werden ein Maischbottich oder eine Maischbotichpfanne, ein Läuterbottich oder ein Maischefilter, eine Würzpfanne, ein Whirlpool, ein Gärtank und ein Lagertank eingesetzt. Darüber hinaus werden zahlreiche Rohrbögen, Verbindungsstücke, Ventile, Dichtungen und Gummischläuche verwendet. Heutzutage bestehen die genannten Gefäße größtenteils aus Chromnickelstahl, da sie mittels eines automatisierten CIP (Cleaning-in-place)-Verfahrens gut gereinigt

werden können.^[59] Bei dem CIP-Verfahren werden alle Gefäße inklusive der Verbindungsteile mit Säure und Lauge gereinigt, der Einsatz der Leitungen aus gegen Säure- und Lauge unbeständigen Materialien bedeutet, dass diese aus dem Kreislauf entfernt werden müssen, was den Reinigungsprozess aufwändiger macht. Daher ist der Brauprozess selbst, außer beim Einsatz von Membranen bei der Filtration, eher weniger eine Quelle der Kontamination. Die Abfüllung des fertigen Produktes in Dosen, Fässer und Kegs kann dagegen häufiger zu einer Kontamination führen. Eine Dose besteht aus zwei Teilen, der eigentlichen Dose und eines Deckels. Die Dosen werden aus Aluminium und Stahl angefertigt, die Deckel dagegen bestehen immer aus Aluminium. Metallfässer stellen eine Alternative für die Holzfässer dar, sie werden genauso wie Kegs entweder aus Aluminium oder Chromnickelstahl gefertigt, wobei die aus Aluminium bestehenden Gefäße anfälliger gegen Korrosion sind. Alle Abfüllgefäße aus Aluminium werden mit einer Innenbeschichtung aus Kunstharzlacken oder Epoxidharz versehen,^[59] diese kann also als eine Hauptkontaminationsquelle gesehen werden. Zudem die in Dosen abgefüllten Produkte einer Pasteurisation unterworfen werden, bei der die Temperatur aufgrund des gebildeten Innendrucks 62 °C nicht übersteigen kann.^[59]

Mit der entwickelten Methode für hydrophile Matrices wurden insgesamt 20 Bierproben untersucht, darunter befanden sich 19 Dosenbiere und ein Flaschenbier, welches als Leermatrix für die Matrixkalibration eingesetzt wurde. Unter den 20 Bierproben befanden sich 15 verschiedene Biersorten. Um den Einfluss der Lagerungsdauer abzuschätzen, wurden drei weitere Proben mit einem anderen Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) gemessen. Weiterhin wurden für die Proben der Dosenhersteller und der Alkoholgehalt angegeben, eine Übersicht der untersuchten Bierproben ist in der Tabelle 19 zu sehen.

Tabelle 19: Übersicht der mit der Methode in hydrophilen Matrices untersuchten Proben im Zusammenhang mit dem Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD), dem Dosenhersteller und dem Alkoholgehalt. Die Proben wurden im August/September 2017 vermessen. Die Gehalte sind in µg/L angegeben.

Eintrag	Biersorte	MHD	Dosenhersteller	Alkoholgehalt [Vol.-%]	Cyclo-di-BADGE	BADGE·BPA	BADGE·BPA·H ₂ O	BADGE·BPA·HCl	BADGE·2BPA
1	1	07.2018	a	4.8	< BG	-	-	-	-
2	1	04.2018	a	4.8	-	-	-	-	-
3	2	07.2018	b	4.9	2.12 ± 0.34	-	-	-	-
4	3	05.2018	c	4.9	< BG	-	-	-	-
5	-	-	„[a]“	5.1	-	-	-	-	-
6	4	07.2018	d	5.1	< BG	-	-	-	-
7		08.2017	c	5.0	< BG	-	-	-	-
8	5	06.2018	c	4.8	-	-	-	-	-
9	5	08.2017	d	4.8	< BG	-	-	-	-
10	6	05.2018	d	5.0	-	-	-	-	-
11	6	11.2017	d	5.0	-	-	-	-	-
12	7	07.2018	b	5.0	< BG	-	-	-	-
13	8	06.2018	a	4.9	2.97 ± 0.48	-	-	-	-
14	9	04.2018	e	5.0	-	-	-	-	-
15	10	07.2018	c	5.0	-	-	-	-	-
16	11	06.2018	c	4.8	-	-	-	-	-
17	12	06.2018	d	4.8	< BG	-	-	-	-

Tabelle 19: Fortsetzung

Eintrag	Biersorte	MHD	Dosenhersteller	Alkoholgehalt [Vol.-%]	Cyclo-di-BADGE	BADGE·BPA	BADGE·BPA·H ₂ O	BADGE·BPA·HCl	BADGE·2BPA
18	13	07.2018	a	4.9	< BG	-	-	-	-
19	14	03.2018	d	4.9	< BG	-	-	-	-
20	15	04.2018	c	4.9	< BG	-	-	-	-

[a] Flaschenbier; Abkürzungen: MHD = Mindesthaltbarkeitsdatum; BG = Bestimmungsgrenze; „-“ = nicht detektiert.

Wie aus der Tabelle 19 hervorgeht, konnte von den höhermolekularen Substanzen nur das Cyclo-di-BADGE in der hydrophilen Biermatrix nachgewiesen werden. Der Gehalt des cyclischen Dimers lag in zwei Proben über der Bestimmungsgrenze und in 10 Proben unter der Bestimmungsgrenze. In einer Stellungnahme vom 15. April 2016 des Bundesinstituts für Risikobewertung wurde Cyclo-di-BADGE nach dem TTC-Konzept (Threshold of Toxicological Concern) in die Cramer-Klasse III (Toxizitätsklasse) eingestuft, daraus leitet sich eine tolerierbare Aufnahmemenge (TDI) von 90 µg pro Person pro Tag ab.^[60] Die Befunde von Cyclo-di-BADGE sind in allen untersuchten Pilsner-Bieren unter dem TDI. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen dem Mindesthaltbarkeitsdatum, dem Alkoholgehalt und der Migration der Oligomere in Bier festgestellt werden. Bis auf den Dosenhersteller „e“ konnten in allen anderen Dosen befindliche Biere Befunde von Cyclo-di-BADGE festgestellt werden. Vergleicht man die Befunde des Pilsner 4 (Eintrag 5, Flaschenbier) mit dem Pilsner 4 (Einträge 6 und 7, Dosenbiere), so stellt man fest, dass bei der gleichen Biersorte beide Dosenbiere einen positiven Befund unter Bestimmungsgrenze im Gegensatz zu dem Flaschenbier gezeigt haben. Anhand dieses Beispiels kann man mutmaßen, dass der Eintrag der NIAS hauptsächlich aus der Doseninnenbeschichtung stammt. Der Grund für die wenigen positiven Befunde kann die geringe Löslichkeit der höhermolekularen Oligomere in hydrophilen Matrices sein. In allen untersuchten Bieren konnte nur eine Migration von Cyclo-di-BADGE beobachtet werden, das liegt vermutlich daran, dass Cyclo-di-BADGE eine der dominanten NIA-Komponenten im Gesamtmigrat einer Epoxidharzbeschichtung ist.^[12] Im Gegensatz zu den linearen Oligomeren kann Cyclo-di-BADGE nicht weiter polymerisieren und lässt sich einfacher aus dem Polymer extrahieren.^[12]

I.4.2 Beurteilung der Befunde der NIAS in lipophilen Lebensmitteln

Aufgrund der angenommenen geringen Löslichkeit der BADGE·BPA-Derivate in hydrophilen Matrices wurden die synthetisierten Verbindungen zusammen mit kommerziell erhältlichen Bisphenolen, BADGE, BFDGE, 3-Ring-NOGE und deren Reaktionsprodukten in lipophilen Matrices untersucht. Insgesamt wurden 23 Analyten in 25 fetthaltigen Lebensmitteln aus der Dose untersucht (Tabelle 20).

Die temporäre tolerierbare tägliche Aufnahmemenge (t-TDI) von Bisphenol A wurde in einem Gutachten der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit vom 25. März 2015 von 50 auf 4 µg pro kg Körpergewicht und Tag gesenkt.^[61] Zwecks Anpassung des spezifischen Migrationsgrenzwertes (SML) von Bisphenol A an den t-TDI wurde eine Änderung der Verordnung 10/2011 veröffentlicht, in der die spezifische Migrationsgrenze von 0,6 auf 0,05 mg pro kg Lebensmittelsimulanz oder

Lebensmittel herabgesetzt wurde.^[62] Diese Verordnung trat am 06. September 2018 in Kraft, daher können die Befunde nur nach dem zum Zeitpunkt der Messung gültigem t-TDI bewertet werden. Das bedeutet, dass bei einem angenommenen Körpergewicht von 60 kg eine tägliche Menge von 240 µg tolerierbar ist. Auch bei einem angenommenen Verzehr von 1 kg des Lebensmittels, überschreiten die Befunde an Bisphenol A in den zwei untersuchten Lebensmitteln (Einträge 3 und 15) den t-TDI nicht.

Nach der gültigen Verordnung (EG) 1895/2005 wurde für das BADGE, die mono- und di-Hydrate von BADGE ein Summengrenzwert von 9 mg/kg Lebensmittel sowie eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge von 0.15 mg/kg Körpergewicht festgelegt, für das mono- und di-Chlorhydrin sowie das Chlorhydrin-Hydrat von BADGE gilt ein Summengrenzwert von 1 mg/kg Lebensmittel.^[63] Diese Grenzwerte wurden in keinem der untersuchten Lebensmittel überschritten.

Cyclo-di-BADGE wurde in zwei untersuchten Proben gefunden (Einträge 2 und 3) und in drei lag der Befund unter der Bestimmungsgrenze (Einträge 6, 15 und 25), daraus folgt, dass in keiner Probe die tolerierbare Aufnahmemenge von 90 µg pro Person pro Tag überschritten wurde.

Bisphenol G ist in der Positivliste der EU (VO) 10/2011 nicht aufgeführt, daher gilt ein allgemeiner Grenzwert von 0.01 mg/kg Lebensmittel^[4]. Die positiven Befunde von Bisphenol G (Einträge 9, 15, 21 und 24) liegen alle über dem zulässigen Grenzwert, besonders hoch war der Gehalt an Bisphenol G in Rinderfleisch aus der Dose (451 µg/kg). Da in dieser Probe auch Bisphenol A sowie seine Reaktionsprodukte wie Cyclo-di-BADGE und BADGE·BPA·H₂O nachgewiesen wurden, konnte es sich bei der Innenbeschichtung um ein Mischpolymer handeln oder Bisphenol G stammt aus einer anderen Kontaminationsquelle.

Generell lässt sich sagen, dass die Monomere bzw. ihre Reaktionsprodukte mit Wasser und Chlorwasserstoff zusammen mit dem cyclischen Dimer, dem Cyclo-di-BADGE, im höheren Maße in die Lebensmittel migrieren als linearkettige Oligomere.

Tabelle 20: Übersicht über die mit der Methode in lipophilen Matrices untersuchten Proben^[64]

Eintrag	Lebensmittel	Analyt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]												
		Bisphenol A	Bisphenol G	BADGE	BADGE·2H ₂ O	BADGE·HCl·H ₂ O	BADGE·HCl	BADGE·2HCl	BFDGE	Cyclo-di-BADGE	BADGE·BPA	BADGE·BPA·H ₂ O	BADGE·BPA·HCl	BADGE·2BPA
1	Hundenahrung	-	-	-	-	-	-	-	< BG	-	-	-	-	-
2	Hundenahrung	-	-	-	10.9 ± 0.5	5.62 ± 0.10	-	-	-	15.1 ± 1.39	-	-	-	-
3	Schmalzfleisch	7.08 ± 0.15	-	-	13.9 \pm 0.6	4.02 ± 0.07	-	-	-	11.7 ± 1.08	-	< BG	< BG	< BG
4	Gepökeltes Rindfleisch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< BG	-	-	-
5	Gezuckerte Kondensmilch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Hühner-Nudelsuppe	-	-	-	7.19 ± 0.32	5.22 ± 0.09	-	-	-	< BG	-	< BG	-	< BG
7	Kokosmilch	-	-	2.33 ± 0.11	-	-	< BG	-	-	-	-	-	-	-
8	Sardinen-Filets	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Remoulade	-	11.5 ± 0.5	-	-	-	-	< BG	-	-	-	-	-	-
10	Kondensmilch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Mexikanischer Thunfischsalat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Heringsfilet	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Heringsfilet in Tomatencreme	-	-	-	-	-	-	< BG	-	-	-	-	-	-
14	Passierte Tomaten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Rindergulasch	7.15 ± 0.15	451 ± 21	-	16.5 ± 0.7	5.81 ± 0.10	-	-	-	< BG	-	< BG	-	-

Tabelle 20: Fortsetzung^[64]

Eintrag	Lebensmittel	Analyt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]												
		Bisphenol A	Bisphenol G	BADGE	BADGE·2H ₂ O	BADGE·HCl·H ₂ O	BADGE·HCl	BADGE·2HCl	BFDE	Cyclo-di-BADGE	BADGE·BPA	BADGE·BPA·H ₂ O	BADGE·BPA·HCl	BADGE·2BPA
16	Seemuschelfleisch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Thunfisch in Öl	-	-	4.77 ± 0.22	-	4.08 ± 0.07	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Ölsardinen	-	-	2.31 ± 0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Oliven gefüllt mit Sardellencreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< BG	-	-	-
20	Sardinen in Öl	-	-	2.20 ± 0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Kieler Sprotten	-	19.8 ± 0.9	-	-	-	-	-	-	-	< BG	-	-	-
22	Passierte Tomaten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Sardellenpaste	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Kaviarcreme	-	27.9 ± 1.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Katzennahrung	-	-	-	8.2 ± 0.4	-	-	-	-	< BG	< BG	-	-	-

Abkürzungen: BG = Bestimmungsgrenze; „-“ = nicht detektiert.

II. Experimenteller Teil

II.1 Geräte

II.1.1 Kernresonanzspektroskopie

¹H-NMR-Spektren wurden mit den Geräten *AVANCE III* (500 MHz) und *AVANCE II* (400 MHz) der Firma BRUKER bei Raumtemperatur aufgenommen. Als Lösungsmittel sind CDCl₃, Aceton-d₆ und DMSO-d₆ verwendet worden. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm relativ zum internen Lösungsmittelsignal angegeben. In Klammern sind die Signalmultiplizitäten, die Kopplungskonstanten J in Hz und die Protonenzahl vermerkt. Die Multiplizitäten werden wie folgt bezeichnet: s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dubletts), t (Triplet), q (Quartett), sept (Septett), m (Multipllett) und br (verbreitertes Signal). Die ²H-NMR-Spektren wurden mit dem Gerät *AVANCE III* (500 MHz) der Firma BRUKER bei Raumtemperatur aufgenommen. Als Lösungsmittel sind Gemische aus CHCl₃/CDCl₃, H₂O/D₂O und Aceton/Aceton-d₆ im Volumenverhältnis 90/10 verwendet worden. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm relativ zum internen Lösungsmittelsignal angegeben. ¹³C-NMR-Spektren wurden mit den Geräten *AVANCE III* (500 MHz) und *AVANCE II* (400 MHz) der Firma BRUKER bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm relativ zum internen Lösungsmittelsignal angegeben. In Klammern ist die Zuordnung der Kohlenstoffatome vermerkt. **2D-NMR**-Spektren (COSY, HMBC, HMQC) wurden mit den Geräten *AVANCE III* (500 MHz) und *AVANCE II* (400 MHz) der Firma BRUKER bei Raumtemperatur aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden beim NMR Messzentrum OC an der Technischen Universität Berlin, Institut für Chemie aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden mit dem Programm Spin Works 4.2.4 (Copyright © 1993-2016 von Kirk Marat, The University of Manitoba) ausgewertet.

II.1.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HPLC-UV

HPLC-UV-Anlage (Firma Merck-Hitachi LaChrom, Darmstadt, Deutschland):

Pumpe L-7100

Säulenofen L-7350

UV-Detektor L7400

Software GC Solution 2.31 (Firma Shimadzu, Kyoto, Japan)

HPLC-DAD

HPLC-DAD-Anlage HP/Agilent 1100 Series (Firma Agilent/Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland):

Degasser G1322A Degasser

Pumpe G1311A Quatpump

Autosampler G1313 ALS

Säulenofen G1316A ColComp

Detektor G 1315A DAD

Software LC solutions (Firma Shimadzu, Kyoto, Japan)

II.1.3 Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

HPLC-MS/MS

HPLC-Anlage (Firma Shimadzu, Duisburg, Deutschland):

Degasser DGU-20A

Kapillar-Pumpe LC-20AD

Autosampler SIL-20AC

Säulenofen CTO-20AC

MS-System (Firma AB Sciex, Darmstadt, Deutschland):

QTrap 5500

Software Analyst 1.5.1 (Firma AB Sciex, Darmstadt, Deutschland).

UPLC-MS/MS

HPLC-Anlage (Firma Agilent, Waldbronn, Deutschland):

Pumpe Agilent 1290 Binary VL

Autosampler Agilent 1290 Autosampler

Säulenofen Agilent 1290 TCC

MS-System (Firma AB Sciex, Darmstadt, Deutschland):

Triple Quad 6500

Software Analyst 1.6.2 (Firma AB Sciex, Darmstadt, Deutschland).

II.2 Methoden

HPLC-UV-Methode

Vorsäule	SecurityGuard Cartridge C 18 (4 × 3 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Säule	VDSpher PUR 100 C18-SE 5 µm (105 Å; 5 µm; 250 x 4,6 mm; VDS optilab, Berlin, Deutschland)
Säulentemperatur	35 °C für BADGE·BPA- und 30 °C für Caprolactam- und Amino-hexansäure-Derivate
Flussrate	0.7 mL/min
Injektion	manuell
Spülen der Probenschleife (20 µl)	2 x 100 µl Methanol, 2 x 100 µl Laufmittel und 2 x 100 µl Probe
Injektionsvolumen	20 µl
Elution	Isokratisch

Analyt	Laufmittel- zusammensetzung	Laufzeit [min]	Detektions- wellenlänge [nm]	c [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]	
						Eluenten
BADGE·BPA	80 % A:20 % B	30	288	20	24.4	
BADGE·BPA-d ₁		40			18.0	
BADGE·2BPA	90 % A:10 % B	25			7.5	
BADGE·2BPA-d ₂		30			7.8	
BADGE·BPA·H ₂ O	80 % A:20 % B	23			9.8	
BADGE·BPA·H ₂ O-d ₁		20			10.4	
BADGE·BPA·HCl	80 % B:20 % B	30			17.1	
BADGE·BPA·HCl-d ₁		35			20.6	
Caprolactam-d ₄	50 % A:50 % C	13.5			4	5.7
Di-6-Ahx·HCl	20 % A:80 % C	25			210	15
Di-6-Ahx·HCl-d ₄		25	9.3			
Tri-6-Ahx·HCl	30 % A:70 % C	20	8.2			
Di-6-Ahx·HCl-d ₄		20	8.1			

HPLC-DAD-Methode

Vorsäule	4.6 mm x 10 mm C18 (AppliChrom, Oranienburg, Deutschland)				
Säule	OTU LipoMare C18 (105 Å; 5 μm ; 250 mm x 4,6 mm; AppliChrom, Oranienburg, Deutschland)				
Säulentemperatur	29 °C				
Autosamplertemperatur	15 °C				
Flussrate	0.5 mL/min				
Injektionsvolumen	20 μl				
Elution	Isokratisch				
Eluenten	A: MeOH B: H ₂ O C: 1 % FA in H ₂ O				
Analyt	Laufmittel- zusammensetzung	Laufzeit [min]	Detektions- wellenlänge [nm]	c [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]
BADGE·BPA	80 % A:20 % B	30	288	20	22.7
BADGE·2BPA	90 % A:10 % B	20			12.0
BADGE·BPA·H ₂ O	80 % A:20 % B	20			15.0
BADGE·BPA·HCl	80 % B:20 % B	35			23.6
Caprolactam	50 % A:50 % C	15		5	8.7
Di-6-Ahx·HCl	20 % A:80 % C	20	210	20	16.4
Tri-6-Ahx·HCl	30 % A:70 % C	25		15	18.2

LC-MS/MS-Methode

Vorsäule	SecurityGuard Cartridge C 18 (4 × 3 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)	
Säule	OTU TriKala C18 (5 µm; 125 mm x 3 mm; AppliChrom, Oranienburg, Deutschland)	
Säulentemperatur	40 °C	
Autosamplertemperatur	15 °C	
Eluenten	A: Wasser B: MeOH	
Gradient der mobilen Phase	Zeit [min]	%B
	0	50
	10	80
	26	92
	30	100
	34	100
	35	50
	45	50
Flussrate	0.5 mL/min	
Injektionsvolumen	10 µl	
MS/MS Detektion	Multiple Reaction Monitoring (MRM)	
Modus	ESI positiv	

UPLC-MS/MS-Methode

Säule	Agilent Zorbax SB-C8 (1.8 µm; 50 x 4.6 mm; Agilent, Waldbronn, Deutschland)	
Säulentemperatur	40 °C	
Autosamplertemperatur	Raumtemperatur	
Eluenten	A = Wasser B = MeOH	
Gradient der mobilen Phase	Zeit [min]	%B
	0.00	65
	0.50	65
	2.80	99
	4.00	99
	4.01	65
	6.00	65
Flussrate	0.6 mL/min	
Injektionsvolumen	10 µl	
MS/MS Detektion	Multiple Reaction Monitoring (MRM)	
Modus	ESI positiv und negativ	

Während der Fließinjektionsanalyse optimierte MS/MS-Parameter für die UPLC-MS/MS-Methode:

Tabelle 21: Die gewählten MS/MS-Parameter für Experiment 1 (positiver Ionisierungsmodus) und Experiment 2 (negativer Ionisierungsmodus), Teil 1

Experiment	CUR	IS	TEM	GS1	GS2	CAD	EP
1	40	5500	400	50	40	12	10
2	40	-4500	400	50	40	12	-10

Abkürzungen: CUR: Schutzgas; IS: Ionisierungsspannung; TEM: Temperatur; GS1: Zerstäubergas; GS2: Hilfgas; CAD: Kollisions-aktiviertes Dissoziationsgas; EP: Eintrittspotential.

Tabelle 22: Bei der Fließinjektionsanalyse ermittelte MS/MS-Parameter, Teil 2

Analyt	Vorläufer-ion	R _t [min]	Übergang	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
BFDGE·2H ₂ O	[M+H] ⁺	1.50	349.0 → 181.1 ^[a]	126	15	12
			349.0 → 133.1	126	25	12
			349.0 → 105.0	126	51	12
BADGE·2H ₂ O	[M+H] ⁺	1.72	377.0 → 209.1 ^[a]	141	17	12
			377.0 → 135.1	141	39	12
			377.0 → 107.0	141	63	12
BADGE·H ₂ O	[M+H] ⁺	2.32	359.2 → 135.1 ^[a]	91	31	12
			359.2 → 107.0	91	69	12
			359.2 → 209.1	91	15	18
BADGE·HCl·H ₂ O	[M+H] ⁺	2.36	395.0 → 227.1 ^[a]	146	17	14
			395.0 → 135.0	146	39	16
			395.0 → 107.0	146	65	12
BFDGE	[M+H] ⁺	2.49	313.1 → 107.0 ^[a]	131	35	12
			313.1 → 77.1	131	81	10
			313.1 → 163.1	131	23	10
BFDGE·2HCl	[M+H] ⁺	2.55	385.1 → 199.0 ^[a]	136	13	12
			385.1 → 181.1	136	27	16
			385.1 → 145.0	136	35	16
BADGE·2HCl	[M+H] ⁺	2.81	413.1 → 107.1 ^[a]	166	63	12
			413.1 → 135.0	166	39	16
			413.1 → 227.1	166	15	14
BADGE	[M+H] ⁺	2.83	341.1 → 161.1 ^[a]	156	17	10
			341.1 → 191.2	156	23	12
			341.1 → 107.0	156	61	12
BADGE·HCl	[M+H] ⁺	2.83	376.9 → 161.1 ^[a]	116	21	14
			376.9 → 135.1	116	33	12
			376.9 → 347.1	116	11	24
3-Ring NOGE	[M+NH ₄] ⁺	2.97	492.2 → 163.1 ^[a]	56	27	10
			492.2 → 145.0	56	31	14
			492.2 → 107.0	56	51	12
BADGE·BPA·H ₂ O	[M+NH ₄] ⁺	3.02	604.4 → 135.0 ^[a]	1	49	12
			604.4 → 493.1	1	23	14
			604.4 → 107.1	1	105	20
BADGE·BPA·HCl	[M+NH ₄] ⁺	3.26	622.2 → 134.8 ^[a]	41	69	14
			622.2 → 227.0	41	29	12
			622.2 → 107.0	41	101	12
BADGE·BPA	[M+NH ₄] ⁺	3.30	586.2 → 135.0 ^[a]	36	49	16
			586.2 → 107.0	36	95	12
			586.2 → 419.1	36	27	30
Cyclo-di-BADGE	[M+NH ₄] ⁺	3.30	586.3 → 135.0 ^[a]	1	45	12
			586.3 → 107.0	1	97	12
			586.3 → 77.0	1	129	8

Tabelle 22: Fortsetzung

BADGE·2BPA	[M+NH ₄] ⁺	3.46	814.3 → 135.1 ^[a]	11	57	8
			814.3 → 107.1	11	129	10
			814.3 → 703.2	11	35	18
Bisphenol S	[M-H] ⁻	1.12	249.1 → 108.0 ^[a]	-90	-36	-7
			249.1 → 91.9	-90	-44	-5
			249.1 → 155.8	-90	-30	-1
Bisphenol E	[M-H] ⁻	1.67	213.0 → 197.9 ^[a]	-50	-24	-11
			213.0 → 197.1	-50	-42	-13
Bisphenol A	[M-H] ⁻	1.90	227.1 → 212.3 ^[a]	-85	-26	-9
			227.1 → 132.8	-85	-32	-21
			227.1 → 93.0	-85	-60	-7
Bisphenol B	[M-H] ⁻	2.19	241.0 → 212.0 ^[a]	-65	-24	-23
			241.0 → 211.0	-65	-36	-15
Bisphenol FL	[M-H] ⁻	2.42	348.9 → 256.0 ^[a]	-40	-36	-23
Bisphenol Z	[M-H] ⁻	2.47	266.9 → 173.0 ^[a]	-135	-36	-13
			266.9 → 223.0	-135	-44	-17
			266.9 → 144.9	-135	-50	-19
Bisphenol BP	[M-H] ⁻	2.72	351.1 → 274.0 ^[a]	-145	-34	-25
			351.1 → 273.1	-145	-44	-5
			351.1 → 258.1	-145	-32	-15
Bisphenol G	[M-H] ⁻	2.94	311.1 → 296.1 ^[a]	-120	-30	-23
			311.1 → 295.0	-120	-50	-25
			311.1 → 174.9	-120	-40	-19
Bisphenol M	[M-H] ⁻	2.96	345.1 → 330.2 ^[a]	-5	-38	-9
			345.1 → 132.9	-5	-50	-7
Bisphenol TMC	[M-H] ⁻	2.97	309.0 → 215.1 ^[a]	-70	-38	-23
			309.0 → 199.9	-70	-46	-21
			309.0 → 183.2	-70	-82	-25

[a] Quantifier-Ionen. Abkürzungen: DP: Declustering-Potential; CE: Kollisionsenergie; CXP: Zellaustrittspotential.

II.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Anbietern bezogen:

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Thermo Fisher (Kandel) GmbH, Karlsruhe, Deutschland

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

abcr GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Absolutieren der verwendeten Lösungsmittel

abs. Aceton

Das Aceton wurde für maximal 6 h über Kaliumcarbonat vorgetrocknet. Das Aceton wurde dann abdekantiert und ins Molsieb 3 Å unter Stickstoffatmosphäre destilliert. Das absolutierte Aceton wurde bis zur nächsten Verwendung unter Stickstoffatmosphäre über Molsieb 3 Å aufbewahrt.

abs. Dichlormethan

Das Dichlormethan wurde zur Vortrocknung über frisch gemörsertes Calciumchlorid über Nacht stehen gelassen, dann abdekantiert, mit Natriumhydrid versetzt bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten war, über einen Zeitraum von 1-2 h unter Stickstoffatmosphäre zum Sieden erhitzt und ins Molsieb 4 Å destilliert. Das absolutierte Dichlormethan wurde bis zur nächsten Verwendung unter Stickstoffatmosphäre über Molsieb 4 Å aufbewahrt.

abs. Dimethylformamid

Das abs. Dimethylformamid wurde wasserfrei in einer Flasche mit Septum erworben und ohne weitere Reinigung verwendet.

Chlorwasserstoff in abs. Ethylacetat

Das Reagenz zum Entfernen der *tert*-Butoxycarbonyl-Gruppe wurde durch das Entwässern von konzentrierter Salzsäure mit Calciumchlorid hergestellt und anschließend in das zuvor absolutierte Ethylacetat eingeleitet. Die so entstandene Lösung wurde bis zur nächsten Verwendung unter Stickstoffatmosphäre über Molsieb 4 Å aufbewahrt.

abs. Ethylacetat

Das Ethylacetat wurde über Kaliumcarbonat über Nacht vorgetrocknet und unter Stickstoffatmosphäre in einen mit Molsieb 4 Å gefüllten Dreihalskolben destilliert. Das Ethylacetat wurde zum Trocknen für 24 h über Molsieb 4 Å stehen gelassen. Das absolutierte Ethylacetat wurde bis zur nächsten Verwendung unter Stickstoffatmosphäre über Molsieb 4 Å aufbewahrt.

abs. Tetrahydrofuran und Toluol

Das Tetrahydrofuran wurde zur Vortrocknung über Kaliumhydroxid über Nacht stehen gelassen. Das abdekantierte Lösungsmittel wurde mit Benzophenon als Farbindikator (ca. 1 g pro 100 ml) und dann mit in feine Scheiben frisch geschnittenem Natrium versetzt. Die Suspension wurde solange unter Stickstoffatmosphäre zum Sieden erhitzt bis die blaue Farbe für mindestens 10 min angehalten hat. Der Rückflusskühler wurde dann durch eine Destille ersetzt und das Lösungsmittel ins Molsieb 4 Å destilliert. Das absolutierte Tetrahydrofuran wurde bis zur nächsten Verwendung unter Stickstoffatmosphäre über Molsieb 4 Å aufbewahrt.

abs. Triethylamin

Das Triethylamin wurde mit einem Überschuss von Kaliumhydroxid-Plätzchen versetzt, so dass sich beim Erhitzen unter Rückfluss kein Kaliumhydroxid mehr löste. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Triethylamin abdekantiert, mit frischen Kaliumhydroxid-Plätzchen versetzt und für eine Stunde zum Sieden erhitzt. Das Reagenz wurde dann erneut abdekantiert und

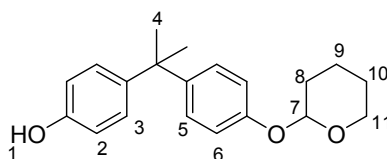
überdestilliert. Das Destillat wurde anschließend mit Natriumhydrid versetzt bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten war, über einen Zeitraum von 1-2 h unter Stickstoffatmosphäre zum Sieden erhitzt und schließlich ins Molsieb 4 Å destilliert. Das absolute Triethylamin wurde bis zur nächsten Verwendung unter Stickstoffatmosphäre über Molsieb 4 Å aufbewahrt.

II.4 Versuchsvorschriften und spektroskopische Daten der synthetisierten Verbindungen

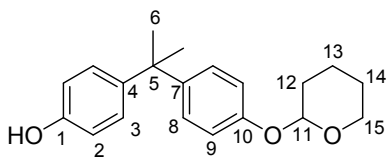
O-Tetrahydropyran-2-yl-4,4'-isopropylidendiphenol (**14**):^[33]

In einem 50 ml Rundkolben wurden 2 g BPA (8.76 mmol, 1.0 Äquiv.) in 13 ml Et₂O gelöst und in einem Eis-/Wasser-Bad auf 0 °C abgekühlt. Die farblose Lösung wurde mit einem Tropfen konz. HCl und 0.8 ml 3,4-Dihydro-2H-pyran (8.76 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt und für 40 min bei 0 °C gerührt. Das Eis-/Wasser-Bad wurde entfernt und weiter bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung über Nacht stehengelassen. Die Etherlösung wurde mit 0.1 M KHCO₃-Lösung (3 x 2 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 8:1). Es wurden 0.809 g (2.59 mmol, 30 %) eines klaren farblosen Öls erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit denen der literaturbekannten Verbindung überein.^[33]

R_f = 0.39 (SiO₂, PB/EtOAc = 7:1);



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 9.19 (br s, 1H, H-1), 7.10–7.07 (m, 2H, H-5), 7.01–6.96 (m, 2H, H-3), 6.91–6.87 (m, 2H, H-6), 6.66–6.63 (m, 2H, H-2), 5.39 (t, 1H, *J* = 3.31 Hz, H-7), 3.78–3.72 (m, 1H, H-11), 3.54–3.49 (m, 1H, H-11'), 1.90–1.79 (m, 1H, H-9), 1.78–1.66 (m, 2H, H-8), 1.63–1.46 (m, 3H, H-9', H-10), 1.55 (s, 6H, H-4).



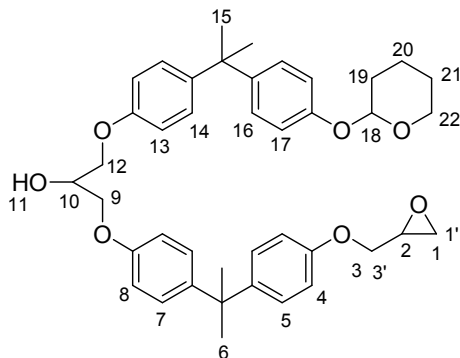
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 155.0 (C_q, C-1), 154.2 (C_q, C-10), 143.9 (C_q, C-7), 140.7 (C_q, C-4), 2 x 127.3 (CH, C-3, C-8), 115.8 (CH, C-9), 114.6 (CH, C-2), 95.8 (CH, C-11), 61.5 (CH₂, C-15), 41.1 (C_q, C-5), 30.8 (CH₃, C-6), 30.0 (CH₂, C-12), 24.8 (CH₂, C-14), 18.7 (CH₂, C-13).

1-{4-[1-Methyl-1-(4-oxiranylmethoxy-phenyl)-ethyl]-phenoxy}-3-(4-{1-methyl-1-[4-(tetrahydro-pyran-2-yloxy)-phenyl]-ethyl}-phenoxy)-propan-2-ol (**15**):

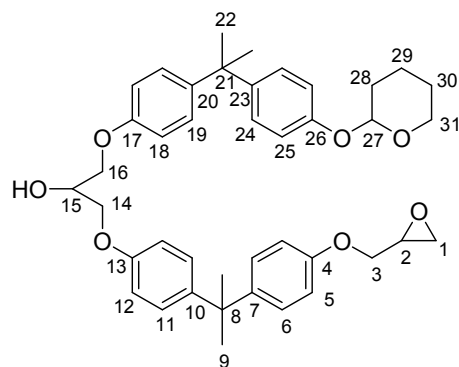
In einem 50 ml 2-Halskolben wurden 1.656 g K₂CO₃ (11.98 mmol, 3 Äquiv.) eingewogen und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 1.248 g von **14** (3.99 mmol, 1.0 Äquiv.) in 15 ml abs. Aceton und 1.359 g BADGE (3.99 mmol, 1.0 Äquiv.) in 19 ml abs. Aceton

zugegeben und die Reaktionsmischung für 4.5 d unter N₂-Atmosphäre zum Sieden erhitzt. Die Suspension wurde filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde aufgrund des großen Ansatzes in drei Teile aufgeteilt und säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 4:1). Es wurden 1.106 g (1.69 mmol, 42 %) eines farblosen Schaumes erhalten.

R_f = 0.16 (SiO₂, PB/EtOAc = 4:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.16–7.10 (m, 8H, H-5, H-7, H-14, H-16), 6.96–6.92 (m, 2H, H-17), 6.84–6.80 (m, 6H, H-4, H-8, H-13), 5.38 (t, 1H, *J* = 3.4 Hz, H-18), 4.38–4.32 (m, 1H, H-10), 4.18 (dd, 1H, *J* = 11.0, 3.3 Hz, H-3), 4.15–4.08 (m, 4H, H-9, H-12), 3.97–3.90 (m, 2H, H-3', H-22), 3.62–3.57 (m, 1H, H-22'), 3.36–3.32 (m, 1H, H-2), 2.90 (dd erscheint als t, 1H, *J* = 4.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, H-1), 2.75 (dd, 1H, *J* = 4.8, 2.6 Hz, H-1'), 2.56 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-11), 2.03–1.95 (m, 1H, H-20), 1.86–1.82 (m, 2H, H-19), 1.72–1.55 (m, 3H, H-21, H-20'), 1.63 (s, 12H, H-6, H-15).



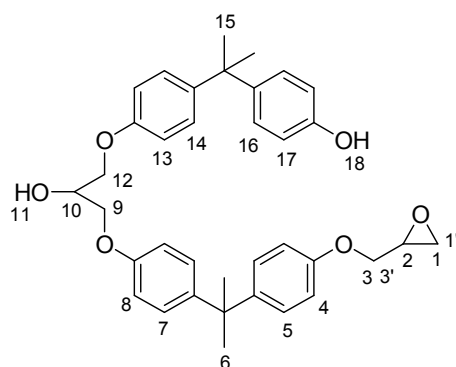
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 156.5, 156.4, 156.4 (3 x C_q, C-4, C-13, C-17), 155.1 (C_q, C-26), 144.0 (C_q, C-23), 143.9, 143.8, 143.8 (3 x C_q, C-7, C-10, C-20), 128.0, 128.0, 127.9, 127.8 (4 x CH, C-6, C-11, C-19, C-24), 115.9 (CH, C-25), 114.1, 114.1, 114.0 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 96.6 (CH, C-27), 69.0 (CH, C-15), 68.9 (CH₂, C-3), 68.8 (2 x CH₂, C-14, C-16), 62.3 (CH₂, C-31), 50.3 (CH, C-2), 44.9 (CH₂, C-1), 2 x 41.9 (2 x C_q, C-8, C-21), 31.2 (CH₃, C-9, C-21), 30.6 (CH₂, C-28), 25.4 (CH₂, C-30), 19.1 (CH₂, C-29).

1-{4-[1-(4-Hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy}-3-{4-[1-methyl-1-(4-oxiranylmethoxy-phenyl)-ethyl]-phenoxy}-propan-2-ol (BADGE·BPA) (**2**):

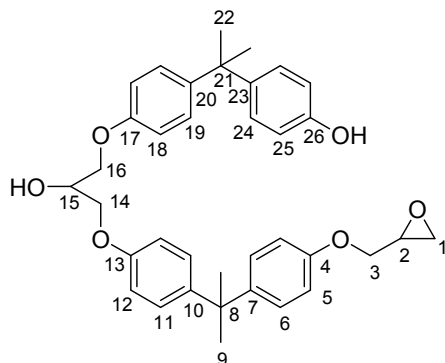
In einem 5 ml Rundkolben wurden 0.095 g von **15** (0.146 mmol, 1.0 Äquiv.) in 3.75 ml MeOH gelöst, 0.095 g Montmorillonit K-10 zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Montmorillonit K-10 wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde

zweimal säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 3:1). Es wurden 0.079 g (0.139 mmol, 95 %) eines leicht gelben Schaumes erhalten.

R_f = 0.21 (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.16–7.11 (m, 6H, H-5, H-7, H-14), 7.10–7.06 (m, 2H, H-16), 6.84–6.80 (m, 6H, H-4, H-8, H-13), 6.74–6.70 (m, 2H, H-17), 4.79 (br s, 1H, H-18), 4.39–4.32 (m, 1H, H-10), 4.18 (dd, 1H, *J* = 11.0, 3.3 Hz, H-3), 4.15–4.08 (m, 4H, H-9, H-12), 3.95 (dd, 1H, *J* = 11.0, 5.6 Hz, H-3'), 3.37–3.33 (m, 1H, H-2), 2.90 (dd erscheint als t, 1H, *J* = 4.7 Hz, *J* = 4.4 Hz, H-1), 2.75 (dd, 1H, *J* = 4.7, 2.7 Hz, H-1'), 2.57 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz, H-11), 1.63, 1.62 (2 x s, 12H, H-6 und H-15).



¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 156.5, 2 x 156.4 (3 x C_q, C-4, C-13, C-17), 153.5 (C_q, C-26), 143.9, 143.8, 143.8 (3 x C_q, C-7, C-10, C-20), 143.3 (C_q, C-23), 128.1 (CH, C-24), 128.0, 127.9 (3 x CH, C-6, C-11, C-19), 114.9 (CH, C-25), 114.2, 114.1, 114.0 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 69.0 (CH, C-15), 68.9 (CH₂, C-3), 68.7 (2 x CH₂, C-14, C-16), 50.4 (CH, C-2), 45.0 (CH₂, C-1), 2 x 41.9 (2 x C_q, C-8, C-21), 2 x 31.2 (2 x CH₃, C-9, C-22).

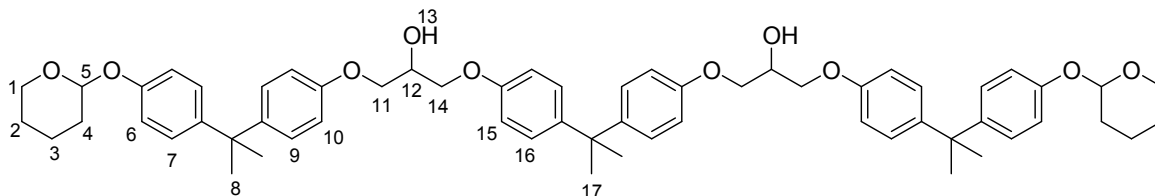
ESI-MS positiv-Modus: *m/z* 586.3 [M+NH₄]⁺, MS/MS (47 V): *m/z* (%): 135.4 (100), 107.4 (72), 586.0 (72), 191.2 (30), 360.4 (16), 249.0 (15), 419.2 (10), 475.0 (5), 374.2 (4), 172.8 (4), 277.4 (4).

1-[4-(1-[4-[2-Hydroxy-3-(4-[1-methyl-1-[4-(tetrahydro-pyran-2-yloxy)-phenyl]-ethyl]-phenoxy]-propoxy]-phenyl]-1-methyl-ethyl)-phenoxy]-3-(4-[1-methyl-1-[4-(tetrahydro-pyran-2-yloxy)-phenyl]-ethyl]-phenoxy)-propan-2-ol (THP-BADGE-2BPA) (16):

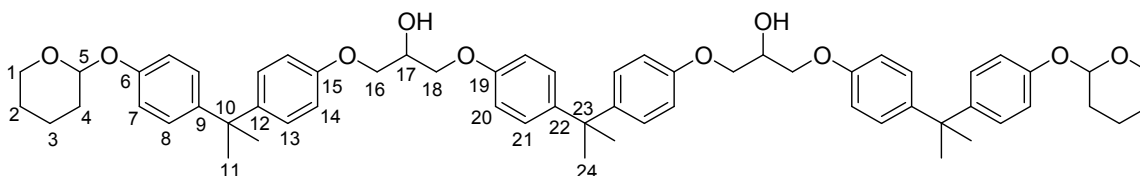
In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 0.198 g K₂CO₃ (1.431 mmol, 12 Äquiv.) eingewogen und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 0.149 g von **14** (0.477 mmol, 4 Äquiv.) in 2.2 ml abs. Aceton und 0.041 g BADGE (0.119 mmol, 1 Äquiv.) in 1.2 ml abs. Aceton zugegeben und die Reaktionsmischung für 4.5 d unter N₂-Atmosphäre zum Sieden erhitzt. Die

Suspension wurde filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , PB/EtOAc = 4:1 \rightarrow 3:1 und PB/EtOAc = 3:1). Es wurden 0.058 g (0.060 mmol, 50 %) eines leicht gelben Öls erhalten.

$R_f = 0.31$ (SiO_2 , PB/EtOAc = 2:1);



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 7.11–7.08 (m, 12H, H-7, H-9, H-16), 6.91–6.89 (m, 4H, H-6), 6.85–6.82 (m, 8H, H-10, H-15), 5.38 (t, 2H, $J = 3.3$ Hz, H-5), 5.33 (d, 2H, $J = 5.0$ Hz, H-13), 4.15–4.10 (m, 2H, H-12), 4.04–3.95 (m, 8H, H-11, H-14), 3.77–3.73 (m, 2H, H-1), 3.53–3.49 (m, 2H, H-1'), 1.89–1.81 (m, 2H, H-3), 1.80–1.66 (m, 4H, H-4), 1.62–1.46 (m, 6H, H-2, H-3'), 1.57 (s, 18H, H-8, H-17).

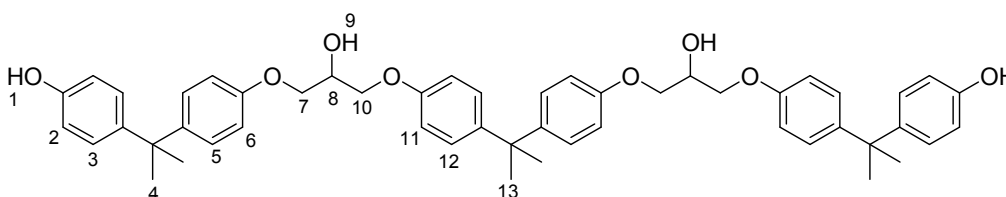


$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 156.3 (C_q , C-15, C-19), 154.3 (C_q , C-6), 143.5 (C_q , C-9), 142.7, 142.6 (2 x C_q , C-12, C-22), 127.4 (2 x CH, C-13, C-21), 127.3 (CH, C-8), 115.8 (CH, C-7), 113.9 (CH, C-14, C-20), 95.8 (CH, C-5), 69.1 (2 x CH_2 , C-16, C-18), 67.5 (CH_2 , C-17), 61.5 (CH_2 , C-1), 41.2 (C_q , C-10), 41.1 (C_q , C-23), 30.7 (CH_3 , C-11), 30.7 (CH_3 , C-24), 29.9 (CH_2 , C-4), 24.7 (CH_2 , C-2), 18.7 (CH_2 , C-3).

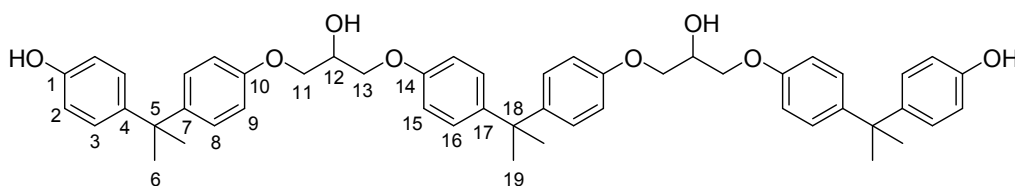
3-(4-{1-[4-(2-Hydroxy-3-{4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy}-propoxy)-phenyl]-1-methyl-ethyl}-phenoxy)-1-{4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy}-propan-2-ol (BADGE-2BPA) (**5**):

0.300 g von **16** (0.311 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in 12 ml EtOAc/MeOH (1:1, v/v) gelöst, mit 0.600 g Montmorillonit K-10 versetzt und für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Montmorillonit K-10 wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat eingengt. Um der Zersetzung auf dem aciden Kieselgel vorzubeugen und die Verweildauer auf der Säule zu verkürzen, wurde das Rohprodukt in zwei Teile aufgeteilt und jeweils zweimal säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , PB/EtOAc = 2:1 und PB/EtOAc = 1:1). Es wurden 0.134 g (0.168 mmol, 54 %) eines farblosen Schaumes erhalten.

$R_f = 0.48$ (SiO_2 , PB/EtOAc = 1:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.14–7.12 (m, 8H, H-5, H-12), 7.08–7.05 (m, 4H, H-3), 6.83–6.81 (m, 8H, H-6, H-11), 6.74–6.71 (m, 4H, H-2), 5.61 (br s, 2H, H-1), 4.39–4.35 (m, 2H, H-8), 4.15–4.09 (m, 8H, H-7, H-10), 2.85 (br s, 2H, H-9), 1.64 (s, 6H, H-13), 1.62 (s, 12H, H-4).



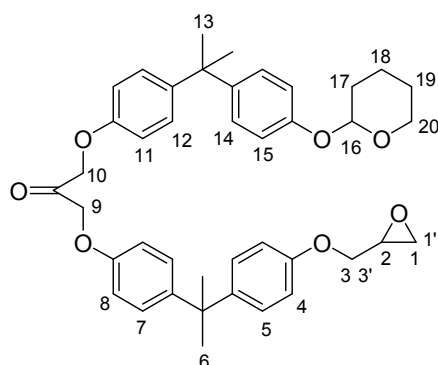
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 2 x 156.3 (2 x C_q, C-10, C-14), 153.5 (C_q, C-1), 143.9, 143.8 (2 x C_q, C-7, C-17), 143.1 (C_q, C-4), 128.0 (CH, C-3), 127.9 (2 x CH, C-8, C-16), 114.9 (CH, C-2), 114.1, 114.0 (2 x CH, C-9, C-15), 69.0 (CH, C-12), 68.7 (2 x CH₂, C-11, C-13), 41.8 (C_q, C-18), 41.8 (C_q, C-5), 31.2 (CH₃, C-6), 31.1 (CH₃, C-19).

ESI-MS positiv-Modus: m/z 814.4 [M+NH₄]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 135.2 (100), 814.6 (40), 107.0 (37), 419.2 (11), 703.4 (11), 94.8 (6), 325.2 (3), 267.0 (2), 173.2 (1).

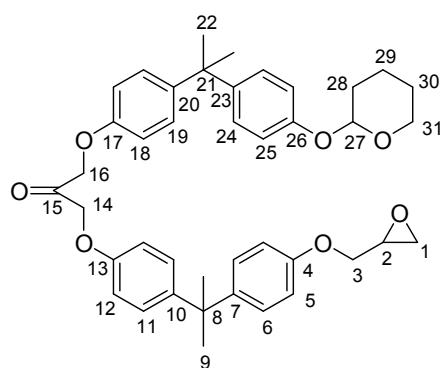
1-{4-[1-Methyl-1-(4-oxiranylmethoxy-phenyl)-ethyl]-phenoxy}-3-(4-{1-methyl-1-[4-(tetrahydro-pyran-2-yloxy)-phenyl]-ethyl}-phenoxy)-propan-2-one (17):

In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 0.389 g Pyridiniumdichromat (1.034 mmol, 1.50 Äquiv.) und 0.552 g von fein gepulverten, frisch aktivierten Molsieb (3Å) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 0.450 g von **15** (0.689 mmol, 1.00 Äquiv.) in 3.45 ml abs. CH₂Cl₂ und 69 μ l wasserfreier Essigsäure (1.200 mmol, 1.74 Äquiv.) zugegeben und die schwarzbraune Suspension für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über SiO₂ filtriert, der Filterkuchen mit 375 ml EtOAc extrahiert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 6:1 und PB/EtOAc = 6:1 → EtOAc). Es wurden 0.212 g (0.326 mmol, 47 %) eines farblosen Öls erhalten.

R_f = 0.50 (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1);



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.17–7.10 (m, 8H, H-5, H-7, H-12, H-14), 6.96–6.93 (m, 2H, H-15), 6.83–6.78 (m, 6H, H-4, H-8, H-11), 5.38 (t, 1H, *J* = 3.3 Hz, H-16), 4.85, 4.84 (2 x s, 4H, H-9, H-10), 4.18 (dd, 1H, *J* = 11.0, 3.3 Hz, H-3), 3.95 (dd, 1H, *J* = 11.0, 5.6 Hz, H-3'), 3.95–3.90 (m, 1H, H-20), 3.61–3.57 (m, 1H, H-20'), 3.35–3.32 (m, 1H, H-2), 2.90 (dd erscheint als t, 1H, *J* = 4.8 Hz, 4.8 Hz, H-1), 2.74 (dd, 1H, *J* = 4.8 Hz, 2.7 Hz, H-1'), 2.03–1.96 (m, 1H, H-18), 1.89–1.80 (m, 2H, H-17), 1.71–1.56 (m, 3H, H-18', H-19), 1.63 (s, 12H, H-6, H-13).

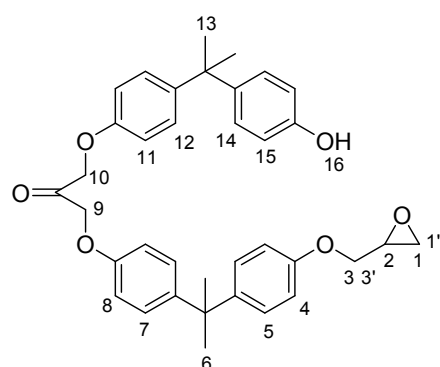


¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 203.1 (C_q, C-15), 156.5 (C_q, C-4), 2 x 155.6 (2 x C_q, C-13, C-17), 155.1 (C_q, C-26), 144.8, 144.6, 143.8, 143.6 (4 x C_q, C-7, C-10, C-20, C-23), 128.2, 128.1, 127.9, 127.8 (4 x CH, C-6, C-11, C-19, C-24), 116.0 (CH, C-25), 114.2, 114.2, 114.1 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 96.6 (CH, C-27), 2 x 71.9 (2 x CH₂, C-14, C-16), 68.9 (CH₂, C-3), 62.3 (CH₂, C-31), 50.3 (CH, C-2), 44.9 (CH₂, C-1), 42.0, 41.9 (C_q, C-8, C-21), 31.1 (2 x CH₃, C-9, C-22), 30.6 (CH₂, C-28), 25.4 (CH₂, C-30), 19.1 (CH₂, C-29).

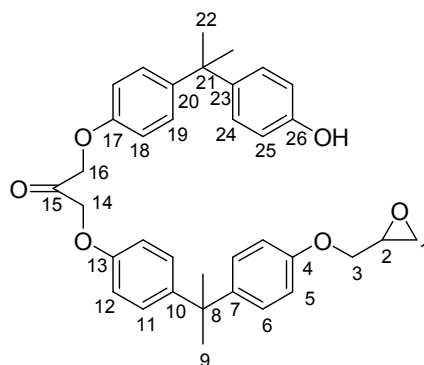
1-{4-[1-(4-Hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy}-3-{4-[1-methyl-1-(4-oxiranylmethoxy-phenyl)-ethyl]-phenoxy}-propan-2-on (18):

In einem 25 ml Rundkolben wurden 0.258 g von **17** (0.396 mmol, 1.0 Äquiv.) in 10 ml MeOH gelöst, 0.258 g Montmorillonit K-10 zugegeben und für 42 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Montmorillonit K-10 wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 5:1). Es wurden 0.202 g (0.357 mmol, 90 %) eines leicht gelben Feststoffs erhalten.

R_f = 0.28 (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.16–7.10 (m, 6H, H-5, H-7, H-12), 7.09–7.05 (m, 2H, H-14), 6.83–6.77 (m, 6H, H-4, H-8, H-11), 6.74–6.70 (m, 2H, H-15), 4.86 (br s, 1H, H-16), 2 x 4.84 (2 x s, 4H, H-9, H-10), 4.19 (dd, 1H, J = 11.0, 3.3 Hz, H-3), 3.94 (dd, 1H, J = 11.0 Hz, 5.6 Hz, H-3'), 3.37–3.33 (m, 1H, H-2), 2.90 (dd erscheint als t, 1H, J = 4.8 Hz, 4.8 Hz, H-1), 2.75 (dd, 1H, J = 4.8, 2.7 Hz, H-1'), 1.63, 1.62 (2 x s, 12H, H-6, H-13).

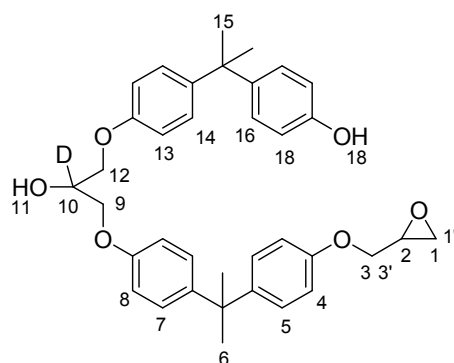


¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 203.3 (C_q, C-15), 156.5 (C_q, C-4), 2 x 155.6 (2 x C_q, C-13, C-17), 153.6 (C_q, C-26), 144.7, 144.6 (2 x C_q, C-10, C-20), 143.6 (C_q, C-7), 143.1 (C_q, C-23), 128.1 (2 x CH, C-11, C-19), 128.0, 127.9 (2 x CH, C-6, C-24), 114.9 (CH, C-25), 114.2 (CH, C-5), 2 x 114.1 (2 x CH, C-12, C-18), 71.9 (2 x CH₂, C-14, C-16), 68.9 (CH₂, C-3), 50.4 (CH, C-2), 45.0 (CH₂, C-1), 2 x 41.9 (2 x C_q, C-18, C-21), 31.2, 31.1 (2 x CH₃, C-9, C-22).

2-Deuterio-1-{4-[1-(4-Hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy}-3-{4-[1-methyl-1-(4-oxiranylmethoxy-phenyl)-ethyl]-phenoxy}-propan-2-ol (BADGE·BPA-d₁) (19):

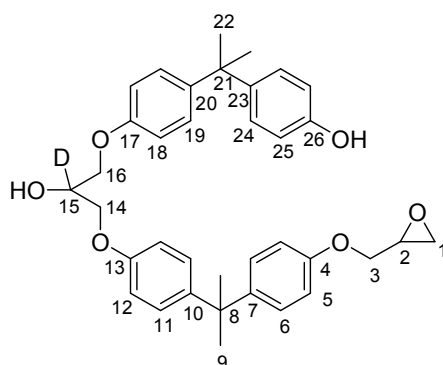
In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 0.116 g von **18** (0.205 mmol, 1.0 Äquiv.) in 4 ml EtOH gelöst, die Apparatur für 5 min mit N₂ gespült und die Lösung im Isopropanol/flüssigen Stickstoff-Bad auf -78 °C abgekühlt. Im N₂-Gegenstrom wurden 0.5 ml THF zugegeben und die farblose Lösung mit 0.017 g NaBD₄ (0.411 mmol, 2.0 Äquiv.) versetzt und anschließend für 1.5 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit 4 ml wässriger, gesättigter NH₄Cl-Lösung und 4 ml wässriger, gesättigter NaCl-Lösung gequenchet und auf Raumtemperatur erwärmt. Die Suspension wurde mit EtOAc (3 x 35 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit dest. Wasser (3 x 10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 3:1). Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.090 g (0.158 mmol, 77 %) eines leicht gelben Schaumes erhalten.

R_f = 0.21 (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1);



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.16–7.12 (m, 6H, H-5, H-7, H-14), 7.09–7.06 (m, 2H, H-16), 6.83–6.82 (m, 6H, H-4, H-8, H-13), 6.74–6.71 (m, 2H, H-17), 5.18 (br s, 1H, H-18), 4.37–4.34 (m, 0.022H, H-10), 4.19 (dd, 1H, $J = 11.1, 3.3$ Hz, H-3), 4.13, 4.11 (ABq, 4H, $J_{9,9'} = J_{12,12'} = 9.6$ Hz, H-9, H-12), 3.96 (dd, 1H, $J = 11.1, 5.5$ Hz, H-3'), 3.37–3.34 (m, 1H, H-2), 2.90 (dd, 1H, $J = 4.8, 4.4$ Hz, H-1), 2.75 (dd, 1H, $J = 4.8, 2.7$ Hz, H-1'), 2.67 (br s, 1H, H-11), 1.64, 1.63 (2 x s, 12H, H-6 und H-15).

$^2\text{H-NMR}$ (77 MHz, $\text{CHCl}_3/\text{CDCl}_3 = 90/10$, 25 °C): δ (ppm) = 4.35 (br s, 1D).



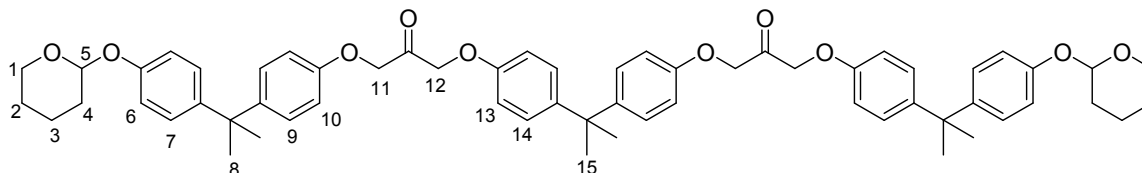
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 2 x 156.4, 156.3 (3 x C_q , C-4, C-13, C-17), 153.6 (C_q , C-26), 143.9, 2 x 143.8 (3 x C_q , C-7, C-10, C-20), 143.1 (C_q , C-23), 128.0 (CH, C-24), 128.0, 127.9 (3 x CH, C-6, C-11, C-19), 114.9 (CH, C-25), 114.2, 2 x 114.1 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 68.8 (CH_2 , C-3), 68.7 (2 x CH_2 , C-14, C-16), 68.7 (1:1:1-t, CD $J_{C-D} = 35$ Hz, C-15), 50.4 (CH, C-2), 45.0 (CH_2 , C-1), 41.9, 41.8 (2 x C_q , C-8, C-21), 31.2, 31.1 (2 x CH_3 , C-9, C-22).

ESI-MS positiv-Modus: m/z 587.3 [$\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$, MS/MS (47 V): m/z (%): 134.8 (100), 587.2 (90), 106.8 (64), 190.8 (24), 381.0 (12), 95.0 (11), 420.4 (10), 229.2 (9), 160.8 (4), 475.8 (4), 494.8 (4).

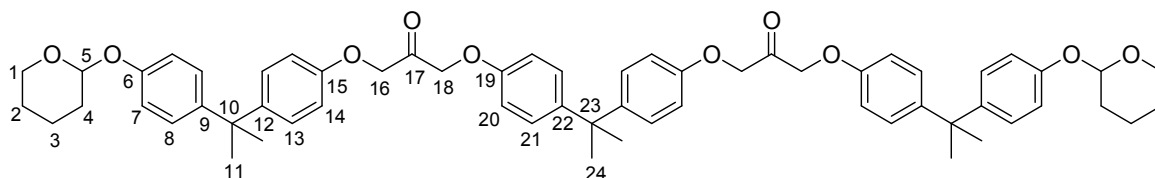
1-[4-(1-Methyl-1-[4-[3-(4-{1-methyl-1-[4-(tetrahydro-pyran-2-yloxy)-phenyl]-ethyl]-phenoxy]-2-oxo-propoxy]-phenyl)-ethyl]-phenoxy]-3-(4-{1-methyl-1-[4-(tetrahydro-pyran-2-yloxy)-phenyl]-ethyl}-phenoxy)-propan-2-on (20):

In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 0.294 g Pyridiniumdichromat (0.785 mmol, 3.00 Äquiv.) und 0.209 g von fein gepulverten, frisch aktivierten Molsieb (3Å) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N_2 -Gegenstrom wurden 0.252 g von **16** (0.261 mmol, 1.00 Äquiv.) in 1.3 ml abs. CH_2Cl_2 und 27 μl wasserfreier Essigsäure (0.466 mmol, 1.79 Äquiv.) zugegeben und die schwarzbraune Suspension für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über SiO_2 filtriert, der Filterkuchen mit 100 ml EtOAc extrahiert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde aufgrund des großen Ansatzes in zwei Teile aufgeteilt und jeweils zweimal säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , PB/EtOAc = 6:1). Es wurden 0.115 g (0.120 mmol, 46 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.49$ (SiO_2 , PB/EtOAc = 2:1);



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 7.11–7.08 (m, 12H, H-7, H-9, H-14), 6.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H-6), 6.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 8H, H-10, H-13), 5.39 (t, $J = 3.1$ Hz, 2H, H-5), 4.95 (br s, 8H, H-11, H-12), 3.78–3.72 (m, 2H, H-1), 3.54–3.49 (m, 2H, H-1'), 1.91–1.79 (m, 2H, H-3), 1.77–1.65 (m, 4H, H-4), 1.63–1.45 (m, 6H, H-2, H-3'), 1.58 (s, 18H, H-8, H-15).

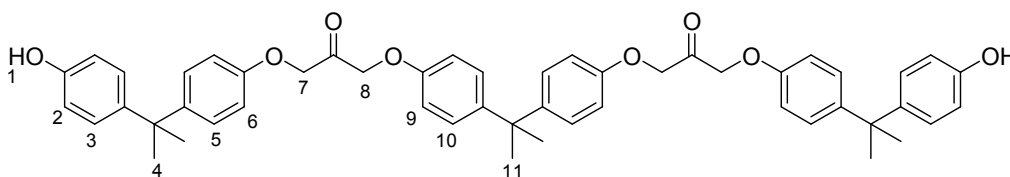


¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 202.0 (C_q, C-17), 155.4 (2 x C_q, C-15 und C-19), 154.3 (C_q, C-6), 143.4 (C_q, C-9), 143.2, 143.1 (2 x C_q, C-12, C-22), 127.4 (2 x CH, C-13, C-21), 127.3 (CH, C-8), 115.8 (CH, C-7), 113.9 (2 x CH, C-14, C-20), 95.8 (CH, C-5), 70.3 (2 x CH₂, C-16, C-18), 61.5 (CH₂, C-1), 41.2 (C_q, C-10, C-23), 30.6 (2 x CH₃, C-11, C-24), 29.9 (CH₂, C-4), 24.7 (CH₂, C-2), 18.7 (CH₂, C-3).

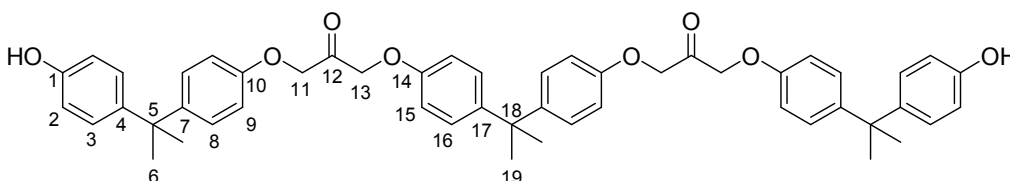
1-{4-[1-(4-Hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy}-3-(4-[1-[4-(3-[4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy]-2-oxo-propoxy)-phenyl]-1-methyl-ethyl]-phenoxy)-propan-2-on (21):

In einem 100 ml Rundkolben wurden 0.316 g von **20** (0.329 mmol, 1.0 Äquiv.) in 60 ml EtOAc/MeOH (2:1, v/v) warm gelöst, 0.632 g Montmorillonit K-10 zugegeben und für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Montmorillonit K-10 wurde über Celite abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde dreimal säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 3:1 → EtOAc). Es wurden 0.228 g (0.357 mmol, 69 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

R_f = 0.13 (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1);



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 9.19 (br s, 2H, H-1), 7.12–7.08 (m, 8H, H-5, H-10), 7.01–6.97 (m, 4H, H-3), 6.85–6.80 (m, 8H, H-6, H-9), 6.68–6.64 (m, 4H, H-2), 2 x 4.96 (2 x s, 8H, H-7, H-8), 1.58 (s, 6H, H-11), 1.55 (s, 12H, H-4).

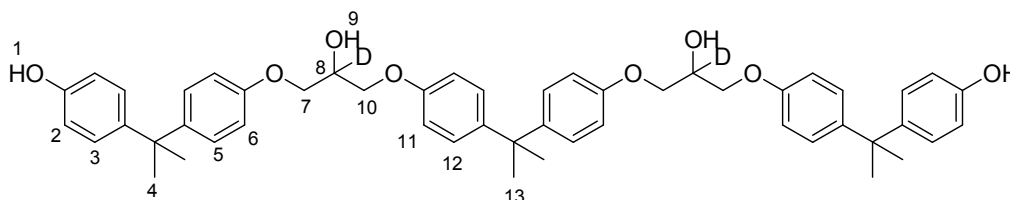


¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 202.1 (C_q, C-12), 155.5, 155.4 (2 x C_q, C-10, C-14), 155.0 (C_q, C-1), 143.6 (C_q, C-7), 143.2 (C_q, C-17), 140.7 (C_q, C-4), 127.5, 127.4 (2 x CH, C-8 und C-16), 127.3 (CH, C-3), 114.7 (CH, C-2), 114.0, 113.9 (2 x CH, C-9, C-15), 70.3 (2 x CH₂, C-11, C-13), 41.2 (C_q, C-18), 41.1 (C_q, C-5), 30.8 (CH₃, C-6), 30.7 (CH₃, C-19).

2-Deuterio-1-[4-(1-[4-[2-deuterio-2-hydroxy-3-(4-[1-methyl-1-[4-hydroxy-phenyl]-ethyl]-phenoxy)-propoxy]-phenyl]-1-methyl-ethyl)-phenoxy]-3-(4-[1-methyl-1-[4-hydroxy-phenyl]-ethyl]-phenoxy)-propan-2-ol (BADGE-2BPA-d₂) (22):

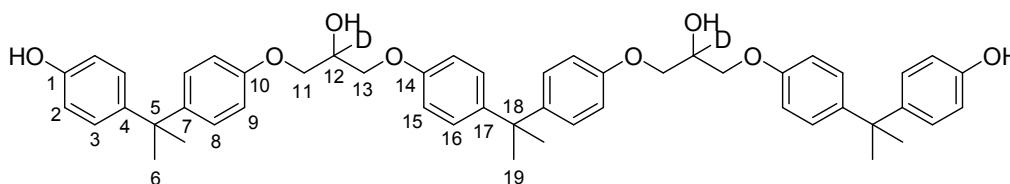
In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 0.056 g von **21** (0.071 mmol, 1.0 Äquiv.) in 3.2 ml THF/EtOH (3:1, v/v) gelöst, die Apparatur für 5 min mit N₂ gespült und die Lösung im Eis/Wasser/NaCl-Bad auf 0 °C abgekühlt. Im N₂-Gegenstrom wurden 0.012 g NaBD₄ (0.287 mmol, 4.0 Äquiv.) versetzt und anschließend für 20 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit 1 ml wässriger, gesättigter NH₄Cl-Lösung und 1 ml wässriger, gesättigter NaCl-Lösung gequenchet und auf Raumtemperatur erwärmt. Die Suspension wurde mit EtOAc (3 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit dest. Wasser (3 x 4 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch vorgereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1) und auf einer präparativen DC gereinigt (SiO₂, 2 mm, PB/EtOAc = 1:1). Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.034 g (0.043 mmol, 61 %) eines farblosen Schaumes erhalten.

R_f = 0.48 (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1);



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 7.15–7.12 (m, 8H, H-5, H-12), 7.08–7.05 (m, 4H, H-3), 6.83–6.80 (m, 8H, H-6, H-11), 6.74–6.71 (m, 4H, H-2), 5.62 (br s, 2H, H-1), 4.39–4.34 (m, 0.048H, H-8), 4.13, 4.10 (ABq, 8H, $J_{7,7'} = J_{10,10'} = 9.6$ Hz, H-7, H-10), 2.82 (br s, 2H, H-9), 1.63 (s, 6H, H-13), 1.62 (s, 12H, H-4).

²H-NMR (77 MHz, CHCl₃/CDCl₃ = 90/10, 25 °C): δ (ppm) = 4.35 (br s, 2D).



¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 2 x 156.4 (2 x C_q, C-10, C-14), 153.5 (C_q, C-1), 144.0, 143.9 (2 x C_q, C-7, C-17), 143.2 (C_q, C-4), 128.0 (CH, C-3), 127.9 (2 x CH, C-8, C-16), 114.9 (CH, C-2), 2 x 114.1 (2 x CH, C-9, C-15), 68.7 (2 x CH₂, C-11, C-13), 68.6 (1:1:1-t, CD, $J_{C-D} = 20.1$ Hz, C-12), 41.9 (C_q, C-18), 41.8 (C_q, C-5), 31.2 (CH₃, C-6), 31.1 (CH₃, C-19).

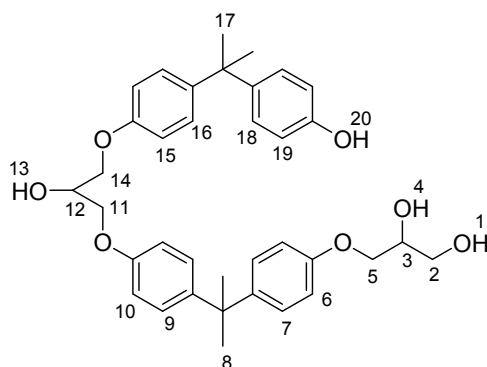
ESI-MS positiv-Modus: m/z 816.4 [M+NH₄]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 816.4 (100), 135.6 (77), 107.8 (43), 479.2 (28), 420.2 (10), 165.2 (9), 360.6 (8), 705.2 (7), 113.6 (7), 431.4 (7), 105.6 (7).

3-(4-[1-[4-(2-Hydroxy-3-(4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy)-propoxy]-phenyl]-1-methyl-ethyl]-phenoxy)-propan-1,2-diol (BADGE-BPA-H₂O) (3):

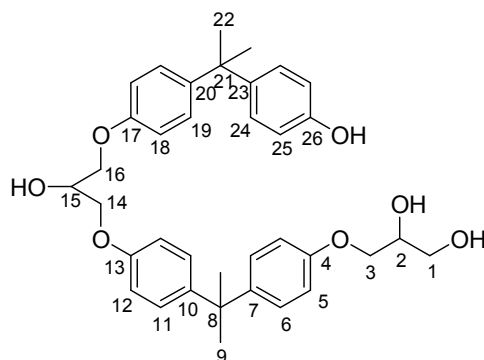
In einem 5 ml Rundkolben wurden 0.130 g von **2** (0.229 mmol, 1.0 Äquiv.) in 2.1 ml Aceton/H₂O (5:1, v/v) gelöst, mit 115 µl 2M H₂SO₄ (0.230 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt und die Lösung für 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit wässriger 10%iger NaHCO₃-Lösung

neutralisiert und mit Diethylether (3 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit dest. Wasser (2 x 10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1). Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.063 g (0.107 mmol, 47 %) eines farblosen Öls erhalten.

R_f = 0.08 (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1);



¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 8.09 (br s, 1H, H-20), 7.15–7.12 (m, 6H, H-7, H-9, H-16), 7.06–7.03 (m, 2H, H-18), 6.88–6.82 (m, 6H, H-6, H-10, H-15), 6.74–6.72 (m, 2H, H-19), 4.44 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-13), 4.32–4.27 (m, 1H, H-12), 4.16–4.02 (m, 4H, H-4, H-5, H-11, H-14), 4.00–3.94 (m, 2H, H-3, H-5'), 3.75 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, H-1), 3.71–3.61 (m, 2H, H-2), 1.61, 1.60 (2 x s, 12H, H-8, H-17).



¹³C-NMR (125 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 157.9, 157.7, 157.7 (3 x C_q, C-4, C-13, C-17), 156.0 (C_q, C-26), 144.3, 144.1, 143.9 (3 x C_q, C-7, C-10, C-20), 142.6 (C_q, C-23), 128.5, 128.4 (4 x CH, C-6, C-11, C-19, C-24), 115.5 (CH, C-25), 114.8, 114.7 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 71.4 (CH, C-2), 70.2 (CH₂, C-3), 70.1 (2 x CH₂, C-14, C-16), 69.3 (CH, C-15), 64.2 (CH₂, C-1), 42.2, 42.1 (2 x C_q, C-8, C-21), 31.5, 31.4 (2 x CH₃, C-9, C-22).

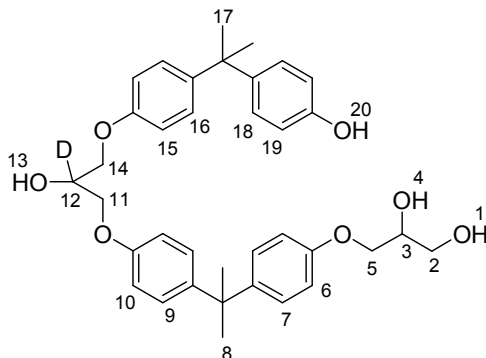
ESI-MS positiv-Modus: *m/z* 604.3 [M+NH₄]⁺, MS/MS (47 V): *m/z* (%): 135.4 (100), 107.6 (65), 604.2 (51), 267.0 (30), 266.2 (17), 209.0 (15), 493.0 (14), 360.2 (10), 418.8 (5), 219.2 (4), 119.6 (4).

3-(4-{1-[4-(2-Deuterio-2-hydroxy-3-{4-[1-(4-hydroxy-phenyl)-1-methyl-ethyl]-phenoxy}-propoxy)-phenyl]-1-methyl-ethyl}-phenoxy)-propan-1,2-diol (BADGE·BPA·H₂O-d₁) (23):

In einem 25 ml Rundkolben wurden 0.152 g von **19** (0.267 mmol, 1.0 Äquiv.) in 2.5 ml Aceton/H₂O (5:1, v/v) gelöst, mit 134 µl 2M H₂SO₄ (0.268 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt und die Lösung für 23.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit wässriger 10%iger NaHCO₃-Lösung neutralisiert und mit Diethylether (3 x 15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden

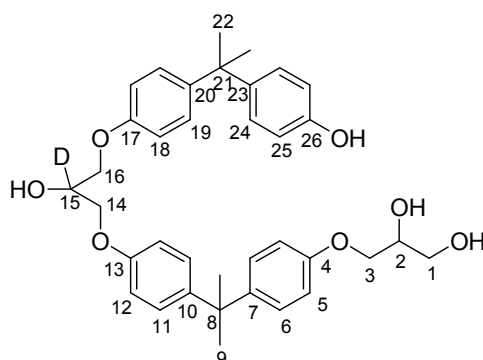
mit dest. Wasser (2 x 10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1). Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.079 g (0.134 mmol, 50 %) eines farblosen Öls erhalten.

R_f = 0.08 (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1);



¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 8.12 (br s, 1H, H-20), 7.15–7.12 (m, 6H, H-7, H-9, H-16), 7.06–7.03 (m, 2H, H-18), 6.88–6.82 (m, 6H, H-6, H-10, H-15), 6.74–6.71 (m, 2H, H-19), 4.44 (br s, 1H, H-13), 4.30–4.26 (m, 0.072H, H-12), 4.15–4.01 (m, 6H, H-4, H-5, H-11, H-14), 3.99–3.93 (m, 2H, H-3, H-5'), 3.77 (t, 1H, J = 5.8 Hz, H-1), 3.71–3.61 (m, 2H, H-2), 1.61, 1.60 (2 x s, 12H, H-8, H-17).

²H-NMR (77 MHz, Aceton/Aceton-d₆ = 90/10, 25 °C): δ (ppm) = 4.28 (br s, 1D).



¹³C-NMR (125 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 157.9, 157.7, 157.7 (3 x C_q, C-4, C-13, C-17), 156.0 (C_q, C-26), 144.3, 144.1, 143.9 (3 x C_q, C-7, C-10, C-20), 142.6 (C_q, C-23), 128.5, 128.4 (4 x CH, C-6, C-11, C-19, C-24), 115.5 (CH, C-25), 114.8, 114.7 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 71.4 (CH, C-2), 70.3 (CH₂, C-3), 70.1 (2 x CH₂, C-14, C-16), 68.9 (1:1:1-t, CD, J_{C-D} = 22 Hz, C-15), 64.2 (CH₂, C-1), 42.2, 42.1 (2 x C_q, C-8, C-21), 31.5, 31.4 (2 x CH₃, C-9, C-22).

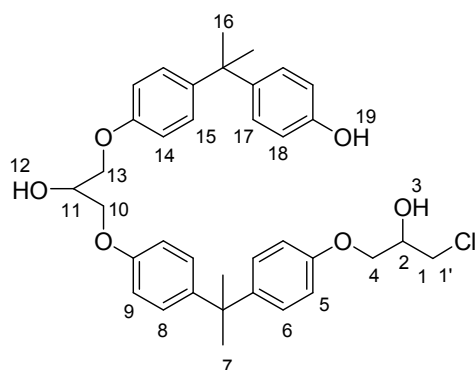
ESI-MS positiv- Modus: m/z 605.3 [M+NH₄]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 135.4 (100), 605.2 (76), 107.6 (56), 268.2 (17), 494.0 (14), 209.0 (13), 267.0 (9), 361.4 (5), 420.0 (5), 266.2 (5), 360.2 (4).

4-(1-{4-[3-(4-{1-[4-(3-Chloro-2-hydroxy-propoxy)-phenyl]-1-methyl-ethyl}-phenoxy)-2-hydroxy-propoxy]-phenyl}-1-methyl-ethyl)-phenol (BADGE-BPA-HCl) (4):

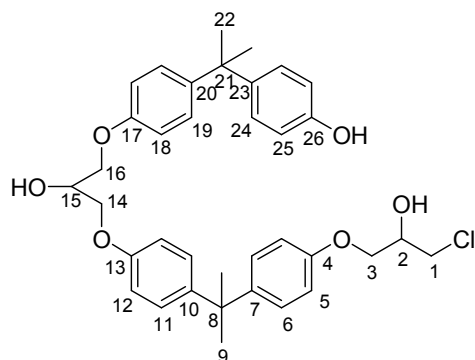
In einem 10 ml Rundkolben wurden 0.100 g von **2** (0.176 mmol, 1.0 Äquiv.) in 3 ml Acetonitril gelöst, mit 0.066 g CeCl₃·7H₂O (0.176 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt und die milchige Suspension für 23.5 h zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 3:1). Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.083 g (0.137 mmol, 78 %) eines farblosen Öls erhalten.

R_f = 0.22 (SiO₂, PB/EtOAc = 3:2);



¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 8.08 (br s, 1H, H-19), 7.16–7.13 (m, 6H, H-6, H-8, H-15), 7.06–7.03 (m, 2H, H-17), 6.88–6.84 (m, 6H, H-5, H-9, H-14), 6.74–6.71 (m, 2H, H-18), 4.59 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-3), 4.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-12), 4.32–4.27 (m, 1H, H-11), 4.20–4.05 (m, 7H, H-2, H-4, H-10, H-13), 3.81 (dd, 1H, *J* = 11.2 Hz, 4.8 Hz, H-1), 3.71 (dd, 1H, *J* = 11.2 Hz, 5.6 Hz, H-1'), 1.62, 1.60 (2 x s, 12H, H-7, H-16).



¹³C-NMR (125 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 157.8, 157.7, 157.6 (3 x C_q, C-4, C-13, C-17), 156.0 (C_q, C-26), 144.3, 144.3, 144.0 (3 x C_q, C-7, C-10, C-20), 142.6 (C_q, C-23), 128.5, 128.5, 128.5 (4 x CH, C-6, C-11, C-19, C-24), 115.5 (CH, C-25), 114.8, 114.8 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 70.6 (CH, C-2), 70.2, 70.2 (2 x CH₂, C-14, C-16), 69.9 (CH₂, C-3), 69.3 (CH, C-15), 47.2 (CH₂, C-1), 42.3, 42.2 (2 x C_q, C-8, C-21), 31.5, 31.4 (2 x CH₃, C-9, C-22).

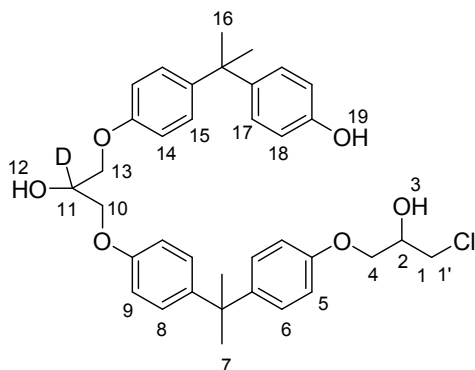
ESI-MS positiv-Modus: m/z 622.3 [M+NH₄]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 135.4 (100), 622.2 (86), 107.6 (63), 227.0 (30), 285.0 (20), 511.2 (11), 410.2 (8), 419.2 (7), 409.4 (6), 284.2 (4), 360.0 (4).

Das Syntheseprodukt **4** zeigte innerhalb eines Tages eine Zersetzung in Chloroform-*d*₁, d.h. die Aufnahme von NMR-Spektren in diesem Lösungsmittel ist nicht empfehlenswert. Die Verbindungen **3** und **4** wurden in Aceton gelöst und die Reinheit mittels DC überprüft, da nach zwei Tagen keine Zersetzung eintrat, wurden die NMR-Spektren in Aceton-*d*₆ aufgenommen.

4-(1-{4-[3-(4-[1-(4-(3-Chloro-2-hydroxy-propoxy)-phenyl]-1-methyl-ethyl)-phenoxy]-2-deuterio-2-hydroxy-propoxy]-phenyl}-1-methyl-ethyl)-phenol (BADGE-BPA·HCl-d₁) (**24**):

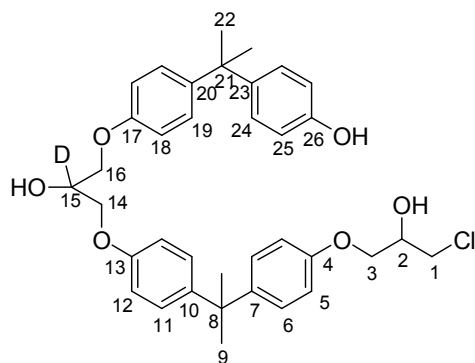
In einem 25 ml Rundkolben wurden 0.119 g von **19** (0.209 mmol, 1.0 Äquiv.) in 3.6 ml Acetonitril gelöst, mit 0.078 g CeCl₃·7H₂O (0.209 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt und die milchige Suspension für 23.5 h zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, PB/EtOAc = 3:1). Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.101 g (0.167 mmol, 80 %) eines farblosen Öls erhalten.

R_f = 0.22 (SiO₂, PB/EtOAc = 3:2);



¹H-NMR (500 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 8.08 (br s, 1H, H-18), 7.16–7.13 (m, 6H, H-6, H-8, H-15), 7.06–7.03 (m, 2H, H-17), 6.88–6.84 (m, 6H, H-5, H-9, H-14), 6.74–6.71 (m, 2H, H-18), 4.60 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-3), 4.42 (br s, 1H, H-12), 4.32–4.27 (m, 0.044H, H-11), 4.20–4.03 (m, 7H, H-2, H-10, H-13, H-4), 3.81 (dd, 1H, *J* = 11.1, 4.8 Hz, H-1), 3.71 (dd, 1H, *J* = 11.1, 5.6 Hz, H-1'), 1.62, 1.60 (2 x s, 12H, H-7, H-16).

²H-NMR (77 MHz, Aceton/Aceton-d₆ = 90/10, 25 °C): δ (ppm) = 4.28 (br s, 1D).

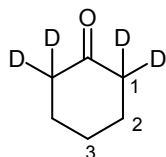


¹³C-NMR (125 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 157.7, 157.7, 157.5 (3 x C_q, C-4, C-13, C-17), 156.0 (C_q, C-26), 144.3, 144.3, 144.0 (3 x C_q, C-7, C-10, C-20), 142.6 (C_q, C-23), 128.5, 128.5, 128.4 (4 x CH, C-6, C-11, C-19, C-24), 115.5 (CH, C-25), 114.8, 114.7 (3 x CH, C-5, C-12, C-18), 70.6 (CH₂, C-3), 70.1 (2 x CH₂, C-14, C-16), 69.9 (CH, C-2), 68.9 (1:1:1-t, CD, *J*_{C-D} = 22 Hz, C-15), 47.2 (CH₂, C-1), 42.3, 42.2 (2 x C_q, C-8, C-21), 31.5, 31.4 (2 x CH₃, C-9, C-22).

ESI-MS positiv-Modus: m/z 623.3 [M+NH₄]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 135.4 (100), 623.2 (71), 107.6 (60), 227.2 (28), 512.2 (9), 420.0 (8), 286.0 (7), 285.0 (7), 408.8 (7), 238.0 (5), 546.8 (5).

Cyclohexanon-2,2,6,6-d₄ (**25**):^[51]

In einem 25 ml Rundkolben wurden 0.500 g Cyclohexanon (5.094 mmol, 1.000 Äquiv.), 0.053 g K₂CO₃ (0.382 mmol, 0.075 Äquiv.) in 7.92 ml D₂O (99.96 atom % D) gelöst und anschließend für 2 d 16 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit *n*Pentan (3 x 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden eingengt (600 mbar, 30 °C). Das Rohprodukt wurde mittels Kugelrohr destilliert (45–55 mbar, 55–65 °C). Es wurden 0.250 g (2.447 mmol, 48 %) eines farblosen Schaumes erhalten.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 2.33–2.28 (m, 0.127 H, H-1), 1.86–1.83 (m, 4H, H-2), 1.74–1.66 (m, 2H, H-3).

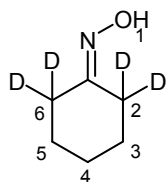
GC-MS m/z (%): 102.2 (36), 72.1 (32), 56.1 (100), 44.1 (82), 43.2 (38). R_t = 6.77 min

Cyclohexanonoxim-2,2,6,6-d₄ (**26**):^[50]

Herstellung von Hydroxylaminhydrochlorid-d₄:^[52] In einem 50 ml Rundkolben mit Rückflusskühler wurden 1.027 g Hydroxylaminhydrochlorid (14.78 mmol, 1 Äquiv.) in 1.5 ml D₂O (99.96 atom % D) suspendiert. Die Suspension wurde für 20 min bei 80 °C erhitzt, wobei eine homogene Lösung entstanden ist. Das Reaktionsgemisch wurde eingengt und die Prozedur mit dem erhaltenen Rückstand noch zweimal wiederholt. Der Feststoff wurde für 12 h über Blaugel und im Feinvakuum gefriergetrocknet. Es wurden 1.080 g (14.69 mmol, 99 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

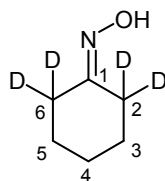
In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 0.954 g Hydroxylaminhydrochlorid-d₄ (12.98 mmol, 1.02 Äquiv.) in 2.400 ml D₂O (99.96 atom % D) gelöst und mit 1.318 ml von **25** (12.72 mmol, 1.00 Äquiv.) versetzt. Dazu wurde unter Rühren eine gesättigte Lösung von 0.701 g Na₂CO₃ (6.61 mmol, 0.52 Äquiv.) in 3.200 ml D₂O (99.96 atom % D) langsam zugetropft, dabei fiel unter starkem Schäumen ein weißer Niederschlag aus. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform (3 x 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 1.332 g (11.31 mmol, 89 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

R_f = 0.49 (SiO₂, PB/EtOAc = 2:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.06 (br s, 1H, H-1), 2.46–2.43 (m, 0.073H, H-2 *syn* zur OH-Gruppe), 2.20–2.17 (m, 0.089H, H-6 *anti* zu OH-Gruppe), 1.66–1.64 (m, 2H, H-4), 1.60–1.55 (m, 2H, H-3, H-5).

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des unmarkierten Cyclohexanonoxims wurde in der Literatur beschrieben.^[65] Daraus folgt, dass das tieffeldverschobenes Restprotonensignal bei $\delta = 2.44$ ppm der $\alpha\text{-CH}_2$ -Gruppe entspricht, die *syn* zur OH-Gruppe steht.



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 160.8 (C_q , C-1), 31.9 (1:1:1-t, CHD, $J_{\text{C-D}} = 19.6$ Hz, C-6), 31.6 (1:3:4:3:1-quin, CD_2 , $J_{\text{C-D}} = 20.1$ Hz, C-6), 27.0 (CH_2 , C-5*), 26.9 (CH_2 , C-5), 25.9 (CH_2 , C-4), 25.7 (CH_2 , C-3*), 25.6 (CH_2 , C-3), 24.3 (1:1:1-t, CHD, $J_{\text{C-D}} = 19.6$ Hz, C-2), 24.0 (1:3:4:3:1-quin, CD_2 , $J_{\text{C-D}} = 19.7$ Hz, C-2).

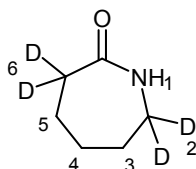
Bei den Signalen bei 27.0 und 25.7 ppm handelt es sich um die C-3 und C-5-Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindungen stammen.

GC-MS: m/z (%): 117.2 (100), 100.2 (47), 74.1 (33), 70.1 (43), 62.1 (37), 61.1 (33), 57.1 (62), 56.1 (38), 55.1 (33), 44.1 (55), 43.1 (67), 42.1 (40), 41.1 (31). $R_t = 6.47$ min.

ϵ -Caprolactam- d_4 (**27**):^[50]

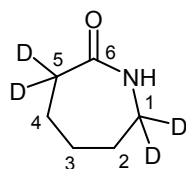
In einem 25 ml 2-Halskolben mit Rückflusskühler und Innenthermometer wurden 0.096 g von **26** (0.815 mmol, 1.00 Äquiv.) eingewogen. Dazu wurde eine Lösung von 94.5 μl D_2SO_4 (98 % in D_2O , 99.5 atom % D) in 18.9 μl D_2O (99.96 atom % D) gegeben und die Reaktionsmischung für 20 min auf eine Innentemperatur von 120–123 °C erhitzt. Die braune Lösung wurde im Eisbad abgekühlt, mit 5 ml Wasser verdünnt und mit wässriger Ammoniaklösung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform (5 x 5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, mit Aktivkohle für 10 min gerührt, erneut über Celite filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Kugelrohr destilliert (0.46–0.34 mbar, 140–150 °C). Es wurden 0.087 g (0.742 mmol, 91 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.16$ (SiO_2 , EtOAc);



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 6.48 (br s, 1H, NH), 3.18–3.14 (m, 0.085H, H-2), 2.43–2.40 (m, 0.083H, H-6), 1.76–1.71 (m, 2H, H-4), 1.67–1.65 (m, 2H, H-5), 1.62–1.60 (m, 2H, H-3).

$^2\text{H-NMR}$ (77 MHz, $\text{CHCl}_3/\text{CDCl}_3 = 9/1$, 25 °C): δ (ppm) = 3.17 (br s, 2D, D-2), 2.42 (br s, 2D, D-6).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 179.5 (C_q , C-6), 42.5 (1:1:1-t, CHD, $J_{\text{C-D}} = 20.5$ Hz, C-1), 42.2 (1:3:4:3:1-quin, CD_2 , $J_{\text{C-D}} = 20.8$ Hz, C-1), 36.5 (1:1:1-t, CHD, $J_{\text{C-D}} = 20.0$ Hz, C-5), 36.1 (1:3:4:3:1-quin, CD_2 , $J_{\text{C-D}} = 19.3$ Hz, C-5), 30.5 (CH_2 , C-3), 29.7 (CH_2 , C-2*), 29.6 (CH_2 , C-2), 23.2 (CH_2 , C-4*), 23.1 (CH_2 , C-4).

Bei den Signalen bei 29.7, 23.2 ppm handelt es sich um die C-2 und C-4-Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindungen stammen. Weiterhin konnten die einfach und zweifach deuterierten Kohlenstoffatome (CD und CD_2) beobachtet werden. Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum erscheinen sie als überlagerte 1:1:1-Triplets der CD-Gruppe und 1:3:4:3:1-Quintetts der CD_2 -Gruppe.

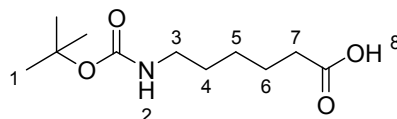
GC-MS m/z (%): 117.2 (100), 87.1 (83), 86.1 (64), 58.1 (79), 57.1 (62), 56.1 (88), 55.1 (84), 44.1 (89), 43.1 (63), 42.1 (43), 41.1 (31), 33.1 (66), 32.1 (95), 30.1 (41), 29.1 (47). $R_t = 9.56$ min.

ESI-MS positiv-Modus: m/z 118,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS/MS (47 V): m/z (%): 118.6 (100), 45.2 (28), 58.0 (5), 46.2 (4), 73.0 (4), 100.8 (4), 44.0 (4), 41.2 (3), 82.8 (3), 43.2 (3), 81.8 (3).

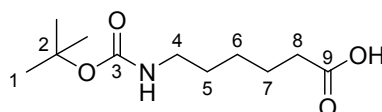
6-(((2-Methyl-2-propanyl)oxy)carbonyl)amino)hexansäure (**28**):^[53,54]

In einem 10 ml Rundkolben wurden 1.000 g ϵ -Caprolactam (8.84 mmol, 1.0 Äquiv.) in 2.43 ml einer 4 M Natronlauge (0.389 g, 9.72 mmol, 1.1 Äquiv.) gelöst und für 30 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Rückstand mit 18 ml Wasser in einen 3-Halskolben überführt. Zu der 0 °C kalten Lösung des Natriumsalzes der 6-Aminohexansäure in 0.5 M Natronlauge wurde im N_2 -Gegenstrom aus einem Tropftrichter eine Lösung von 2.122 g Di-*tert*-Butyloxycarbonat (9.72 mmol, 1.1 Äquiv.) in 18 ml abs. THF innerhalb von 13 min zugetropft. Nachdem Rühren bei Raumtemperatur für 24 h wurde die Reaktionsmischung mit 10 ml Wasser gequench, mit Et_2O (3 x 10 ml) extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde auf 0 °C abgekühlt, mit Natriumcitrat-Puffer auf pH 5 angesäuert und anschließend mit Et_2O (4 x 40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das dickflüssige farblose Öl wurde mit -20 °C kaltem Petroleumbenzin versetzt und im Tiefkühler zum Auskristallisieren stengelassen. Es wurden 1.544 g (6.68 mmol, 76 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.24$ (SiO_2 , PB/EtOAc = 1:1);



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 9.95 (br s, 1H, H-8), 5.87 (br s, Verunreinigung), 4.59 (br s, 1H, H-2), 3.13–3.05 (m, 2H, H-3), 2.33 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, H-7), 1.67–1.58 (m, 2H, H-6), 1.52–1.42 (m, 11H, H-4, H-1), 1.39–1.31 (m, 2H, H-5).

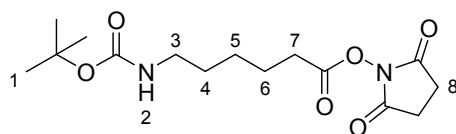


$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 179.2 (C_q , C-9), 156.2 (C_q , C-3), 79.3 (C_q , C-2), 40.5 (CH_2 , C-4), 34.0 (CH_2 , C-8), 29.8 (CH_2 , C-5), 28.5 (CH_3 , C-1), 26.3 (CH_2 , C-6), 24.5 (CH_2 , C-7).

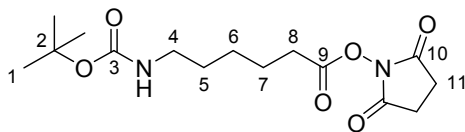
1-(2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl)-6-({[(2-methyl-2-propanyl)oxy]carbonyl}amino)hexanoat (**29**):^[55]

In einem 50 ml 2-Halskolben wurden 0.886 g von **28** (3.83 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.441 g *N*-Hydroxysuccinimid (3.83 mmol, 1.0 Äquiv.) eingewogen, die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt und die Feststoffe in 35 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. Im N₂-Gegenstrom wurden 1.102 g *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (5.75 mmol, 1.5 Äquiv) zugegeben und die gelbe Suspension bei Raumtemperatur für 17.5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 10 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das leicht gelbe Öl kristallisierte langsam durch. Das Rohprodukt wurde aus PB/EtOAc (2:1) umkristallisiert. Es wurden 1.1203 g (3.41 mmol, 89 %) eines weißen, kristallinen Feststoffs erhalten.

R_f = 0.37 (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 4.61 (br s, 1H, H-2), 3.13–3.08 (m, 2H, H-3), 2.82, 2.82 (2 x s, 4H, H-8), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, H-7), 1.79–1.71 (m, 2H, H-6), 1.54–1.38 (m, 4H, H-4, H-5), 1.42 (s, 9H, H-1).

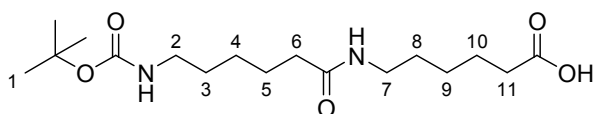


¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 169.3 (C_q, C-10), 168.6 (C_q, C-9), 156.1 (C_q, C-3), 79.2 (C_q, C-2), 40.3 (CH₂, C-4), 30.9 (CH₂, C-8), 29.6 (CH₂, C-5), 28.5 (CH₃, C-1), 26.0 (CH₂, C-6), 25.7 (CH₂, C-11), 24.3 (CH₂, C-7).

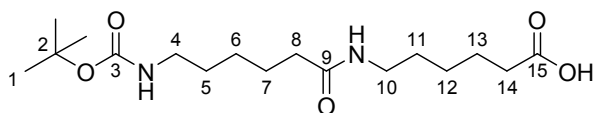
6-{{[6-({[(2-Methyl-2-propanyl)oxy]carbonyl}amino)hexanoyl]amino}hexansäure (**30**):^[55]

In einem 100 ml 3-Halskolben wurden 1.100 g von **29** (3.35 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.44 g 6-Aminohexansäure (3.35 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 33 ml abs. DMF und 1.4 ml abs. NEt₃ (10.05 mmol, 3.0 Äquiv.) zugegeben und die farblose Suspension für 18.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde größtenteils unter vermindertem Druck entfernt (30–50 mbar, 80 °C). Der Rückstand wurde in 100 ml EtOAc aufgenommen, mit 1N HCl (2 x 20 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde aus PB/EtOAc (1:1) umkristallisiert. Es wurden 1.005 g (2.92 mmol, 87 %) eines feinen, weißen Feststoffs erhalten.

R_f = 0.22 (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 15:1);



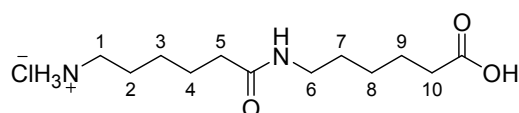
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 3.16 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, H-7), 3.02 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, H-2), 2.30 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, H-11), 2.17 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-6), 1.66–1.57 (m, 4H, H-10, H-5), 1.55–1.28 (m, 8H, H-8, H-3, H-9, H-4), 1.43 (s, 9H, H-1).



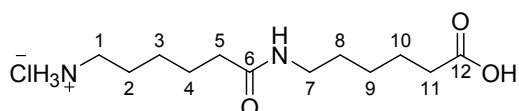
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 177.5 (C_q, C-15), 176.1 (C_q, C-9), 158.6 (C_q, C-3), 79.8 (C_q, C-2), 41.2 (CH₂, C-4), 40.2 (CH₂, C-10), 37.0 (CH₂, C-8), 34.8 (CH₂, C-14), 30.7 (CH₂, C-5), 30.1 (CH₂, C-11), 28.8 (CH₃, C-1), 27.5, 27.4 (CH₂, C-6, C-12), 26.8 (CH₂, C-7), 25.7 (CH₂, C-13).

6-[(6-Aminohexanoyl)amino]hexansäurehydrochlorid (1:1) (Di-Ahx-HCl) (31):

In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 104.5 mg von **30** (0.303 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 5 ml HCl_(g) in abs. EtOAc zugegeben, die weiße Suspension wurde für 6.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit 10 ml Et₂O (getrocknet über KOH) in ein Zentrifugenglas überführt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Der Rückstand wurde noch zweimal mit 5 ml Et₂O versetzt, im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Um das Edukt zu entfernen wurde der Feststoff dreimal mit 10 ml EtOAc versetzt, beim ersten und zweiten Mal im Ultraschallbad behandelt, beim dritten Mal auf 50 °C erhitzt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Nach dem Trocknen im Exsikkator über KOH für 72 h und im Ofen für 4 h bei 80 °C wurden 81.4 mg (0.290 mmol, 96 %) eines weißen Feststoffs erhalten.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆/D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 2.98 (t, 2H, J = 7.0 Hz, H-6), 2.73 (t, 2H, J = 7.6 Hz, H-1), 2.17 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H-10), 2.04 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H-5), 1.54–1.41 (m, 6H, H-2, H-4, H-9), 1.37–1.32 (m, 2H, H-7), 1.26–1.17 (m, 4H, H-3, H-8).



¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 174.4 (C_q, C-12), 171.8 (C_q, C-6), 38.6 (CH₂, C-1), 38.3 (CH₂, C-7), 35.1 (CH₂, C-5), 33.7 (CH₂, C-11), 28.9 (CH₂, C-8), 26.7 (CH₂, C-2), 26.0 (CH₂, C-9), 25.6 (CH₂, C-3), 24.8 (CH₂, C-4), 24.2 (CH₂, C-10).

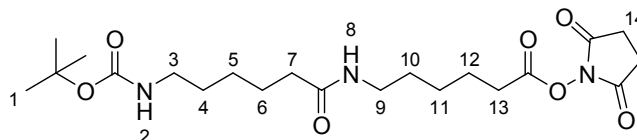
ESI-MS positiv-Modus: m/z 245.2 [M+H]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 245.2 (100), 114.6 (80), 42.2 (39), 228.2 (30), 70.0 (26), 79.8 (25), 77.8 (20), 40.2 (18), 96.8 (13), 132.6 (12), 56.0 (12).

1-(2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl)-6-[[6-((2-Methyl-2-propoxy)oxy)carbonyl]amino]hexanoat (32):

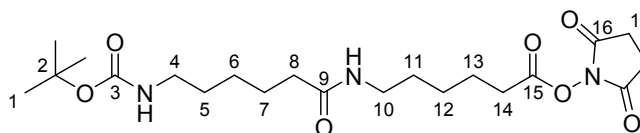
In einem 100 ml -Halskolben wurden 0.500 g von **30** (1.45 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.167 g *N*-Hydroxysuccinimid (1.45 mmol, 1.0 Äquiv.) eingewogen, die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt und die Feststoffe in 25 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. Im N₂-Gegenstrom wurden 0.418 g *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (2.18 mmol, 1.5 Äquiv) zugegeben und die gelbe Suspension bei Raumtemperatur für 17.5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 10 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das

Rohprodukt wurde aus PB/EtOAc (1:1) umkristallisiert. Es wurden 0.652 g (1.48 mmol, 100 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.28$ (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 30:1); $R_f = 0.40$ (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 15:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 5.76 (br s, 1H, H-8), 4.59 (br s, 1H, H-2), 3.27–3.22 (m, 2H, H-9), 3.11–3.06 (m, 2H, H-3), 3.84, 3.84 (2 x s, 4H, H-14), 2.61 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-13), 2.15 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-7), 1.80–1.73 (m, 2H, H-12), 1.67–1.59 (m, 2H, H-6), 1.57–1.29 (m, 8H, H-10, H-4, H-11, H-5), 1.42 (s, 9H, H-1).

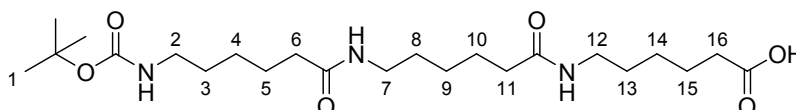


¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 173.1 (C_q, C-9), 169.4 (C_q, C-16), 168.6 (C_q, C-15), 156.1 (C_q, C-3), 79.2 (C_q, C-2), 40.5 (CH₂, C-4), 39.0 (CH₂, C-10), 36.6 (CH₂, C-8), 31.0 (CH₂, C-14), 29.9 (CH₂, C-5), 29.0 (CH₂, C-11), 28.5 (CH₃, C-1), 26.5 (CH₂, C-6), 25.8 (CH₂, C-12), 25.7 (CH₂, C-17), 25.5 (CH₂, C-7), 24.3 (CH₂, C-13).

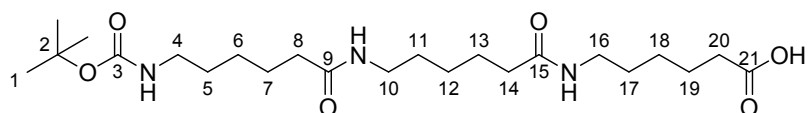
6-[[6-[[6-[[[2-Methyl-2-propanyl]oxy]carbonyl]amino]hexanoyl]amino]hexanoyl]amino]hexansäure (33):

In einem 100 ml 3-Halskolben wurden 0.535 g von **32** (1.21 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.159 g 6-Aminohexansäure (1.21 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 18 ml abs. DMF und 0.50 ml abs. NEt₃ (3.63 mmol, 3.0 Äquiv.) zugegeben und die farblose Suspension für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde größtenteils unter vermindertem Druck entfernt (30–100 mbar, 80 °C). Der Rückstand wurde in 150 ml EtOAc aufgenommen, mit 1N HCl (2 x 20 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde aus PB/EtOAc (1:5.4) umkristallisiert. Der flockige Niederschlag wurde abfiltriert und mit -20 °C kaltem Petroleumbenzin gewaschen. Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.422 g (0.92 mmol, 76 %) eines feinen, weißen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.17$ (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 15:1);



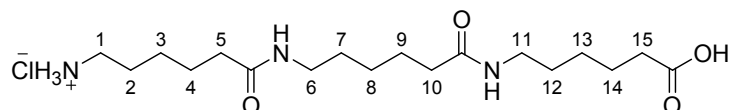
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 3.16, 3.16 (2 x t, 4H, $J = 7.0, 7.0$ Hz, H-7, H-12), 3.02 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2), 2.30 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, H-16), 2.18, 2.17 (2 x t, 4H, $J = 7.5, 7.6$ Hz, H-6, H-11), 1.65–1.58 (m, 6H, H-5, H-10, H-15), 1.55–1.45 (m, 6H, H-3, H-8, H-13), 1.43 (s, 9H, H-1), 1.40–1.29 (m, 6H, H-4, H-9, H-14).



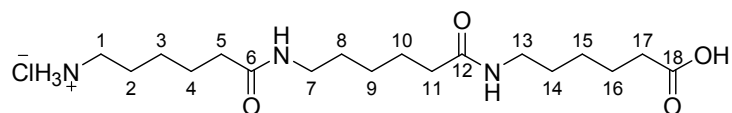
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 177.4 (C_q, C-21), 176.0, 176.0 (2 x C_q, C-9, C-15), 158.5 (C_q, C-3), 79.8 (C_q, C-2), 41.2 (CH₂, C-4), 40.2 (2 x CH₂, C-10, C-16), 2 x 37.0 (2 x CH₂, C-8, C-14), 34.8 (CH₂, C-20), 30.7 (CH₂, C-5), 30.1 (2 x CH₂, C-11, C-17), 28.8 (CH₃, C-1), 27.5, 27.5, 27.4 (3 x CH₂, C-6, C-12, C-18), 26.8, 26.7 (2 x CH₂, C-7, C-13), 25.7 (CH₂, C-19).

6-((6-[[6-Aminohexanoyl]amino]hexanoyl)amino)hexansäurehydrochlorid (1:1) (Tri-Ahx-HCl) (34):

In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 162.0 mg von **33** (0.354 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 10 ml HCl_(g) in abs. EtOAc zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit 5 ml Et₂O (vorgetrocknet über Na₂SO₄) in ein Zentrifugenglas überführt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Der Rückstand wurde noch dreimal mit 10 ml Et₂O versetzt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Um das Edukt zu entfernen wurde der Feststoff sechsmal mit 10 ml EtOAc versetzt, beim ersten und zweiten Mal im Ultraschallbad behandelt, beim dritten bis sechsten Mal auf 50 °C erhitzt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Nach dem Trocknen im Exsikkator über Blaugel für 72 h und im Ofen für 8 h bei 80 °C wurden 128.3 mg (0.326 mmol, 92 %) eines weißen Feststoffs erhalten.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆/D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 2.98 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz, H-6, H-11), 2.73 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, H-1), 2.17 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, H-15), 2.04 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-5), 2.02 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-10), 1.56–1.42 (m, 8H, H-2, H-4, H-9, H-14), 1.38–1.32 (m, 4H, H-7, H-12), 1.28–1.15 (m, 6H, H-3, H-8, H-13).



¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 174.4 (C_q, C-18), 171.8, 171.7 (2 x C_q, C-6, C-12), 38.6 (CH₂, C-1), 38.3, 38.2 (2 x CH₂, C-7, C-13), 35.4 (CH₂, C-11), 35.1 (CH₂, C-5), 33.6 (CH₂, C-17), 2 x 28.9 (2 x CH₂, C-8, C-14), 26.7 (CH₂, C-2), 26.1, 26.0, 25.5, 25.1 (4 x CH₂, C-3, C-9, C-10, C-15), 24.8 (CH₂, C-4), 24.2 (CH₂, C-16).

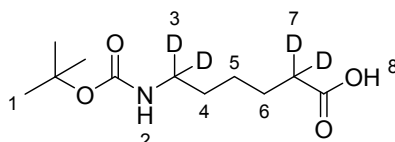
ESI-MS positiv-Modus: *m/z* 358.3 [M+H]⁺, MS/MS (47 V): *m/z* (%): 358.2 (100), 114.6 (72), 79.8 (22), 70.0 (21), 42.2 (20), 228.2 (19), 96.8 (16), 77.8 (15), 245.2 (12), 56.0 (10), 227.2 (8).

2,2,6,6-Tetradeuterio-6-(((2-methyl-2-propanyl)oxy)carbonyl]amino]hexansäure (35):

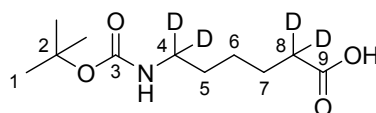
In einem 5 ml Rundkolben wurden 103.4 mg **27** (0.882 mmol, 1.0 Äquiv.) mit 0.066 ml einer Lösung von Natriumdeuteriooxid in Deuteriumoxid (40 Gew.-%, 99.5 atom % D, 0.975 mmol, 1.1 Äquiv.) versetzt und mit 0.177 ml Deuteriumoxid (99.96 atom % D) auf eine 4 M Lösung des Natriumdeuteriooxids eingestellt. Die Lösung wurde für 30 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Rückstand mit 1.7 ml Deuteriumoxid (99.96 atom % D) in einen 2-Halskolben überführt. Zu der 0 °C kalten Lösung des Natriumsalzes der 6-Aminohexansäure-d₄ in 0.5 M Natriumdeuteriooxid wurde im N₂-Gegenstrom aus einem Tropftrichter eine Lösung von 0.212 g Di-*tert*-Butyloxycarbonat (0.971 mmol, 1.1 Äquiv.) in 1.8 ml abs. THF innerhalb von 5 min zugetropft. Nachdem Rühren bei

Raumtemperatur für 18.5 h wurde die Reaktionsmischung mit 1 ml Wasser gequench, mit Et₂O (3 x 5 ml) extrahiert und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wurde auf 0 °C abgekühlt, mit Natriumcitrat-Puffer auf pH 5 angesäuert und anschließend mit Et₂O (4 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das dickflüssige farblose Öl wurde mit -20 °C kaltem Petroleumbenzin versetzt und im Tiefkühler zum Auskristallisieren stehengelassen. Nachdem Abdekantieren des Petroleumbenzins, Entfernen der Lösungsmittelreste unter vermindertem Druck und Trocknen im Feinvakuum wurden 143.2 mg (0.609 mmol, 69 %) eines weißen, kristallinen Feststoffs erhalten.

R_f = 0.24 (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 11.31 (br s, 1H, H-8), 6.04 (br s, Verunreinigung), 4.64 (br s, 1H, H-2), 3.07–3.07 (m, 0.013H, H-3), 2.29 (t, 0.095H, J = 7.3 Hz, H-7), 1.63–1.55 (m, 2H, H-6), 1.46–1.36 (m, 11H, H-4, H-1), 1.35–1.21 (m, 2H, H-5).



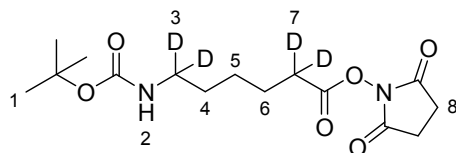
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 179.0 (C_q, C-9), 158.0 (Verunreinigung), 156.2 (C_q, C-3), 80.5 (Verunreinigung), 79.3 (C_q, C-2), 39.8 (m, CHD und CD₂, C-4), 33.8 (1:1:1-t, CHD, J_{C-D} = 19.2 Hz, C-8), 33.5 (1:3:4:3:1-quin, CD₂, J_{C-D} = 19.4 Hz, C-8), 29.6 (CH₂, C-5*) 29.5 (CH₂, C-5), 28.5 (CH₃, C-1), 26.2 (CH₂, C-6), 24.4 (CH₂, C-7*), 24.3 (CH₂, C-7).

*Bei den Signalen bei 29.6, 24.4 ppm handelt es sich um die C-5 und C-7-Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindungen stammen.

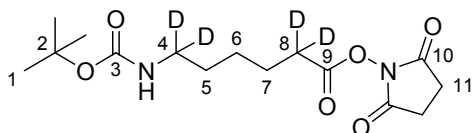
2,2,6,6-Tetradeuterio-1-(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)-6-(((2-methyl-2-propoxy)oxy)carbamoyl)amino)hexanoat (36):

In einem 50 ml 2-Halskolben wurden 0.929 g von **35** (3.95 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.455 g *N*-Hydroxysuccinimid (3.95 mmol, 1.0 Äquiv.) eingewogen, die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt und die Feststoffe in 35 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. Im N₂-Gegenstrom wurden 1.137 g *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (5.93 mmol, 1.5 Äquiv) zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur für 18 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 10 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das leicht gelbe Öl kristallisierte langsam durch. Das Rohprodukt wurde zweimal aus PB/EtOAc (2:1) umkristallisiert. Es wurden 1.071 g (3.22 mmol, 82 %) eines weißen, kristallinen Feststoffs erhalten.

R_f = 0.37 (SiO₂, PB/EtOAc = 1:1);



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 4.67 (br s, 1H, H-2), 4.52 (br s, Verunreinigung), 3.06–3.01 (m, 0.041H, H-3), 2.77 (s, 4H, H-8), 2.75, 2.72 (2 x s, Verunreinigung) 2.53 (t, 0.033H, J = 6.8 Hz, H-7), 1.70–1.67 (m, 2H, H-6), 1.46–1.33 (m, 4H, H-4, H-5), 1.37 (s, 9H, H-1).



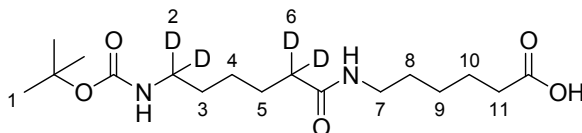
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 169.3 (C_q , C-10), 168.5 (C_q , C-9), 156.0 (C_q , C-3), 78.9 (C_q , C-2), 39.7 (m, CHD und CD_2 , C-4), 30.5 (1:1:1-t, CHD, $J_{\text{C-D}}$ = 19.7 Hz, C-8), 30.3 (1:3:4:3:1-quin, CD_2 , $J_{\text{C-D}}$ = 20.6 Hz, C-8), 29.4 (CH_2 , C-5*), 29.3 (CH_2 , C-5), 28.4 (CH_3 , C-1), 25.7 (CH_2 , C-6), 25.6 (CH_2 , C-11), 24.2 (CH_2 , C-7*), 24.1 (CH_2 , C-7).

*Bei den Signalen bei 29.4, 24.2 ppm handelt es sich um die C-5 und C-7-Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindungen stammen.

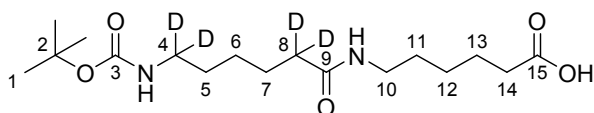
6-[[2,2,6,6-Tetradeuterio-6-[[[(2-methyl-2-propanyl)oxy]carbonyl]amino]hexanoyl]amino]hexansäure (37):

In einem 100 ml 3-Halskolben wurden 1.045 g von **36** (3.14 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.412 g 6-Aminohexansäure (3.14 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N_2 -Gegenstrom wurden 31 ml abs. DMF und 1.31 ml abs. NEt_3 (9.43 mmol, 3.0 Äquiv.) zugegeben und die farblose Suspension für 19 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde größtenteils unter vermindertem Druck entfernt (30–50 mbar, 80 °C). Der Rückstand wurde in 100 ml EtOAc aufgenommen, mit 1N HCl (2 x 20 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde aus PB/EtOAc (1:1) umkristallisiert. Es wurden 0.839 g (2.41 mmol, 77 %) eines feinen, weißen Feststoffs erhalten.

R_f = 0.22 (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 15:1);



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD , 25 °C): δ (ppm) = 3.16 (t, 2H, J = 7.0 Hz, H-7), 3.00 (t, 0.149H, J = 6.8 Hz, H-2), 2.30 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H-11), 2.16 (t, 0.123H, J = 7.6 Hz, H-6), 1.66–1.58 (m, 4H, H-10, H-5), 1.55–1.27 (m, 8H, H-8, H-3, H-9, H-4), 1.43 (s, 9H, H-1).



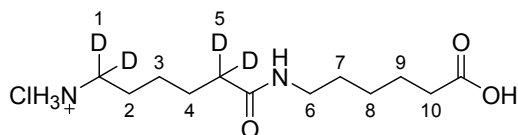
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , 25 °C): δ (ppm) = 177.3 (C_q , C-15), 176.0 (C_q , C-9), 158.5 (C_q , C-3), 79.7 (C_q , C-2), 40.8 (1:1:1-t, CHD, $J_{\text{C-D}}$ = 20.5 Hz, C-4), 40.5 (1:3:4:3:1-quin, CD_2 , $J_{\text{C-D}}$ = 18.6 Hz, C-4), 40.2 (CH_2 ,

C-10*), 40.1 (CH₂, C-10), 36.7 (1:1:1-t, CHD, J_{C-D} = 21.2 Hz, C-8), 36.3 (1:3:4:3:1-quin, CD₂, J_{C-D} = 17.9 Hz, C-8), 34.8 (CH₂, C-14), 30.5 (CH₂, C-5*), 30.4 (CH₂, C-5), 30.1 (CH₂, C-11), 28.8 (CH₃, C-1), 27.5, 27.3 (CH₂, C-6, C-12), 26.7 (CH₂, C-7*), 26.6 (CH₂, C-7), 25.7 (CH₂, C-13).

*Bei den Signalen bei 40.2, 30.5, 26.7 ppm handelt es sich um die C-10, C-5 und C-7-Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindungen stammen.

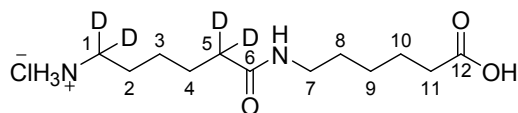
6-[[[6-Amino-2,2,6,6-tetradeterio]hexanoyl]amino]hexansäurehydrochlorid (1:1) (Di-Ahx-HCl-d₄) (**38**):

In einem 25 ml 2-Halskolben wurden 161.0 mg von **37** (0.462 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 10 ml HCl_(g) in abs. EtOAc zugegeben, die weiße Suspension wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit 10 ml Et₂O (vorgetrocknet über KOH) in ein Zentrifugenglas überführt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Der Rückstand wurde noch zweimal mit 5 ml Et₂O versetzt, im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Um das Edukt zu entfernen wurde der Feststoff dreimal mit 10 ml EtOAc versetzt, beim ersten und zweiten Mal im Ultraschallbad behandelt, beim dritten Mal auf 50 °C erhitzt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Nach dem Trocknen im Exsikkator über Blaugel für 24 h und im Ofen für 8 h bei 80 °C wurden 122.7 mg (0.431 mmol, 93 %) eines weißen Feststoffs erhalten.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆/D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 2.99 (t, 2H, J = 7.0 Hz, H-6), 2.73 (t, 0.157H, J = 7.6 Hz, H-1), 2.18 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H-10), 2.02 (t, 0.127H, J = 7.4 Hz, H-5), 1.54–1.42 (m, 6H, H-2, H-4, H-9), 1.39–1.33 (m, 2H, H-7), 1.27–1.19 (m, 4H, H-3, H-8).

²H-NMR (77 MHz, H₂O/D₂O = 9/1, 25 °C): δ (ppm) = 7.95 (br s, 0.07D, Cf D₃N⁺CD₂-), 7.36 (br s, 0.37D, –COND-), 2.96 (br s, 2D, D-1), 2.21 (br s, 2D, D-5).



¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 174.4 (C_q, C-12), 171.8 (C_q, C-6), 38.2 (CH₂, C-7), 37.9 (m, CHD und CD₂, C-1), 34.5 (m, CHD und CD₂, C-5), 33.6 (CH₂, C-11), 28.9 (CH₂, C-8), 26.6 (CH₂, C-2*), 26.5 (CH₂, C-2), 26.0 (CH₂, C-9), 25.4 (CH₂, C-3), 24.7 (CH₂, C-4*), 24.7 (CH₂, C-4), 24.2 (CH₂, C-10).

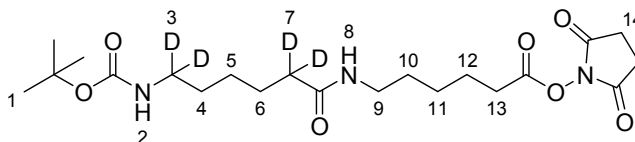
*Bei den Signalen bei 26.6, 24.7 ppm handelt es sich um die C-2 und C-4- Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindungen stammen.

ESI-MS positiv-Modus: m/z 249.2 [M+H]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 249.2 (100), 115.6 (43), 114.6 (22), 42.2 (20), 232.2 (16), 231.2 (14), 70.0 (14), 79.8 (13), 44.2 (11), 40.2 (9), 43.2 (9).

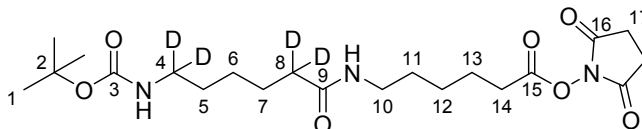
*1-(2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl)-{6-[2,2,6,6-tetradeuterio-6-{{(2-Methyl-2-propanyl)oxy}carbonyl}amino)]hexanoyl}amino}hexanoat (**39**):*

In einem 50 ml 2-Halskolben wurden 0.509 g von **37** (1.46 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.168 g *N*-Hydroxysuccinimid (1.46 mmol, 1.0 Äquiv.) eingewogen, die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt und die Feststoffe in 25 ml abs. CH₂Cl₂ suspendiert. Im N₂-Gegenstrom wurden 0.420 g *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (2.19 mmol, 1.5 Äquiv) zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur für 17.5 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 10 ml Wasser in einen Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 10 ml) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde aus PB/EtOAc (1:1) umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.495 g (1.11 mmol, 76 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.28$ (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 30:1); $R_f = 0.40$ (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 15:1);



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 6.06 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, H-8), 4.69 (br s, 1H, H-2), 3.19–3.15 (m, 2H, H-9), 3.11–3.06 (m, 0.250H, H-3), 2.78 (br s, 4H, H-14), 2.54 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-13), 2.07 (t, 0.125H, $J = 7.3$ Hz, H-7), 1.73–1.66 (m, 2H, H-12), 1.61–1.51 (m, 2H, H-6), 1.49–1.23 (m, 8H, H-10, H-4, H-11, H-5), 1.36 (s, 9H, H-1).



¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 173.1 (C_q, C-9), 169.4 (C_q, C-16), 168.5 (C_q, C-15), 156.1 (C_q, C-3), 78.9 (C_q, C-2), 39.8 (m, CHD und CD₂, C-4), 38.9 (CH₂, C-10), 35.8 (m, CHD und CD₂, C-8), 30.8 (CH₂, C-14), 29.6 (CH₂, C-5*), 29.6 (CH₂, C-5), 28.8 (CH₂, C-11), 28.4 (CH₃, C-1), 26.3 (CH₂, C-6), 25.7 (CH₂, C-12), 25.6 (CH₂, C-17), 25.3 (CH₂, C-7*), 25.2 (CH₂, C-7), 24.2 (CH₂, C-13).

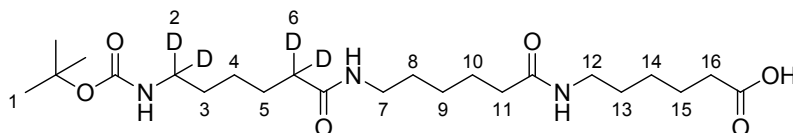
*Bei den Signalen bei 29.6, 25.3 ppm handelt es sich um die C-5 und C-7-Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindungen stammen.

*6-{{6-{{(2,2,6,6-Tetradeuterio-6-{{(2-Methyl-2-propanyl)oxy}carbonyl}amino)}}hexanoyl}amino}hexansäure (**40**):*

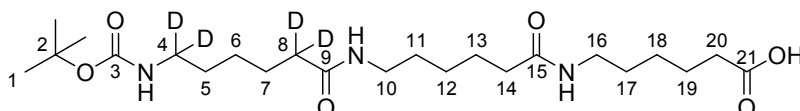
In einem 100 ml 3-Halskolben wurden 0.442 g von **39** (0.99 mmol, 1.0 Äquiv.) und 0.130 g 6-Aminohexansäure (0.99 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 15 ml abs. DMF und 0.41 ml abs. NEt₃ (2.97 mmol, 3.0 Äquiv.) zugegeben und die farblose Suspension für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde größtenteils unter vermindertem Druck entfernt (30–100 mbar, 80 °C). Der Rückstand wurde in 150 ml EtOAc aufgenommen, mit 1N HCl (2 x 20 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x 20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde aus PB/EtOAc

(1:5) umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Feinvakuum wurden 0.361 g (0.78 mmol, 79 %) eines feinen, weißen Feststoffs erhalten.

$R_f = 0.17$ (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 15:1);



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 3.16, 3.16 (2 x t, 4H, $J = 6.9, 6.9$ Hz, H-7, H-12), 3.00 (t, 0.185H, $J = 7.0$ Hz, H-2), 2.30 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-16), 2.18 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H-11, H-6), 1.66–1.58 (m, 6H, H-5, H-10, H-15), 1.55–1.40 (m, 6H, H-3, H-8, H-13), 1.43 (s, 9H, H-1), 1.38–1.28 (m, 6H, H-4, H-9, H-14).

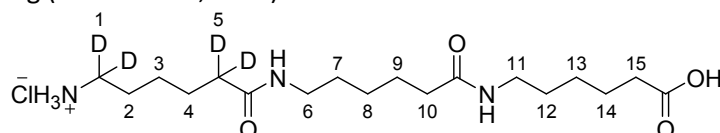


¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ (ppm) = 177.3 (C_q, C-21), 176.0, 175.9 (2 x C_q, C-9, C-15), 158.5 (C_q, C-3), 79.7 (C_q, C-2), 40.7 (m, CHD und CD₂, C-4), 40.1 (2 x CH₂, C-10, C-16), 36.9 (CH₂, C-14), 36.4 (m, CHD und CD₂, C-8), 34.8 (CH₂, C-20), 30.5 (CH₂, C-5*), 30.4 (CH₂, C-5), 28.8 (CH₃, C-1), 2 x 27.5, 27.3 (2 x CH₂, C-6, C-12, C-18), 26.7, 26.6 (2 x CH₂, C-7, C-13), 25.7 (CH₂, C-19).

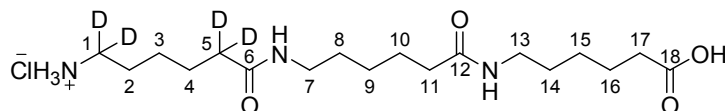
*Bei den Signalen bei 30.5 ppm handelt es sich um die C-5-Restkohlenstoffsignal, das aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindung stammt.

6-[[6-[[[6-Amino-2,2,6,6-tetradeuterio]hexanoyl]amino]hexanoyl]amino]hexansäurehydrochlorid (1:1) (Tri-Ahx·HCl-d₄) (**41**):

In einem 50 ml 2-Halskolben wurden 201.0 mg von **40** (0.435 mmol, 1.0 Äquiv.) gegeben und die Apparatur dreimal evakuiert und bestickt. Im N₂-Gegenstrom wurden 10 ml HCl_(g) in abs. EtOAc zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde mit 5 ml Et₂O (vorgetrocknet über Na₂SO₄) in ein Zentrifugenglas überführt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Der Rückstand wurde noch dreimal mit 10 ml Et₂O versetzt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Um das Edukt zu entfernen wurde der Feststoff sechsmal mit 10 ml EtOAc versetzt, beim ersten und zweiten Mal im Ultraschallbad behandelt, beim dritten bis sechsten Mal auf 50 °C erhitzt und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Nach dem Trocknen im Exsikkator über Blaugel für 72 h und im Ofen für 8 h bei 80 °C wurden 160.5 mg (0.403 mmol, 93 %) eines weißen Feststoffs erhalten.



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆/D₂O, 25 °C): δ (ppm) = 2.98 (t, 4H, $J = 7.1$ Hz, H-6, H-11), 2.71 (t, 0.085H, $J = 7.6$ Hz, H-1), 2.17 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-15), 2.02 (t, 4H, $J = 7.5$ Hz, H-10, H-5), 1.54–1.42 (m, 8H, H-2, H-4, H-9, H-14), 1.38–1.32 (m, 4H, H-7, H-12), 1.27–1.15 (m, 6H, H-3, H-8, H-13).



²H-NMR (77 MHz, H₂O/D₂O = 9:1 (v/v), 25 °C): δ (ppm) = 7.95 (br s, 0.19D, Cl $D_3N^+CD_2^-$), 7.37 (br s, 0.34D, $-COND-$), 2.96 (br s, 2D, D-1), 2.20 (br s, 2D, D-5).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 174.4 (C_q, C-18), 171.9, 171.8 (2 x C_q, C-6, C-12), 38.3, 38.2 (2 x CH₂, C-7, C-13), 38.0 (m, CD₂, C-1), 35.4 (CH₂, C-11), 34.5 (m, CD₂, C-5), 33.7 (CH₂, C-17), 2 x 28.9 (2 x CH₂, C-8, C-14), 26.6 (CH₂, C-2*), 26.5 (CH₂, C-2), 26.1, 26.0, 25.4, 25.1 (4 x CH₂, C-3, C-9, C-10, C-15), 24.7 (CH₂, C-4*), 24.7 (CH₂, C-4), 24.2 (CH₂, C-16).

*Bei den Signalen bei 26.6, 24.7 ppm handelt es sich um die C-2 und C-4-Restkohlenstoffsignale, die aus der nicht oder zum Teil markierten Verbindung stammen.

Vergleicht man das Kohlenstoffspektrum der markierten und der unmarkierten Verbindung, so fällt auf, dass die Signale C-1 und C-5 von den CD₂-Gruppen leicht gegen die Signale der unmarkierten Verbindung verschoben sind. Die ¹³C-Atome, die direkt in Nachbarschaft der CD₂-Gruppen liegen, also C-2 und C-4 sind aufgrund der Nähe zum Deuterium ebenfalls von der Verschiebung betroffen, wohingegen die restlichen ¹³C-Signale nicht von einer Verschiebung betroffen sind.

ESI-MS positiv-Modus: m/z 362.3 [M+H]⁺, MS/MS (47 V): m/z (%): 362.4 (100), 114.6 (57), 115.6 (23), 79.8 (18), 70.0 (16), 228.2 (16), 42.2 (13), 96.8 (10), 77.8 (8), 44.2 (7), 229.2 (7).

III. Anhang

III.1 Literaturverzeichnis

- [1] Amt für Veröffentlichungen, *Verordnung (EU) Nr. 10/2011 der Kommission vom 14. Januar 2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. VO (EU) Nr. 10/2011* **2011**.
- [2] H. Domininghaus, *Kunststoffe. Eigenschaften und Anwendungen.*, 7th ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, NY **2008**.
- [3] M. Biedermann, K. Grob, M. Bronz, R. Curcio, M. Huber und F. Lopez-Fabal, *Mitt. Lebensm. Hyg.* **1996**, *87*, 547–558.
- [4] H. Gallart-Ayala, E. Moyano und M. T. Galceran, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1603–1610.
- [5] D. Braun und D. W. Lee, *Angew. Makromol. Chem.* **1976**, *51*, 11–24.
- [6] C. Nerin, P. Alfaro, M. Aznar und C. Domeño, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *775*, 14–24.
- [7] J. Zech, A. Manowski, S. Malchow, N. Rettberg und L.-A. Garbe, *BrewingScience* **2015**, 102–109.
- [8] J. Zech, *Dissertation*, Technische Universität Berlin, Berlin **2016**.
- [9] N. C. Maragou, E. N. Lampi, N. S. Thomaidis und M. A. Koupparis, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1129*, 165–173.
- [10] Y. Deceuninck, E. Bichon, S. Durand, N. Bemrah, Z. Zendong, M.L. Morvan, P. Marchand, G. Dervilly-Pinela, J.P. Antignac, J.C. Leblanc und B. Le Bizec, *J. Chromatogr. A* **2014**, *1362*, 241–249.
- [11] L. Wang, J. Xue und K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 3150–3157.
- [12] A. Schaefer und T. J. Simat, *Food Addit. and Contam.* **2004**, *21*, 390–405.
- [13] J. Nentwig, *Kunststoff-Folien. Herstellung, Eigenschaften, Anwendung.*, 3rd ed., Hanser, München [u.a.] **2006**.
- [14] M. Heimrich, H. Nickl, M. Bönsch und T. J. Simat, *Packag. Technol. Sci.* **2015**, *28*, 123–139.

- [15] H. Domininghaus, *Kunststoffe. Eigenschaften und Anwendungen.*, 7th ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, NY **2008**.
- [16] Z. Pogorzelska, Z. Mielniczuk, *Packag. Technol. Sci.* **2001**, *14*, 31–35.
- [17] D. Jenke, M. Poss, S. Saidan, J. Story, W. Smith und D. Reiber, *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *95*, 1262–1274.
- [18] P. Krumbiegel, M. Scholz, H. Hübner und A. Schmidt, *Talanta* **1966**, *13*, 1329–1334.
- [19] Q. Chen, M. Shen, Y. Tang und C. Li, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1625–1627.
- [20] Z. Zhang, J. Xing, J. Li und X. Yang, *J. Mol. Catal. A: Chemical* **2007**, *275*, 36–46.
- [21] J. H. Glans und G. R. Hatfield, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1989**, *27*, 1341–1343.
- [22] M. Biedermann, K. Grob, M. Bronz, R. Curcio, M. Huber und F. Lopez-Fabal, *Mitt. Lebensm. Hyg.* **1996**, *87*, 547–558.
- [23] Scientific Committee on Food, *Guidelines of the Scientific Committee on Food for the presentation of an application for safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorisation* **2001**.
- [24] M. Rychlik und S. Asam, *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* **2009**, *21*, 470–482.
- [25] K. Inoue, S. Yoshida, S. Nakayama, R. Ito, N. Okanouchi und H. Nakazawa, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2006**, *51*, 503–508.
- [26] S. Asam, K. Konitzer, P. Schieberle und M. Rychlik, *J. Agr. Food Chem.* **2009**, *57*, 5152–5160.
- [27] C. Cervino, S. Asam, D. Knopp, M. Rychlik und R. Niessner, *J. Agr. Food Chem.* **2008**, *56*, 1873–1879.
- [28] N. Mittag, *Dissertation*, Technische Universität Dresden **2009**.
- [29] S. Tanaka, K. Yokoyama und M. Takashima, *J. Polym. Sci. B Polym. Lett.* **1968**, *6*, 385–388.
- [30] Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd. (S. Tanaka, K. Yokoyama, M. Takashima und M. Miura) (05.09 1970) [**05.09 1970**, JP 45027104].
- [31] B. de Meulenaer, K. Baert, H. Lanckriet, V. van Hoed und A. Huyghebaert, *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*, 5273–5282.
- [32] A. R. MacKenzie, C. J. Moody und C. M. Rees, *Tetrahedron* **1986**, 3259–3268.
- [33] D. Parker und M. Rosser, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 85–89.
- [34] P. Pfeifer und K. Bauer, *Chem. Ber.* **1947**, *80*, 7–19.
- [35] K. J. Davis, U. T. Bhalerao und B. V. Rao, *Ind. J. Chem.* **2000**, *39B*, 860–862.
- [36] T. Taniguchi, K. Kadota, A. S. ElAzab und K. Ogasawara, *Synlett* **1999**, 1247–1248.
- [37] B. A. Laurent und S. M. Grayson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2202–2213.
- [38] J. D. More und N. S. Finney, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3001–3003.
- [39] R. Brückner, S. Braukmüller, H.-D. Beckhaus, J. Dirksen und D. Goepfel (Ed.) *Praktikum Präparative Organische Chemie. Fortgeschrittene Experimentiertechniken: Empfindliche Reagenzien und kleiner Maßstab*, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg **2009**.
- [40] K. Omura, A. K. Sharma und D. Swern, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 957–962.
- [41] E. J. Corey und J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2647–2650.
- [42] E. J. Corey und G. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 399–402.
- [43] S. Czernecki, C. Georgoulis, C. L. Stevens und K. Vijayakumaran, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1699–1702.
- [44] A. Siwicka, D. Cuperly, L. Tedeschi, R. Le Vézouët, A. J. P. White und A. G. M. Barrett, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5903–5917.
- [45] H. Petersen, *Dissertation*, Universität Hamburg, Hamburg **2003**.

- [46] British Columbia Cancer Agency Branch, The University of British Columbia und E. A. Harwood (R. J. Andersen, J. G. Fernandez, M. D. Sadar, N. Mawji und C. A. Banuelos), WO2012139039 A2 (April 06, 2012) [2012, PCT/US2012/032584].
- [47] S. Knapp und A. T. Levorse, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4006–4014.
- [48] S. Fu, H. Yang, G. Li, Y. Deng, H. Jiang und W. Zeng, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1018–1021.
- [49] S. A. Brunton und K. Jones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 763–768.
- [50] J. H. Glans und G. R. Hatfield, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1989**, *27*, 1341–1342.
- [51] R. Pellicciari, B. Natalini, B. M. Sadeghpour, M. Marinozzi, J. P. Snyder, B. L. Williamson, J. T. Kuethe und A. Padwa, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1–12.
- [52] A. S. Kleinke und T. F. Jamison, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 710–713.
- [53] M. Rothe und F.-W. Kunitz, *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1957**, *609*, 88–102.
- [54] M. Donati, C. Morelli, A. Porcheddu und M. Taddei, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9316–9318.
- [55] B. Srinivasan und X. Huang, *Chirality* **2008**, *20*, 265–277.
- [56] C. Y. S. Chen und C. A. Svenson, *J. Phys. Chem.* **1969**, *73*, 1642–1647.
- [57] E. D. Bush und W. F. Trager, *Biol. Mass Spectrom* **1981**, *8*, 211–218.
- [58] L. B. Fay, S. Métairon und M. Baumgartner, *Flavour Fragr. J.* **2001**, *16*, 164–168.
- [59] W. Kunze, *Technologie Brauer und Mälzer*, 9th ed., VLB Berlin **2007**.
- [60] Bundesinstitut für Risikobewertung, *Epoxidharz-Beschichtungen von Konservendosen: Stoffübergänge in ölhaltige Lebensmittel sind möglich. Stellungnahme 022/2016 des BfR vom 15. April 2016* **2016**.
- [61] *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs*, Vols. 13 **2015**.
- [62] Die Europäische Kommission, *VERORDNUNG (EU) 2018/ 213 der Kommission - vom 12. Februar 2018 - über die Verwendung von Bisphenol A in Lacken und Beschichtungen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, und zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 10/ 2011 hinsichtlich der Verwendung dieses Stoffes in Lebensmittelkontaktmaterialien aus Kunststoff* **2018**.
- [63] *Verordnung (EG) Nr. 1895/2005 der Kommission vom 18. November 2005 über die Beschränkung der Verwendung bestimmter Epoxyderivate in Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen* **2005**.
- [64] D. Dohmberg und G. Köhler, *Development and validation of a screening method for bisphenols and related reaction products in canned food*, Prague, Czech Republic **2017**.
- [65] G. A. Russell und A. Macor, *JACS* **1974**, *96*, 145–148.

III.2 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut(es)
Ahx	Aminohexansäure
Äquiv.	Moläquivalente
BADGE	Bisphenol A-diglycidylether
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonylgruppe
BPA	Bisphenol A
br	breit (NMR)
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonylgruppe
CE	Kollisionsenergie
CEP	Zelleintrittspotential

COSY	correlated spectroscopy
cps	counts per second
CXP	Zellaustrittspotential
d	Dublett (NMR)
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert(es)
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Declustering-Potential
E	Extinktion
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDC-HCl	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid-hydrochlorid
EP	Eintrittspotential
ESI	Elektrospray Ionisation
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
eV	Elektronenvolt (MS)
FuE	Forschungs- und Entwicklungsprojekt
GC	Gaschromatographie
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation
(HP)LC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
J	Kopplungskonstante (NMR)
m	Multipllett (NMR)
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
Me	Methylgruppe
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MRM	multi reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIAS	non-intentionally added substances
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PA	Polyamid
PB	Petroleumbenzin
PE	Polyethylen
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PDC	Pyridiniumdichromat
ppm	parts per million (NMR)
q	Quartett
quin	Quintett (NMR)
R _f	Retentionsfaktor (DC)
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RSD	relative Standardabweichung
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
s	Singulett (NMR)
t	Triplett (NMR)
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylgruppe
TDI	Tolerable Daily Intake (tolerierbare tägliche Aufnahmemenge)

THF	Tetrahydrofuran
THP	2-Tetrahydropyranylgruppe
TIC	total ion current (Totaler Ionenstrom)
t-TDI	Temporary Tolerable Daily Intake (temporäre tolerierbare tägliche Aufnahmemenge)
UV	Ultravioletter Wellenlängenbereich (Absorptionsspektroskopie)
WFR	Wiederfindungsrate
δ	Chemische Verschiebung (NMR)
λ	Wellenlänge