

Gedruckt auf säurefreiem Papier (DIN-ISO 9706)

Die Wissenschaft hilft uns vor allem, daß sie das Staunen, wozu wir von Natur berufen sind, einigermaßen erleichtere, sodann aber, daß sie dem immer gesteigerten Leben neue Fertigkeiten erwecke, zu Abwendung des Schädlichen und Einleitung des Nutzbaren.

J. W. v. Goethe

Spektralaufgelöste Laserinduzierte
Fluoreszenz-Detektion
mit abstimmbarer UV-Strahlung
in der Kapillarzonenelektrophorese

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Physik
der Universität Bielefeld

Jens Höbel
aus Berlin

Dezember 1998

Kurzzusammenfassung

Die Kapillarelektrophorese ist neben der bereits etablierten Gas-Chromatographie und der High Pressure Liquid Chromatographie ein Analyseverfahren, das gerade in pharmazeutischen Untersuchungen und im Rahmen des Drug-Monitoring immer mehr an Bedeutung gewinnt. Die Kapillarelektrophorese besticht dabei durch ein hohes Trennvermögen in Verbindung mit kurzen Analysezeiten und der Möglichkeit einer weitgehenden Automatisierung, wie sie z. B. im Bereich der DNA-Analyse benötigt wird.

Dennoch wird das Potential der Kapillarelektrophorese als Nachweissystem nur unzureichend genutzt. Die Verwendung von UV-Absorptions-Detektoren ist weit verbreitet und hat den Nachteil von kurzen Absorptionswegen, die durch die Durchmesser der verwendeten Kapillaren im Bereich zwischen $20\mu\text{m}$ und $100\mu\text{m}$ bestimmt werden. Damit sind die Nachweisgrenzen gegenüber den Absorptionswegen im cm-Bereich bei der High Pressure Liquid Chromatographie um mehrere Größenordnungen herabgesetzt.

Die Verwendung von Fluoreszenzdetektoren mit sichtbarer Strahlung kann diese Nachweisgrenzen durch hohe Laserleistungen bei der Anregung senken, hat aber den Nachteil einer weitgehenden Selektivität. Damit bleibt der Nachweis einer großen Klasse von kleinen Molekülen verborgen, die nur Absorptionsbanden im UV-Bereich aufweisen.

Die vorliegende Arbeit hat sich diesem Problem der Selektivität und der hohen Nachweisgrenzen gewidmet. Die Verwendung von abstimmbarer Laserstrahlung im UV-Bereich ermöglicht die Fluoreszenzanregung auch von kleinen Molekülen, die hier in Form von willkürlich ausgewählten Arzneistoffen zur Verfügung standen. Mit Hilfe eines Spektrometers wurde die Fluoreszenz spektral aufgelöst und von einer CCD-Kamera flächig detektiert. Damit kann nicht nur das Fluoreszenzsignal nachgewiesen, sondern zugleich eine Identifizierung der Substanzen anhand des Fluoreszenzspektrums vorgenommen werden.

Die Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens wird an mehreren Testmessungen demonstriert, bei denen die Nachweisgrenzen von Arzneistoffen gegenüber einer vergleichbaren Detektion mit UV-Absorption um teilweise mehr als zwei Größenordnungen herabgesetzt werden konnte. Desweiteren konnten unaufbereitete Urinproben mit dem Verfahren der UV-Fluoreszenzdetektion untersucht werden. Dabei konnten erstmalig Metabolite nachgewiesen werden, die einem Nachweis mit einer UV-Absorption aufgrund der geringen Probenmengen verborgen waren.

Somit geben die Ergebnisse dieser Arbeit Grundlagen für eine Weiterentwicklung einer Detektion durch Laserinduzierte Fluoreszenz im UV-Bereich, die in Zukunft auch in kommerziellen Geräten der Kapillarelektrophorese vertreten sein kann und die Anwendungsmöglichkeiten entscheidend erweitert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen der Fluoreszenz	5
2.1	Termschema organischer Moleküle	5
2.2	Relaxationsprozesse	8
2.3	Einfluß des pH-Wertes	12
2.4	Polarisation	14
3	Kapillarzonenelektrophorese	15
3.1	Elektrophorese und EOF	15
4	Apparativer Aufbau	21
4.1	Der CZE-Aufbau	22
4.2	Die Lasersysteme	26
4.2.1	Das Nd:YAG-lasergepumpte Farbstofflasersystem	26
4.2.2	Die OPO-Lasersysteme	28
4.3	Die ICCD-Kamera	33
4.3.1	Das Dunkelbildrauschen	38
4.3.2	Linearität des Detektors	39
4.4	Die Abbildungsoptiken	40
5	Experimentelles	45
5.1	Optische Filter	45
5.2	Das Wasser-Raman-Signal	48
5.3	Die Quarzkapillare	51
5.4	Schwankungen der Laserintensität	53
5.5	Arzneistoffe	56
6	Absorptionsmessungen	57
6.1	Tramadol und seine Metabolite	59
6.2	Ausgewählte Arzneistoffe	61
7	Fluoreszenzmessungen	65
7.1	Anregungs-/Emissionsspektren	65
7.1.1	Tramadol und seine Metabolite	68

7.1.2	Ausgewählte Arzneistoffe	75
7.2	Polarisationsmessungen	86
7.3	Einfluß des pH-Wertes	88
7.4	Ausbleichen	92
8	Kapillaronenelektrophorese	97
8.1	Spektral nicht aufgelöste Messungen	97
8.2	Spektral aufgelöste Messungen	101
8.3	Erstellung eines Elektropherogramms	103
8.4	Einfluß des pH-Wertes auf die Trennung	104
8.5	Konzentrationsabhängigkeit des Signals	107
8.6	Adsorption	109
8.7	Signaluntergrund	112
8.7.1	Puffer	112
8.7.2	Kapillare	116
9	Nachweisgrenzen in der CZE mit UV-LIF	119
9.1	Anregungswellenlänge 212nm	121
9.2	Anregungswellenlänge 270nm	128
9.3	Diskussion der Meßfehler	135
10	Anwendungsbeispiel	139
10.1	Leerrurin	141
10.2	Urinprobe: Sammelintervall 2-4 Stunden	143
10.3	Urinprobe: Sammelintervall 6-8 Stunden	147
10.4	UV-Absorption	151
11	Zusammenfassung und Ausblick	153
A	Molekülstrukturen	157
A.1	Ausgewählte Arzneistoffe	159
B	Molgewichte	161
C	Techniken und Abkürzungen in der CE	163
D	Zeta-Potential	165
E	Filtervergleich bei Daunorubicin	167

Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski-Diagramm	8
2.2	Struktur von Phenol	12
2.3	Geometrie bei Polarisationsmessungen	14
3.1	Zonenbildung in der Kapillarzonenelektrophorese	17
4.1	CZE-Aufbau ohne Spektrometer	22
4.2	Querschnitt des Aufgabeblocks	24
4.3	Nd:YAG-Farbstofflaser-System	26
4.4	Strahlprofil des Farbstofflasers	27
4.5	Spektrale Position der Idler- und Signalwelle	28
4.6	OPO-System mit externer Frequenzverdopplung	29
4.7	OPO-System mit intracavity-Verdopplung	31
4.8	OPO-UV-Leistung bei intracavity-Verdopplung	32
4.9	Effizienz der Bildverstärker-Fotokathode	33
4.10	Linearität des Signals	39
4.11	Abbildungsoptik mit Objektiv ohne Spektrometer	41
4.12	Abbildungsoptik mit Hohlspiegel und Spektrometer	42
4.13	Effizienzkurven der Spektrometergitter	43
4.14	Gesamteffizienz-Kurven	44
5.1	Transmissionskurven optischer Filter	46
5.2	Rayleighsignal bei verschiedenen Polarisationen	47
5.3	Raman-Spektrum von flüssigem Wasser	48
5.4	Ramansignal einer wässrigen Lösung	49
5.5	Bild einer beschädigten Kapillare	52
5.6	Laserintensitätsschwankungen	54
5.7	Normierte Laserintensität	55
6.1	Absorptionsspektren von Tramadol und Metaboliten	57
6.2	Absorptionsspektren von Tramadol und Metaboliten	59
6.3	Absorptionsspektren von Astemizol, Salbutamol und Verapamil	61
6.4	Absorptionsspektren von Propranolol, Fenoterol, Dimetinden	62
6.5	Absorptionsspektrum von Daunorubicin	63
7.1	Erstellung eines A/E-Spektrums	66

7.2	Konzentrationsnormierte A/E-Spektren: Tramadol und Metabolite	69
7.3	Intensitätsnormierte A/E-Spektren: Tramadol und Metabolite	70
7.4	Fluoreszenzspektren: Tramadol und Metabolite, $\lambda_{ex} = 270nm$	71
7.5	Fluoreszenzspektren: Tramadol und Metabolite, $\lambda_{ex} = 270nm$	71
7.6	Fluoreszenzspektren: Tramadol und Metabolite, $\lambda_{ex} = 212nm$	72
7.7	Fluoreszenzspektren: Tramadol und Metabolite, $\lambda_{ex} = 212nm$	73
7.8	Konzentrationsnormierte A/E-Spektren: ausgewählte Arzneistoffe	76
7.9	Intensitätsnormierte A/E-Spektren: Arzneistoffe	77
7.10	Fluoreszenzspektren: Metoprolol, Norefensin, Fenoterol, $\lambda_{ex} = 212nm$	78
7.11	Fluoreszenzspektren: Propranolol, Synephrin, Salbutamol, Verapamil, $\lambda_{ex} = 212nm$	79
7.12	Fluoreszenzspektren: Fenoterol, Metoprolol, Norefensin $\lambda_{ex} = 212nm$	80
7.13	Fluoreszenzspektren: Propranolol, Salbutamol, Synephrin und Verapamil $\lambda_{ex} = 212nm$	80
7.14	Fluoreszenzspektrum: Daunorubicin	82
7.15	Intensitätsnormiertes Fluoreszenzspektrum: Daunorubicin	82
7.16	A/E-Spektrum: Daunorubicin	83
7.17	A/E-Spektrum: Idarubicin	84
7.18	Polarisationsspektren: Tramadol und Metabolite	86
7.19	Fluoreszenz bei pH=9.6	88
7.20	Fluoreszenz bei pH=10.65	89
7.21	Intensitätsnormierte Fluoreszenzen: Tramadol und Metabolite, pH=9.6	90
7.22	Intensitätsnormierte Fluoreszenzen: Tramadol und Metabolite, pH=10.65	90
7.23	Ausbleichen: Tramadol und seine Metaboliten	93
7.24	Ausbleichen: ausgewählte Arzneistoffe	94
8.1	Längsschnitt durch eine Kapillare	98
8.2	Elektrophorese (nicht spektral aufgelöste LIF-Detektion)	99
8.3	Kamerabildfolge	101
8.4	Erstellung eines Elektropherogramms	103
8.5	pH-Wert und Trennung	105
8.6	Konzentrationsabhängigkeit des Signals	107
8.7	Elektropherogramm zur Demonstration des Untergrundanstieges	109
8.8	Adsorption nach Migration einer Probe	110
8.9	Fluoreszenzen der Puffer bei $\lambda_{ex} = 212nm$	113
8.10	Fluoreszenzen der Puffer bei $\lambda_{ex} = 270nm$	113
8.11	Signaluntergrund von gefiltertem und ungefiltertem Boraxpuffer, $\lambda_{ex} = 270nm$	114

8.12	Eigenleuchten von Quarzkapillaren	116
9.1	Elektropherogramm: Tramadol und Metabolite, $\lambda = 212\text{nm}$. . .	121
9.2	Nachweisgrenzenvergleich: Tramadol und Metabolite	124
9.3	Elektropherogramme für Arzneistoffe, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$	125
9.4	Nachweisgrenzenvergleich: Synephrin, Norefensin	126
9.5	Elektropherogramme: Tramadol und Metabolite, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$.	128
9.6	Nachweisgrenzenvergleich: Tramadol und Metabolite, $\lambda_{ex} =$ 270nm	129
9.7	Elektropherogramme: ausgewählte Arzneistoffe, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$. .	131
9.8	Nachweisgrenzenvergleich: ausgewählte Arzneistoffe, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$	133
10.1	Elektropherogramm: Leer-Urin-Probe	141
10.2	Elektropherogramm Urinprobe 2-4h: UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} =$ 270nm	143
10.3	Elektropherogramm Urinprobe 2-4h: UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} =$ 212nm	144
10.4	Elektropherogramm Urinprobe 2-4h: UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} =$ 270nm	145
10.5	Elektropherogramm Urinprobe 2-4h: UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} =$ 212nm	146
10.6	Elektropherogramm UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$: Urin- probe 6-8h	147
10.7	Elektropherogramm UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$: Urin- probe 6-8h	148
10.8	Elektropherogramm UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$: Urin- probe 6-8h	149
10.9	Elektropherogramm UV-LIF-Detektion, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$: Urin- probe 6-8h	149
10.10	Elektropherogramm: UV-Absorption, $\lambda = 214\text{nm}$: Urinprobe 6-8h	151
A.1	Molekülstrukturen: Tramadol und Metabolite	157
A.2	Molekülstrukturen: ausgewählte Arzneistoffe	159
A.3	Molekülstrukturen: Daunorubicin, Idarubicin, Dimetinden . . .	160
D.1	Zeta-Potential	165
E.1	Interferenzfilter 520nm	168
E.2	Signalvergleich: Interferenzfilter 520nm/ Kantenfilter OG530 . .	169

Tabellenverzeichnis

4.1	Dunkelbildrauschen	38
7.1	Wellenlängen der Fluoreszenzmaxima: ausgewählte Arzneistoffe	81
9.1	Nachweisgrenzen: Tramadol und Metabolite, UV-LIF, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$	122
9.2	Nachweisgrenzen: Tramadol und Metabolite, UV-Absorption, $\lambda = 214\text{nm}$	123
9.3	Nachweisgrenzen: ausgewählte Arzneistoffe, UV-LIF, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$	125
9.4	Nachweisgrenzen: ausgewählte Arzneistoffe, UV-Absorption, $\lambda = 214\text{nm}$	126
9.5	Zahl nachweisbarer Teilchen: UV-LIF, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$	127
9.6	Nachweisgrenzen: Tramadol und Metabolite, UV-LIF, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$	129
9.7	Nachweisgrenzen: ausgewählte Arzneistoffe, UV-LIF, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$	132
9.8	Nachweisgrenzen: ausgewählte Arzneistoffe, UV-Absorption, $\lambda = 214\text{nm}$	133
9.9	Zahl nachweisbarer Teilchen, UV-LIF, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$	134

Kapitel 1

Einleitung

Die vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe, die Laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) als ein Detektionsverfahren in der Kapillarelektrophorese (engl. Capillary Elektrophoresis, CE) weiterzuentwickeln und die Anwendungsmöglichkeiten bei kurzen Wellenlängen aufzuzeigen.

Dazu wurde ein experimenteller Aufbau erstellt, der eine LIF-Detektion mit gepulster Laserstrahlung bei den Wellenlängen 270nm und 212nm im tiefen UV-Bereich ermöglicht und mit Hilfe eines Spektrometers die spektrale Identifizierung der Proben gestattet.

Dabei wurde das Ziel verfolgt, die bestehenden Nachweisgrenzen einer UV-Absorption für eine Auswahl an Arzneistoffen zu senken und damit die Möglichkeiten einer UV-LIF-Detektion für neue Anwendungen aufzuzeigen.

Die Kapillarelektrophorese ist ein relativ junges Verfahren in der Analytik zur Trennung von Substanzgemischen, welches in Ergänzung oder Konkurrenz zu den bisherigen Verfahren der HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) und GC (Gaschromatographie) steht [1, 2].

Die Trennung von Substanzen wird in der CE durch einen Elektrophoreseprozeß in einer Kapillare herbeigeführt, der auf Unterschiede der Migrationszeiten unter dem Einfluß eines äußeren elektrischen Feldes zurückgeht.

Die besonderen Merkmale der CE sind die im Vergleich zu anderen Verfahren kurzen Analysezeiten [3], die im Bereich von drei bis 30 Minuten liegen, und die geringen Probenmengen. Diese ergeben sich aus der Verwendung von Kapillaren mit einem typischen Innendurchmesser von $25\mu\text{m}$ bis maximal $100\mu\text{m}$ und liegen in der Größenordnung von wenigen Nanolitern.

Diese Vorteile sind besonders in klinischen Untersuchungen von Bedeutung, bei denen nur geringe Probenmengen, z.B. in Form von Blutproben, zur Verfügung gestellt werden können und schnell analysiert werden müssen, um z.B. die Verträglichkeit eines Medikamentes zu überprüfen [4]-[8].

Die Verwendung geringer Probenmengen stellt jedoch hohe Anforderungen an die Empfindlichkeit der Detektionseinheit, die leistungsfähig genug sein muß, um diesen kleinen Probenvolumina und dem ständigen Ziel, die Nachweisgrenzen zu senken, gerecht werden zu können [9, 10].

Die gängigen Detektionsverfahren in der CE sind oftmals Weiterentwicklungen bisheriger Techniken, die bei der GC und HPLC eingesetzt werden. Die Anwendung hat sich dabei besonders auf die UV-Absorption mit Wellenlängen $\lambda > 185\text{nm}$ [11, 12] und die LIF-Detektion konzentriert [13]-[16].

Die sich mit der Verwendung von Laserstrahlung bietenden Möglichkeiten zur Detektion werden in vielfältiger Weise genutzt und in zahlreichen Anwendungen realisiert. Eine Übersicht über lasergestützte Detektionsverfahren, die keine Fluoreszenzmessungen vornehmen, findet sich z. B. in [15, 16]. Dazu zählen unter anderem der resonante Energietransfer (RET) [17, 18] und verschiedene Verfahren in der thermo-optischen Absorptionsdetektion [19, 20, 21].

Die Fluoreszenzdetektion ist ein sehr sensitives Verfahren [22, 23, 24] und kann für viele verschiedene Substanzen mit und ohne nativer Fluoreszenz (nach entsprechender Präparation¹ oder dem Detektionsverfahren der indirekten Fluoreszenz [25, 26, 27]) angewendet werden. Die historische Entwicklung der Fluoreszenzdetektion als Nachweisverfahren in der CE ist z. B. in [28] gegeben.

Für eine Fluoreszenzanregung müssen geeignete Lichtquellen zur Verfügung stehen. Die native Fluoreszenz kann bei vielen Substanzen, wie z. B. kleinen Aromaten, nur erzeugt werden, wenn die Anregungswellenlänge im UV-Bereich liegt, da nur in diesem Spektralbereich eine Absorption vorhanden ist [29]. Spezielle Lampen bieten einen großen nutzbaren Wellenlängenbereich mit einem kontinuierlichem oder einem Linienspektrum, sind jedoch ungenügend fokussierbar und weisen geringe spektrale Leistungen auf [22, 30, 31, 32]. Laserdioden hingegen besitzen hohe spektrale Leistungen, emittieren jedoch nicht im UV-Bereich, sondern im VIS- und IR-Bereich. Eine nachfolgende Frequenzverdopplung führt nicht zu Wellenlängen im UV-Bereich [33].

Die Anforderungen einer hohen spektralen Leistung im UV-Bereich und einer geringen Strahldivergenz können von Lasern erfüllt werden [34].

Viele LIF-CE-Kopplungen arbeiten mit einem Ar⁺Laser, dessen Wellenlängen im sichtbaren Bereich nicht (direkt) für eine UV-Anregung genutzt werden können.

Die geringe Menge an geeigneten und kostengünstigen UV-Strahlungsquellen hat dazu geführt, daß im UV-Bereich kaum LIF-CE Kombinationen realisiert worden sind.

¹Bei dieser Derivatisierung werden die zu analysierenden Moleküle mittels verschiedener Verfahren mit Chromophoren versehen [16].

Die Verwendung eines HeCd-Lasers mit der Wellenlänge 325nm führte zu einer entscheidenden Erweiterung der Menge an detektierbaren Teilchen [35], speziell im Bereich pharmazeutischer Untersuchungen [36].

Bei kürzeren Wellenlängen gibt es Anwendungen mit der frequenzverdoppelten, kontinuierlichen Strahlung eines Ar⁺-Lasers bei 275nm [37] und 257nm [38] und der eines Kr⁺-Lasers [39]. Zur Anwendung kam auch die gepulste Strahlung eines KrF-Lasers bei 248nm [40]. Diese Lasersysteme stellen eine Menge an diskreten Wellenlängen zur Verfügung.

Im allgemeinen ist die Fluoreszenz ein Prozeß, dessen Stärke von der Intensität und der Wellenlänge der anregenden Strahlung abhängig ist [41]. Somit können die diskreten Wellenlängen prinzipiell eine UV-Fluoreszenz bei kleinen Aromaten hervorrufen [42]; dabei ist jedoch zu beachten, daß die Wellenlänge des Absorptionsmaximums bei einer Anregung der Moleküle nicht die maximale Fluoreszenz zur Folge haben muß.

Für die Bereitstellung einer individuellen Anregungswellenlänge ist ein (frequenzverdoppeltes) Farbstofflasersystem [43] oder ein OPO-Lasersystem (**O**ptischer **P**arametrischer **O**szillator-Lasersystem) geeignet. Die Unterschiede einer kontinuierlichen und einer gepulsten Fluoreszenzanregung sind in [44, 45] dargestellt.

Bei der Verwendung von Wellenlängen $\lambda < 300\text{nm}$ wird auf die Fluoreszenz der Kapillare und der Optik hingewiesen, die eine UV-LIF-Detektion der zu detektierenden Proben einschränken oder sogar verhindern kann [46].

Neben dem Potential, welches die UV-LIF-Detektion zum Nachweis von Proben und zur Senkung der Nachweisgrenzen bietet, sind die Maßnahmen für die Streulichtunterdrückung zu berücksichtigen, die bei der Bestrahlung der Kapillare mit intensivem Laserlicht notwendig sind. Unabhängig von der verwendeten Laserwellenlänge sind dazu verschiedene Methoden entwickelt worden: Das zur Fluoreszenz anregende Laserlicht und die Fluoreszenz können mit Hilfe von Faseroptiken geführt werden, deren (recht-) winklige Anordnung zu einer Reduktion des Streulichtanteils im Fluoreszenzsignal dienen kann [47].

Ferner werden Mikroskopabbildungen verwendet, die nur die Fluoreszenz aus dem Inneren der Kapillare abbilden [48].

Hohe Anforderungen an die experimentelle Ausstattung fordert eine zeitliche Diskriminierung des Streulichtes, die möglich ist, wenn die Lebensdauer der Fluoreszenz länger als die der anregenden Laserstrahlung ist [49, 50].

Eine Sheath-Flow-Küvette ermöglicht die Detektion der Probe nach dem Austritt aus der Kapillare [51, 52], die zugleich erhöhte Anforderungen an die Durchführung der Elektrophorese stellt².

Ein andere Methode zur Vermeidung von Streulicht besteht darin, das Laserlicht nicht auf die Kapillare abzubilden, sondern in das Ende der Kapillare einzukoppeln [54].

²Es gibt ferner Vorschläge zur Erzeugung von Löchern in der Kapillarwand, die eine Einkopplung des Laserlichtes ohne die Entstehung von Streulicht ermöglichen sollten [53].

Spezielle optische Komponenten, wie z. B. Kantenfilter und dielektrische Spiegel, können anstelle oben genannter Maßnahmen oder in Kombination mit ihnen zur Streulichtunterdrückung eingesetzt werden.

Neben dem Nachweis des Fluoreszenzsignals mit einem Photomultiplier werden auch Dioden-Arrays [55, 56] und CCD-Kameras eingesetzt [57]. Damit kann über die eindimensionale Signalinformation hinaus eine zweidimensionale Abbildung der Kapillare erzeugt werden, mit der die Migration der Substanzen durch die Kapillare verfolgt werden kann [58]. Ein in die Abbildungsoptik integriertes Spektrometer kann neben der räumlichen Information zugleich auch spektrale Information liefern und zu einer Identifikation der nachgewiesenen Substanzen beitragen [59]. Solche Untersuchungen wurden bisher an Urinproben mit Wellenlängen $\lambda > 350\text{nm}$ [60], oder mit UV-Licht an Modellsystemen wie z. B. Fluoreszin oder Sulforhodamin101 [61] durchgeführt.

Für eine Verkürzung der Analysezeiten ist es wünschenswert, auf eine umfangreiche Probenvorbereitung verzichten und die native Fluoreszenz der Substanzen, sofern sie vorhanden ist, nutzen zu können. Gleichzeitig entfällt dabei das Anbringen von Fluoreszenzmarkern [62] mit den dadurch verbundenen Fehlern, Schwierigkeiten und Zeitaufwendungen.

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sind unaufbereitete Urinproben, in denen das Medikament Tramadol und einige seiner Phase-I-Metabolite nachgewiesen werden sollen. Zusätzlich wurden einige willkürlich ausgewählte Arzneistoffe in die Fluoreszenzmessungen und Bestimmungen der Nachweisgrenzen einbezogen, um das Potential der UV-LIF-Detektion zu verdeutlichen. Diese Substanzen sind in der CE noch nicht mit einem UV-LIF-Nachweis detektiert worden.

Die Gliederung dieser Arbeit beginnt mit theoretischen Ausführungen zu der Fluoreszenz und gibt eine Einführung in die Kapillarzonenelektrophorese (engl. Capillary Zone Electrophoresis CZE).

Anschließend werden der apparative Aufbau für die CZE, die verwendeten Lasersysteme (Farbstofflaser, OPO-Lasersysteme) und das Detektionssystem (CCD-Kamera) charakterisiert. Einige vorbereitende Meßergebnisse schließen sich daran an.

Für die Bestimmung geeigneter Anregungswellenlängen der Fluoreszenzmessungen wurden Absorptionmessungen durchgeführt und darauf aufbauend Anregungs-/Emissionsspektren erstellt.

Die Möglichkeiten der spektralaufgelösten und nicht spektralaufgelösten Fluoreszenzdetektion werden anschließend gezeigt und verschiedene Untergrundquellen bei den CZE-Messungen untersucht.

Ermittlungen der Nachweisgrenzen dieser UV-LIF-Detektion an den Arzneistoffen wurden bei den Wellenlängen 212nm und 270nm durchgeführt und die Leistungsfähigkeit im Gegensatz zu der übliche UV-Absorption an einem Anwendungsbeispiel unaufbereiteter Urinproben aufgezeigt.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen der Fluoreszenz

Die Absorption von Licht kann mit Hilfe eines Termschemas beschrieben werden, in dem die beteiligten Energiezustände des Moleküls dargestellt sind. Nach einer erfolgreichen Anregung des Moleküls folgen Relaxationsprozesse, zu denen auch die Fluoreszenz gehört.

In den folgenden Abschnitten werden die Energieniveaus und deren Bezeichnung vorgestellt und die möglichen Relaxationsprozesse bei Aromaten beschrieben.

Anschließend wird der Einfluß des pH-Wertes auf die Fluoreszenz am Beispiel des Phenols aufgezeigt.

2.1 Termschema organischer Moleküle

Grundsätzlich kann jedes Molekül mit Licht in Wechselwirkung treten, wobei die Elektronen und die Atome des Moleküls die Energie der Photonen aufnehmen. Als Voraussetzung dafür muß die vom Photon der Frequenz ν bereitgestellte Energie $E = h\nu$ mit der Energiedifferenz zwischen dem, vom Elektron anfänglich besetzten Energieniveau E_1 , und einem höher liegendem Energieniveau E_2 übereinstimmen: $h\nu = E_2 - E_1$. Weiterhin muß dieser Übergang aufgrund von Auswahlregeln möglich sein. Zur Verdeutlichung der möglichen Energieniveaus für ein Elektron wird ein Termschema verwendet. Im Fall von Molekülen wird das energetisch niedrigste Energieniveau, der Grundzustand, mit S_0 bezeichnet, wobei der Buchstabe S die Abkürzung für Singulett darstellt. Die energiereicheren Niveaus werden fortlaufend numerisch indiziert: S_0, S_1, S_2, \dots

Wenn der resultierende Elektronenspin S wie im Fall eines Singulets nicht zu Null, sondern zu 1 koppelt, liegt ein Triplettzustand vor, der mit dem Buchstaben T abgekürzt wird und entsprechend den Energieniveaus mit fortlaufenden Nummern gekennzeichnet ist: T_0, T_1, T_2, \dots . Ein solches Termschema

ist in Abbildung 2.1, Seite 8 skizziert. Im allgemeinen kann ein Molekül Energie aufnehmen, ohne seine Kernverteilung zu verändern und diese Energie in eine Vibrations- und/oder in eine Rotationsbewegung der Atome um den Massenmittelpunkt umwandeln. Somit gehören zu jedem elektronischen Zustand mehrere Vibrations- und Rotationsenergieniveaus. Die Vibrationsniveaus werden mit zunehmender Energie ebenfalls numerisch fortlaufend gekennzeichnet: v_0, v_1, v_2, \dots und ein elektronischer Zustand wird mit einem zusätzlichen Index versehen, z.B. $S_{i,j}$.

Die Energieabstände der Rotationsniveaus liegen bei Molekülen in Flüssigkeiten und Raumtemperatur im Bereich von $0.01 - 0.001\text{eV}$ [63] und können in diesem Experiment nicht aufgelöst werden. Sie sind deshalb nicht in dem Termschema aufgeführt.

Die Vibrationsniveaus sind mit Energieabständen von typischer Weise $0.01 - 0.1\text{eV}$ [63] voneinander separiert, und die Anregung eines elektronischen Zustandes verlangt bei einfachen und zweifach kondensierten Aromaten ¹Energien von mehreren Elektronenvolt. Bei Anregungen mit diesen Energien absorbieren die Elektronen des π -Elektronensystems, das mit zunehmender Zahl der kondensierten Benzolringe abnehmende Bindungsenergien dieser π -Elektronen aufweist [29].

Eine Abschätzung über die Besetzung von Schwingungszuständen n_1, n_0 im Grundzustand S_0 kann im Gleichgewichtszustand mit Hilfe einer Boltzmannverteilung erfolgen:

$$\frac{n_1}{n_0} = \frac{g_1}{g_0} e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

worin folgende Variablen und Konstanten verwendet werden:

- ΔE : Energiedifferenz [eV] der Schwingungszustände v_1, v_0
- g_0, g_1 : Entartungsfaktoren
- k : Boltzmannkonstante
- T : Temperatur [K]

Für die Werte: $g_0, g_1 = 1$, $\Delta E = 0.1\text{eV}$ und $T = 300\text{K}$ ergibt sich z.B. das Verhältnis:

$$\frac{n_1}{n_0} = 0.01$$

Es kann somit davon ausgegangen werden, daß bei Raumtemperatur im wesentlichen der Grundzustand ($S_{0,0}$) besetzt ist und das Absorptionsspektrum die Vibrationsstruktur der (angeregten) Elektronenzustände widerspiegelt.

¹Kondensierte Aromaten bestehen aus mindestens zwei Benzolringen, die paarweise ein oder zwei gemeinsame Kohlenstoffatome enthalten.

Die bisherigen Ausführungen gelten für isolierte Teilchen. In Flüssigkeiten muß zusätzlich die Wechselwirkung mit der Umgebung berücksichtigt werden. Insbesondere sind Lösungsmittelleffekte zu beobachten, die in der Absorptionsspektroskopie bekannt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Arzneistoffe ausschließlich in wässriger Lösung behandelt. Einflüsse von verschiedenen Lösungsmitteln auf die Meßergebnisse sind nicht zu beachten, so daß auf eine Behandlung dieses Themenkreises in der vorliegenden Arbeit verzichtet werden kann.

In einem Aromaten sind die Elektronen an C-Atomen in einer Wasserstoffbindung lokalisiert oder tragen in Hybridzuständen der Kohlenstoffatome zu dem charakteristischen π -Elektronensystem bei, welches den Benzolring bildet [64]. Verschiedene Bindungstypen besitzen unterschiedliche Bindungsenergien und sind für bestimmte Teilbereiche im Absorptionsspektrum verantwortlich [65]. Die Energiezustände dieses π -Elektronensystems werden durch die Anlagerung weiterer Atom- oder Molekülgruppen an den Benzolring verändert. Das hat eine Änderung des Absorptionsspektrums zur Folge und kann auch Einfluß auf die relativen Anteile der beteiligten Relaxationsprozesse nehmen.

Nach einer Absorption kann das Molekül dissoziieren, so daß es weiteren Absorptionsprozessen in der ursprünglichen Konfiguration nicht mehr zur Verfügung steht [45]. Zusätzlich können andere chemische Reaktionen bei einer Änderung der pK_S -Werte² sowohl des Grund- als auch des angeregten Zustandes stattfinden, die ebenfalls dazuführen können, daß eine Fluoreszenzemission ausbleibt [66].

² $pK_S = -\lg(K_S)$, K_S : Säurekonstante

2.2 Relaxationsprozesse

Als Relaxationsprozesse werden die Vorgänge bezeichnet, die ein Teilchen unter Energieabgabe von einem angeregten Zustand in den Grundzustand überführen.

Diese Rückkehr in den Grundzustand erfolgt im allgemeinen unter Beteiligung mehrerer Prozesse:

- Vibrationsrelaxation
- Interne Konversion
- Fluoreszenz
- Intersystem Crossing und
- Phosphoreszenz

Eine übersichtliche Zusammenfassung dieser Vorgänge kann in einem Jablonski-Diagramm erfolgen, wie es in Abbildung 2.1 dargestellt ist.

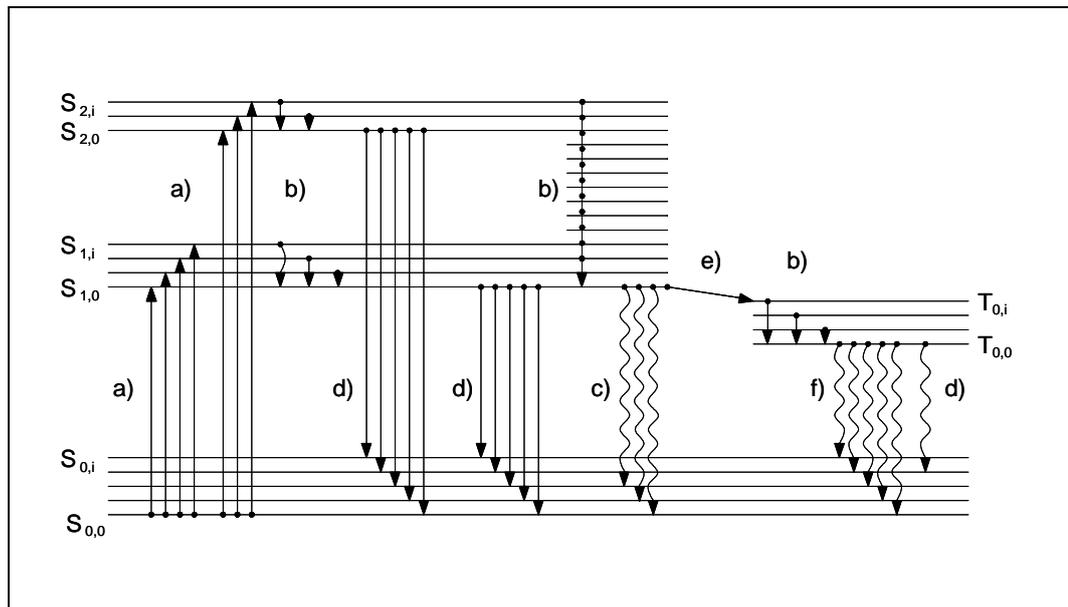


Abbildung 2.1: *Jablonski-Diagramm der Molekülniveaus. Es bedeuten: $S_{i,j}$ Singulettzustände, $T_{i,j}$ Tripletzustände. Die Übergangsprozesse: a) Absorption, b) Vibrations-Relaxation, c) Fluoreszenz, d) Interne Konversion, e) Intersystem Crossing, f) Phosphoreszenz. Relaxationsprozesse unter Aussendung eines Photons sind mit einer Wellenlinie gekennzeichnet.*

Die Relaxationsprozesse werden mit der Kennzeichnung a) bis f) aus Abbildung 2.1 im folgenden erläutert:

a) Absorption

Die Absorption eines Photons überführt ein Molekül vom Grundzustand $S_{0,0}$ in einen elektronisch angeregten Zustand $S_{i,j}$, in dem im allgemeinen auch ein angeregtes Vibrationsniveau besetzt wird. Die Änderung des elektronischen Zustandes benötigt ca. 10^{-15} s [67].

b) Vibrations-Relaxation

Das Molekül verweilt mindestens 10^{-10} s in einem angeregten Zustand $S_{i,j}$, bevor es ein Photon emittiert [34]. In dieser Zeit sind auch andere Arten der Energieabgabe möglich, die von der Umgebung des Moleküls abhängen. Im Gegensatz zu Gasen ist in Flüssigkeiten die Abgabe der Überschussenergie an benachbarte Teilchen zu berücksichtigen. Hierbei wird die Schwingungsenergie in dem Zeitraum 10^{-13} s bis 10^{-11} s [68] durch Stöße abgegeben, und somit kehrt das Molekül in den Schwingungszustand v_0 zurück, bevor ein Photon emittiert worden ist.

Dieser Vorgang wird Vibrations-Relaxation genannt und überführt ein Molekül von einem angeregten Schwingungszustand v_i mit $i > 0$ in den Schwingungsgrundzustand v_0 , ohne eine Änderung der Elektronenstruktur zu erzwingen. Dieses Verhalten ist so effizient, daß eine Aussendung von Infrarot-Photonen nicht stattfindet und wird bei Aromaten als Vavilovs' Gesetz oder Kasha's Regel bezeichnet [69, 70].

c) Interne Konversion

Nachdem ein Molekül die Vibrationsrelaxation durchlaufen hat und sich in einem angeregten Elektronenzustand $S_{i,0}$ mit $i > 0$ befindet, kann es strahlungslos weitere Energie abgeben und in den Grundzustand $S_{0,i}$ zurückkehren.

Dabei sind die Übergänge in das angeregte Niveau $S_{1,i}$ sehr effizient, und der Prozeß eines strahlungslosen Überganges vom ersten angeregten in den Grundzustand ist so unwahrscheinlich, daß er bei Aromaten lange Zeit als nicht existent bezeichnet wurde [71].

d) Fluoreszenz

Nachdem ein Molekül durch die Vibrations-Relaxation in den niedrigsten Schwingungszustand $S_{1,0}$ überführt worden ist, kann eine weitere Energieabgabe auch unter Aussendung eines Photons erfolgen, welche Fluoreszenz genannt wird. Das Molekül befindet sich anschließend in einem Schwingungsniveau des Grundzustandes $S_{0,i}$. Der erste angeregte Zustand hat typischerweise eine Lebensdauer von $\tau = 10^{-9} - 10^{-8}$ s. Bei überwiegender Fluoreszenzrelaxation hat diese eine Lebensdauer in der gleichen Größenordnung.

Durch die Vibrations-Relaxation und Interne Konversion in den ersten angeregten Zustand ist die Energie eines Fluoreszenzphotons geringer als die des absorbierten Photons.

e) Intersystem Crossing

Eine Energieabgabe aus dem ersten angeregten Zustand kann auch durch Wechsel in einen Triplettzustand erfolgen, der als Intersystem Crossing bezeichnet wird. Dabei wird ein Triplettzustand strahlungslos durch einen Übergang aus dem energetisch höher gelegenen Singulettzustand bevölkert. Die Übergangswahrscheinlichkeit dafür ist jedoch geringer als bei Fluoreszenzübergängen zwischen zwei Singulett-Zuständen. Die Zeitdauern für einen solchen Übergang werden im Bereich $10^{-8}s$ bis $10^{-5}s$ beobachtet [34].

Voraussetzung für das Intersystem Crossing ist eine Kopplung der Schwingungsniveaus des Singulett- und des Triplett-Zustandes.

f) Phosphoreszenz

Analog zu den Vorgängen in den Singulettzuständen kann nach einer Vibrations-Relaxation ein Übergang vom Triplettzustand T_0 in den Grundzustand S_0 unter Abgabe eines Photons erfolgen. Der formale Unterschied zur Fluoreszenz liegt dabei in einer Änderung der Multiplizität. Gemessen wird die Phosphoreszenz mit Lebensdauern im Bereich $\tau = 10^{-7} - 10s$ und wird in Flüssigkeiten bei Raumtemperatur i. a. nicht beobachtet (Ausnahme: Biacetyl [72, 73, 74]).

Die Besetzung des Grundzustandes aus einem Triplett-Zustand kann ebenfalls strahlungslos durch ein Intersystem Crossing erfolgen.

Die Prozesse Vibrationsrelaxation und Interne Konversion als Relaxationsprozesse innerhalb von angeregten Zuständen gleicher Multiplizität sind in der Zeitspanne $10^{-13}s$ bis $10^{-11}s$ so effizient, daß eine Fluoreszenz bei Aromaten i. a. nur vom ersten angeregten Elektronenzustand S_1 in den Grundzustand S_0 zu beobachten ist [75]. Eine Fluoreszenz aus höher angeregten Zuständen als S_1 ist z. B. bei Azulen zu beobachten.

Im Gegensatz zur Absorption, die eine Energieniveauverteilung im angeregten Zustand widerspiegelt, gibt die Fluoreszenz bei Aromaten eine Verteilung der Schwingungszustände im Grundzustand S_0 wieder (vgl. das Franck-Condon-Prinzip z.B. in [63]).

Die Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand $S_{0,0}$ und dem ersten angeregten Zustand $S_{1,i}$ liegt bei Aromaten im Bereich einiger Elektronenvolt, und somit weist ein emittiertes Photon aus dem Fluoreszenzprozeß eine Wellenlänge im ultravioletten oder sichtbaren Spektralbereich auf.

Die Fluoreszenzausbeute ϕ ist definiert als das Verhältnis der Anzahl durch Fluoreszenz emittierter Photonen zu der Anzahl absorbierter Photonen und bestimmt mit der absorbierten Intensität I_A die Fluoreszenzintensität I_F :

$$I_F = \phi I_A = \phi \cdot (I_0 - I_l) \quad (2.1)$$

Die Intensität I_A der absorbierten Strahlung ergibt sich als Differenz der einfallenden Intensität I_0 und der austretenden Intensität I_l mit Hilfe des Gesetzes von BEER-LAMBERT bei gegebener Teilchenkonzentration c mit einem Absorptionsquerschnitt σ und durchstrahltem Weg l zu:

$$I_l = I_0 \cdot e^{-\sigma \cdot c \cdot l} \quad (2.2)$$

Die Kombination der Gleichungen 2.1 und 2.2 ergibt folgenden Ausdruck:

$$I_F = \phi \cdot I_0(1 - e^{-\sigma \cdot c \cdot l}) \quad (2.3)$$

Für den Fall verdünnter Lösungen, die die einfallende Strahlung nicht wesentlich schwächen, reduziert sich die Gleichung 2.3 zu:

$$I_F = \phi \cdot I_0 \cdot \sigma \cdot c \cdot l \quad (2.4)$$

Die Größen ϕ und σ sind im allgemeinen wellenlängenabhängig und nicht konstant.

Dieser Gleichung entsprechend ist das Fluoreszenzsignal direkt proportional zu der Anzahl der Teilchen im Grundzustand und zu der einfallenden Intensität I_0 . Eine Erhöhung der Fluoreszenz kann somit durch die Steigerung der Teilchenkonzentration (unter Berücksichtigung der Bedingung verdünnter Lösungen) und durch eine Steigerung der Intensität I_0 erzielt werden.

Diese Linearität bezüglich der Intensität I_0 kann gestört werden, wenn eine (fast) völlige Entvölkerung des Grundzustandes stattfindet. Eine weitere Intensitätszunahme führt dann nicht zu einer vermehrten Absorption und zieht keine erhöhte Fluoreszenz nach sich. Die Fluoreszenz befindet sich in diesem Fall in Sättigung.

Eine Steigerung der Intensität I_0 kann nicht nur zu einer degressiven Fluoreszenzerhöhung oder sogar Sättigung führen, sondern auch die Zerstörung der Teilchen hervorrufen, die für eine erneute Fluoreszenz nicht zur Verfügung stehen. Gefördert wird diese Zerstörung durch die Verwendung gepulster Laser mit hohen Leistungsdichten und eine Fokussierung auf kleine Volumina [76, 77].

Mit Hinblick auf die typischen Zeiten der Fluoreszenzlebensdauern kann davon ausgegangen werden, daß eine Anregung mit hoher Wiederholfrequenz (bis z.B. 80MHz) das mit niedriger Frequenz (z.B. 10Hz) gewonnene Fluoreszenzsignal steigern kann. Obwohl die Pulsintensitäten bei hoher Wiederholfrequenz abnehmen, können die Moleküle öfter zur Fluoreszenz angeregt werden. Zu beachten ist dabei jedoch der Prozeß der Photodissoziation [78, 79], der eine beliebige Skalierung des Signals mit der Wiederholfrequenz verhindert. Eine ausführliche Darstellung dieser Zusammenhänge findet sich z. B. in [45].

2.3 Einfluß des pH-Wertes

Neben dem Einfluß der Molekülumgebung auf die Relaxationsprozesse ist die Polarität des Lösungsmittels und im Fall einer wässrigen Lösung zusätzlich der pH-Wert im Grundzustand und angeregten Zustand zu berücksichtigen, wenn Säure- oder Basegruppen³ an den Benzolring eines Moleküls gebunden sind.

Die Metaboliten O-Des-, N,O-Dides- und N,N,O-Tridesmethyltramadol (siehe Anhang A) haben teilweise die Struktur des Phenols, welches eine vom pH-Wert der Lösung abhängende Fluoreszenz aufweist, die ausführlich in der Literatur beschrieben ist. Stellvertretend und abstrahierend von der tatsächlichen Molekülstruktur der hier untersuchten Arzneistoffe soll im folgenden das Molekül Phenol hinsichtlich seiner Fluoreszenzeigenschaften bei einer Variation des pH-Wertes beschrieben werden.

Phenol hat die Summenformel C_6H_5OH und folgende Strukturformel:

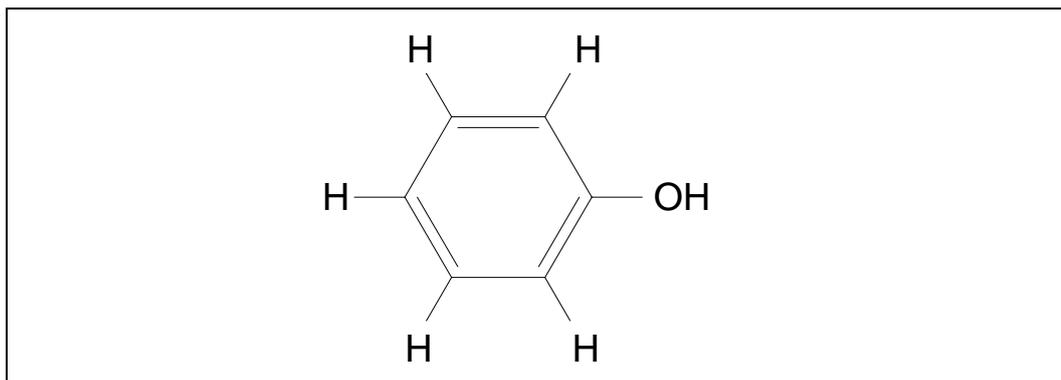
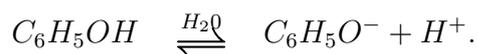


Abbildung 2.2: *Chemische Struktur von Phenol*

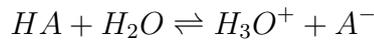
Rechnungen zu der Elektronenverteilung im Grundzustand [80] zeigen eine verminderte Elektronendichte am Sauerstoffatom und erhöhte Elektronendichten an Kohlenstoffatomen des Ringes. Somit neigt Phenol in wässriger Lösung dazu, das Proton des am Sauerstoffatom gebundenen Wasserstoffatoms abzugeben:



Phenol reagiert in wässriger Lösung wie eine Säure und bildet unter Dissoziation H^+ und $C_6H_5O^-$ -Ionen. Als Maß für die Dissoziation von Säuren HA in

³Säuren sind in diesem Zusammenhang Wasserstoffverbindungen, die in wässriger Lösung durch Dissoziation Hydronium-Ionen (H_3O^+ -Ionen) bilden. Basen sind Hydroxyde, die in wässriger Lösung durch Dissoziation OH^- -Ionen bilden.

verdünnten Lösungen dient die Säurekonstante K_s . Mit bezug auf die Gleichgewichtsreaktion



wird die Säurekonstante K_s definiert:

$$\frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} = K_s$$

wobei folgende Bezeichnungen gelten:

$[H_3O^+]$: Konzentration der Hydronium-Ionen [mol/l]

$[HA]$: Konzentration der nicht dissoziierten Säure [mol/l]

$[A^-]$: Konzentration der gebildeten Säurereste [mol/l]

Häufig wird der negative dekadische Logarithmus des Zahlenwertes der Säurekonstanten verwendet:

$$pK_s = -\lg K_s.$$

Bei Phenol wurde in der Grundzustandskonfiguration für die Säurekonstante der Wert

$$pK_s = 10$$

berechnet [80] und gemessen [81].

Wird in einer wässrigen Lösung der Wert $\text{pH}=10$ eingestellt⁴, liegen die Mengen an dissoziiertem Phenol und nicht dissoziiertem Phenol in der Gleichgewichtsreaktion mit gleichen Anteilen vor, wie aus Gleichung 5 hervorgeht:

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 1.$$

Eine Erhöhung des pH-Wertes hat eine Abnahme der Konzentration der Phenolmoleküle im nicht dissoziierten Grundzustand zur Folge, und der Anteil dissoziierter Phenolmoleküle, die nicht zu einer Fluoreszenz angeregt werden können, nimmt zu. Dementsprechend nimmt die Fluoreszenz ab und ist bei Werten $\text{pH} > 12$ praktisch nicht mehr zu beobachten [82].

Die Lebensdauer der Grundzustände ist unendlich lang, und die Ratenkonstanten für Säure-Base-Reaktionen liegen bei 10^{10} s^{-1} bis 10^7 s^{-1} [66]. Somit erfolgt in diesen Fällen die Absorption eines Photons immer aus einem chemischen Gleichgewicht.

⁴Der pH-Wert wird aus der Konzentration der H_3O^+ -Ionen berechnet:
 $\text{pH} = -\log[H_3O^+]$.

2.4 Polarisation

Eine polarisierte Fluoreszenz kann nach der Anregung mit polarisierter Strahlung beobachtet werden, wenn keine depolarisierenden Effekte vorhanden sind. Für Teilchen in Flüssigkeiten sind dies Stöße und die Bewegung der Teilchen in Form von Rotation.

Der Polarisationsgrad P wird durch eine Intensitätsdifferenz beschrieben, die auf die Gesamtintensität normiert wird [83]:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (2.5)$$

wobei I_{\parallel} die Fluoreszenzintensität bezeichnet, die parallel zur anregenden, linear polarisierten Strahlung \vec{E} detektiert wird, und I_{\perp} die dazu senkrechte Fluoreszenzintensität, vgl. Abbildung 2.3.

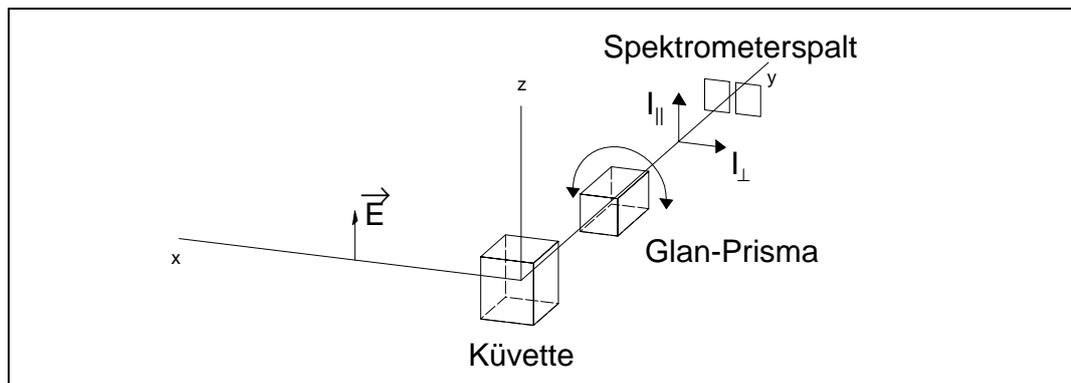


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau für Polarisationsmessungen.

Für Messungen der Fluoreszenzpolarisierung wurde die linear polarisierte Laserstrahlung durch eine Kuvette geleitet, die mit den Proben gefüllt war. Die Fluoreszenz passierte rechtwinklig dazu ein als Analysator wirkendes Glan-Prisma, welches je nach Drehung die Intensitätskomponenten I_{\perp} und I_{\parallel} bzgl. der Laserpolarisation \vec{E} bestimmte.

Die Werte für P beschränken sich auf den Bereich zwischen $+1/2$ und $-1/3$ für Teilchen in Flüssigkeiten [84]. Bei Raumtemperatur überwiegt der Einfluß durch depolarisierende Bewegung und durch Stöße, so daß eine Fluoreszenzpolarisierung oftmals nicht beobachtet werden kann [68].

Eine Erhöhung des Polarisationsgrades P kann durch das Anlegen eines elektrischen Feldes herbeigeführt werden, wenn die Teilchen ein permanentes Dipolmoment besitzen. Die Ausrichtung dieser Dipole erfordert jedoch Feldstärken der Größenordnung 100kV/cm [85, 86], die in der vorliegenden Arbeit bei der CE mit maximal 500V/cm nicht erreicht wurden.

Kapitel 3

Kapillarzonenelektrophorese

Die **K**apillar**z**onenelektrophorese (engl. CZE) ist die am häufigsten verwendete Technik¹ in der **K**apillarelektrophorese (engl. CE) zur Separation von Teilchen.

Die CZE verwendet Kapillaren mit einem Innendurchmesser $\emptyset < 200\mu m$, die mit einem Puffer (Elektrolyten) gefüllt werden. Nach der Injektion eines Probenmischungs (ca. 1- 10nl) wird über der Kapillare eine Spannungsdifferenz in der Größenordnung $20kV - 30kV$ angelegt, und die injizierten Teilchen werden aufgrund ihrer Mobilität und des **E**lektro**o**smotischen **F**lusses (EOF) unter dem Einfluß des elektrischen Feldes durch die Kapillare getrieben. Differenzen in den Mobilitäten führen zu einer Separation der Teilchen, die in Zonen getrennt am Detektor nachgewiesen werden können.

Im folgenden wird die Teilchengeschwindigkeit unter dem Einfluß einer Elektrophorese beschrieben und die Wirkung des EOF auf die Geschwindigkeit dargestellt.

3.1 Elektrophorese und EOF

Ausgangspunkt für eine Trennung von verschiedenen Substanzen ist die Elektrophorese. Sie bezeichnet die Bewegung von Teilchen in einer Flüssigkeit unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes \vec{E} . Die resultierende Geschwindigkeit \vec{v} ergibt sich aus der Beziehung

$$\vec{v} = \mu_t \cdot \vec{E}$$

in der μ_t die Mobilität des Teilchens bezeichnet

$$\mu_t = \frac{ze_0}{6\pi\eta r}$$

¹Eine Übersicht der möglichen Techniken innerhalb der CE ist in Anhang C aufgelistet.

Die Mobilität wird bestimmt durch die (positive oder negative) elektrische Ladung $z \cdot e_0$ und den Radius r des Teilchens, sowie durch die dynamische Viskosität des Elektrolyten η .

Die Geschwindigkeit eines Teilchens kann somit durch seine effektive elektrische Ladung, die Viskosität der Flüssigkeit und die Feldstärke beeinflusst werden.

Bei der Verwendung von Kapillaren bestimmt zusätzlich zur Elektrophorese der EOF (**E**lektro**o**smotischer **F**luß) die Geschwindigkeit der Teilchen².

Der EOF bezeichnet die Bewegung der gesamten Flüssigkeitssäule in der Kapillare und resultiert aus einem Grenzschichteffekt zwischen der elektrisch geladenen Kapillaroberfläche und dem Elektrolyten unter Anwesenheit eines äußeren elektrischen Feldes, welches parallel zur Kapillare gerichtet ist [87]. Dabei bildet sich im Inneren der Kapillare senkrecht zur Oberfläche ein Potentialgefälle ζ (siehe auch Anhang D), welches durch die folgende Helmholtz-Gleichung mit der Mobilität des Elektrolyten μ_{eof} in Beziehung steht [88]:

$$\zeta = \frac{4\pi\eta\mu_{eof}}{\epsilon}. \quad (3.1)$$

Dabei bezeichnen η die dynamische Viskosität und ϵ die dielektrische Konstante des Elektrolyten. Die Stärke des ζ -Potentials hängt somit indirekt von der Art des Puffers, seiner Konzentration, seinem pH-Wert und dem Material der Kapillare ab [89, 90].

Die Geschwindigkeit des EOF \vec{v}_{eof} erhält unter Verwendung der Gleichung 3.1 den Ausdruck [91]:

$$\vec{v}_{eof} = \mu_{eof}\vec{E} = \frac{\zeta\epsilon}{4\pi\eta}\vec{E}$$

und wird durch das ζ -Potential, die dielektrische Konstante, die Viskosität des Elektrolyten und die Feldstärke beeinflusst.

Die Werte der Mobilität μ_{eof} liegen für Quarzkapillaren im Bereich zwischen $0.5 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$ und $6 \cdot 10^{-4} \text{cm}^2/(\text{V} \cdot \text{s})$, wenn der pH-Wert zwischen 3 und 8 variiert wird [92].

Die beobachtbare Geschwindigkeit der Teilchen \vec{v} ergibt sich somit aus der Überlagerung einer Teilchenbewegung aufgrund der Elektrophorese und einer Bewegung des EOF:

$$\vec{v} = \vec{v}_t + \vec{v}_{eof}.$$

²Nachdem in den ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Kapillarelektrophorese der EOF als eher hinderlich für eine hohe Auflösung gehalten wurde, hatte JORGENSON [93, 94, 95] zuerst die Möglichkeiten aufgezeigt, die der EOF bietet.

Die vektorielle Addition ist zu berücksichtigen, da die Richtung des EOF immer zur Kathode weist, aber die Teilchen je nach Ausprägung einer positiven oder negativen Ladung zur Kathode oder Anode wandern können. Wenn der EOF die größte Geschwindigkeit aufweist, können am kathodenseitigen Detektor elektrisch positive, negative und neutrale Teilchen nachgewiesen werden.

Differenzen in den beobachtbaren Teilchengeschwindigkeiten führen zu einer Trennung, und Teilchen gleicher Geschwindigkeit bilden Zonen in der Kapillare, die räumlich voneinander getrennt detektiert werden können. Die Abbildung 3.1 verdeutlicht die Entstehung der Zonen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Kapillare, nachdem ein Gemisch aufgegeben und ein elektrisches Feld angelegt wurde.

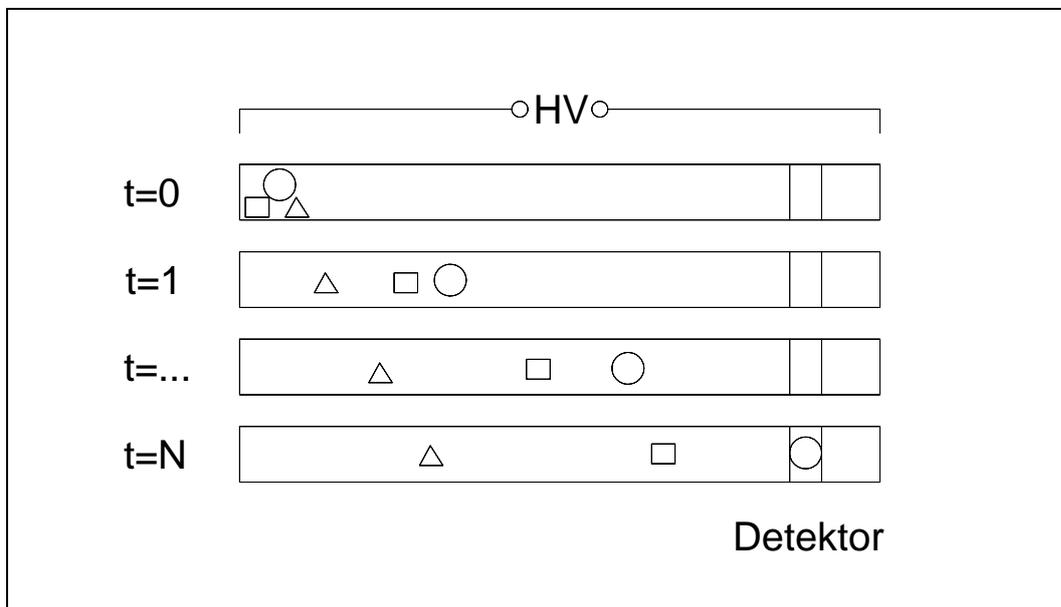


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung zur Bildung von Zonen mit Teilchen gleicher Geschwindigkeit (\square , \circ , \triangle) aus einem Teilchengemisch in einer Kapillare.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ befinden sich alle Teilchen eines Gemisches auf der linken Seite der Kapillare und wandern unter dem Einfluß des Potentialgefälles der Hochspannung (HV) nach rechts. Es bilden sich zu den Zeitpunkten $t = 0, 1, ..N$ verschiedene Zonen, die sich durch ihre Teilchengeschwindigkeit unterscheiden und mit den Symbolen \square , \circ und \triangle gekennzeichnet sind. Bei hinreichendem räumlichem Abstand zueinander können die Teilchen am Detektor nachgewiesen werden.

Die zeitliche Reihenfolge der Signale wird durch die Temperatur des Puffers in der Kapillare maßgeblich beeinflusst. Die Viskosität η steht mit der Mobilität in dem Zusammenhang $\eta \propto 1/\mu$ und kann für viele Flüssigkeiten mit folgender Funktion angenähert werden, die in exponentiell fallendem Zusammenhang mit der Temperatur T steht:

$$\eta = A \cdot e^{B/(R \cdot T)} \quad (3.2)$$

wobei $A [Pa \cdot s]$ und $B [J/mol]$ Konstanten sind und $R = 8.314 [J/(mol \cdot K)]$ die molare Gaskonstante bezeichnet. Eine Temperaturerhöhung hat eine Zunahme der Mobilität und somit eine Verkürzung der Zeiten zur Folge, die die Substanzen vom Beginn der Kapillare zum Detektor benötigen (Migrationszeit). Deshalb können die Signale aus Messungen bei differierenden Temperaturen für eine Identifikation anhand ihrer Migrationszeiten nur mit Einschränkungen untereinander verglichen werden.

Bei typischen Werten der Spannung $U = 25kV$ und des elektrischen Stroms $I = 70\mu A$ wird von der Spannungsquelle bei einer Kapillare der Länge $L = 80cm$ und einem Innendurchmesser $\emptyset = 50\mu m$ eine Leistung von $P = U \cdot I = 1,12kW/cm^3$ abgegeben. Davon werden ca. 35% als Wärme von der Kapillare abgestrahlt, und die verbleibende Leistung ($P = 732W/cm^3$) führt zu einer Erwärmung des Puffers [96]. Temperaturmessungen am Puffer in der Kapillare [97, 98] ergeben Werte von bis zu $70^\circ C$. Eine geeignete Kühlung und Temperaturstabilisation der Kapillare kann mit Ventilatoren, Wasserbädern oder Peltierelementen [99] erfolgen. Eine Übersicht über Effekte des Temperaturgradienten entlang des Kapillarquerschnitts findet sich z. B. in [100, 101]

Als Detektoren stehen post-column oder on-column-Einheiten zur Verfügung, die die Substanzen am Ende der Kapillare oder in der Kapillare nachweisen. Dabei können verschiedenste Methoden und Verfahren mit all ihren Varianten verwendet werden, wie z. B. [102]:

- Ramanmessungen
- Massenspektrometrie
- Messung der Absorption
- Messung der Fluoreszenz
- Messung der Radioaktivität
- Ionenmobilitäts-Spektroskopie
- Messung der Chemilumineszenz
- Messung des Zirkulareren Dichroismus'

- Messung von Konzentrationsgradienten
- Brechungsindex-Änderungsmessungen

Neben dieser idealisierten Trennung sind bei der Anwendung der CZE Adsorptionseffekte zu beobachten, die zu einer Anreicherung von Teilchen auf der Oberfläche der Kapillare führen [103]. Die über weite pH-Bereiche (bis ca. pH=2.0 [104]) elektrisch negativ geladene Kapillaroberfläche kann elektrisch positiv geladene Teilchen in einem irreversiblen Prozeß dauerhaft binden. Im Fall eines Gleichgewichtes zwischen Adsorption und Desorption entsteht ein reversibler Prozeß der Adsorption. Somit führt die Adsorption zu einer Signalverbreiterung und zu einer Signalminderung [105].

Maßnahmen gegen eine Adsorption [102, 106] können zugleich einen Einfluß auf die Trennung der Substanzen ausüben und wurden deshalb in dieser Arbeit im Sinne einer optimierten CZE nicht verfolgt.

Das Lösungsmittel der Substanzen stimmt bei allen Messungen mit der Art des Puffers, seiner Konzentration und seinem pH-Wert überein, um dispersive Effekte [107, 108] zu vermeiden und eine Vergleichbarkeit der Messungen bzgl. der spektralen Fluoreszenzemission, der Fluoreszenzstärke und der Substanzreihenfolgen in der CZE zu gewährleisten.

Kapitel 4

Apparativer Aufbau

Nachdem die theoretische Grundlage für das Verständnis der CZE vorgestellt worden ist, folgen in diesem Kapitel Ausführungen zum apparativen Aufbau eines CE-Systems.

Ein CE-System besteht im wesentlichen aus folgenden vier Komponenten:

- Kapillare, Kapillarhalterung und Kapillarkühlung
- Hochspannungsquelle
- Probenaufgabe
- Detektoreinheit

Die konkrete Ausgestaltung richtet sich hauptsächlich nach der Art der Probenaufgabe (hydrodynamisch, elektrostatisch oder druckgesteuert), der Wahl des Detektionsverfahrens (vgl. Seite 19), der Art der Kühlung (Flüssigkeits-, Luft- oder Peltierkühlung) und der Bereitstellung der Probengefäße (manueller oder automatisierter Wechsel).

Die Bezeichnung “Detektionsverfahren” beinhaltet nicht nur den Detektor im engeren Sinne, sondern im weiteren Sinne auch all die Komponenten, die eine Detektion erst ermöglichen. Dazu zählen in dieser Arbeit für Fluoreszenzmessungen die Lichtquellen (Lasersysteme) und der Detektor als eine ICCD-Kamera (**i**ntensivierte **C**CD-Kamera) mit den notwendigen Abbildungsoptiken mit und ohne Spektrometer, sowie die Signalverarbeitung in einem PC.

Die Lasersysteme bestanden aus drei Varianten, von denen das eine ein Farbstofflasersystem war. Die beiden anderen wurden von OPO-Lasersystemen (**O**ptical **P**arametric **O**scillator) gebildet, die in dieser Arbeit als erstes und zweites OPO-Lasersystem bezeichnet werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Komponenten des apparativen CZE-Aufbaus und der Detektionskomponenten werden im folgenden vorgestellt und charakterisiert.

4.1 Der CZE-Aufbau

Die CZE-Messungen zu dieser Arbeit wurden mit zwei verschiedenen CZE-Systemen durchgeführt, von denen das erste selbsterstellt wurde.

Das zweite System bestand aus einem kommerziellen Gerät der Firma Grom¹, das für die LIF-Detektion in geeigneter Weise modifiziert worden ist.

Diese beiden Systeme, die sich im wesentlichen durch die Art der Probeninjektion in die Kapillare unterscheiden, werden im folgenden beschrieben. Für eine Darstellung der verwendeten Lasersysteme wird auf das Kapitel 0.1 und für eine Darstellung der optischen Komponenten auf das Kapitel 4.4 verwiesen.

Das selbsterstellte CZE-System

Der selbsterstellte CE-Aufbau für Messungen ohne Spektrometer bestand aus den Komponenten Kapillare, Reservoir, Spannungsversorgung, Kapillarhalterung und Detektor, wie sie in Abbildung 4.1 dargestellt sind.

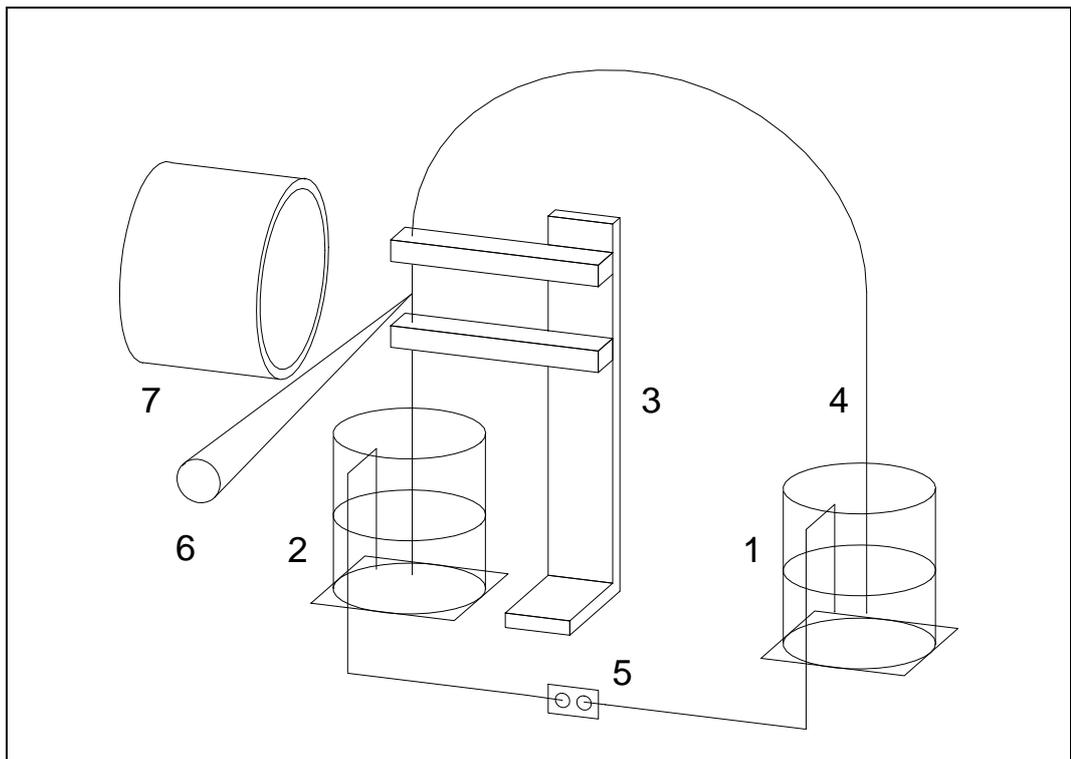


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des CZE-Aufbaus ohne Spektrometer: 1,2) Reservoir, 3) Kapillarhalterung, 4) Kapillare 5) HV-Quelle 0-15kV, 6) Laserstrahl, 7) Detektor.

¹Leihgabe: Institut für Pharmazeutische Chemie, Uni-Münster, Prof. Blaschke

Die Kapillare tauchte mit beiden Enden in jeweils einem eigenen Reservoir. Am Detektionsort wurde sie von einer U-förmigen Halterung fixiert und vom Laserlicht bestrahlt. Die Kapillare konnte zum Spülen und Befüllen mit der Pufferlösung über eine Dichtung mit der Kanüle einer ml-Spritze verbunden werden, vgl. [15].

Die Probenaufnahme erfolgte manuell und hydrodynamisch, wobei das Reservoir 1 gegen ein Reservoir ausgetauscht wurde, welches die Probe enthielt. Die Probeninjektion ergab sich über das Anheben dieses Reservoirs um eine definierte Strecke (20cm). Nach einem bestimmten Zeitraum (10s bis 15s) wurde das Probenreservoir gesenkt und durch das mit der Pufferlösung ersetzt.

Für die Elektrophorese wurde das Reservoir 1 mit der Anode und das Reservoir 2 mit der Kathode der Spannungsquelle (0 bis 15kV) verbunden und die Kapillare mit einem Ventilator gekühlt.

Der Detektor bestand in allen CZE-Anordnungen aus einer intensivierten CCD-Kamera, die rechtwinklig zur Kapillare und zum Laserlicht das Fluoreszenzsignal aufzeichnete (siehe auch Kapitel 4.4).

Das modifizierte CZE-System

Der zweite CZE-Aufbau bestand aus dem CE-Gerät der Firma Grom, System 100, das in geeigneter Weise modifiziert wurde:

In der Originalversion sind der Aufgabeblock, die aufgerollte Kapillare und ein Lüfter Teil eines optisch abgeschlossenen Systems, an den der gewählte Detektor von außen angekoppelt wird. Ohne diesen optischen Anschluß entspricht dieses System grundsätzlich dem Aufbau in Abbildung 4.1.

Um einen optischen Zugang an die Kapillare zu erhalten, wurde die Kapillare, deren Anfang im Aufgabeblock befestigt ist, aus dem Gehäuse geführt und mittels einer U-förmigen Halterung am Detektionsort fixiert. Das Ende der Kapillare gelangte zurück in das Gehäuse und wurde von einem Aufnahmeblock gehalten, der dem Aufgabeblock ohne Spritzeneinlaß entsprach. Die Kühlung der Kapillare erfolgte inner- und außerhalb des Gehäuses mit jeweils einem Ventilator.

Der Aufgabeblock dient der Halterung der Kapillare und zum Ankoppeln einer Mikroliterspritze, mit der die Kapillare gespült und befüllt werden kann, vgl. Abbildung 4.2.

Für die Aufnahme einer Probe wird der Probenraum (Volumen ca. $2\mu\text{l}$) mit der Probe gespült und gefüllt, um dann einen festen Weg (10cm) entlang einer Führungsschiene manuell angehoben zu werden. Die Aufnahme erfolgt ebenfalls hydrodynamisch und ist durch das Senken des Blocks in die Ausgangsposition, in der die beiden Kapillarenden keine Höhendifferenz aufweisen, beendet.

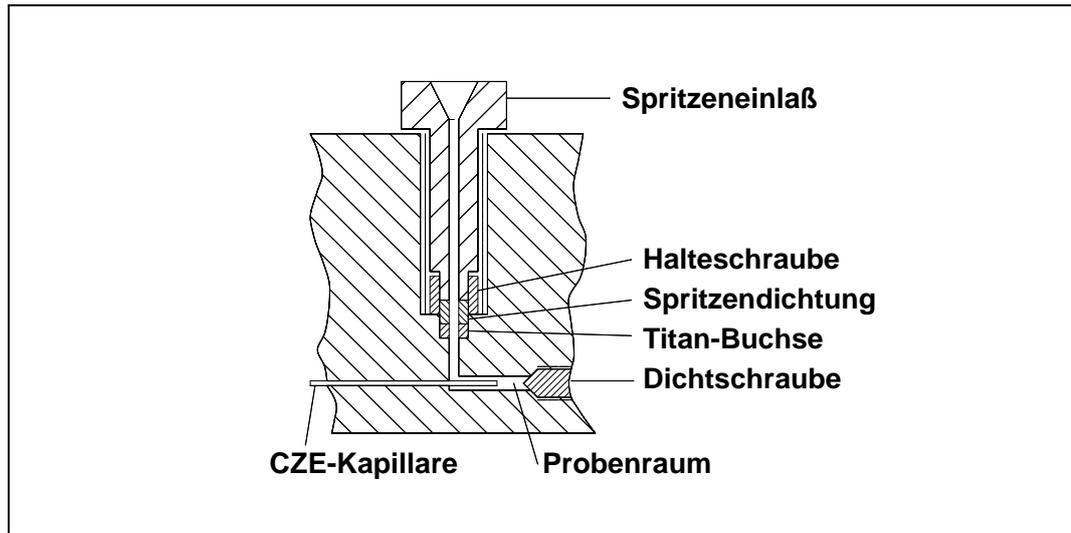


Abbildung 4.2: Querschnitt durch den Aufgabeblock.

An der Spannungsversorgung (0 bis 30kV) kann die gewünschte Spannung auf 100V genau eingestellt werden und der durch die Kapillare fließende elektrische Strom (max. $200\mu\text{A}$) zur Kontrolle der Elektrophorese und für Vergleiche zwischen verschiedenen Messungen abgelesen werden.

In allen CZE-Messungen wurde die Spannung konstant und der elektrische Strom variabel gehalten.

Eine Abschätzung der durch die Aufgabe in die Kapillare gelangte Menge kann mit Hilfe folgender Beziehung erfolgen [109], die als Aufgaberate H [cm/s] die Höhe der aufgegebenen Flüssigkeitssäule pro Zeit angibt:

$$H = \rho \cdot g \cdot r^2 \cdot \Delta h / (8 \cdot \eta \cdot L) \quad (4.1)$$

Darin bezeichnen ρ [g/ml] die Dichte des Elektrolyten, g [cm/s²] die Erdbeschleunigung, r [cm] den Innenradius der Kapillare, Δh [cm] die Höhendifferenz, η [g/(cm · s)] die Viskosität des Elektrolyten und L [cm] die Gesamtlänge der Kapillare.

Mit den Werten $\rho = 1\text{g/ml}$, $g = 981\text{cm/s}^2$, $r = 25 \cdot 10^{-4}\text{cm}$, $\Delta h = 10\text{cm}$, $\eta = 0.01\text{g/(cm} \cdot \text{s)}$ und $L = 74\text{cm}$ ergibt sich bei einer typischen Aufgabezeit von $t = 15\text{s}$ eine Flüssigkeitssäule von $H = 1.5\text{mm}$. Das entspricht einem Volumen von:

$$V = 3,1\text{nl}.$$

Für den Fall der Probenaufgabe mit einem kontrollierten Druckunterschied Δp zwischen den Kapillarenden kann folgende Gleichung verwendet werden, die ebenfalls die Aufgaberate H [cm/s] als Höhe der aufgegebenen Flüssigkeitssäule pro Zeit angibt :

$$H = (\pi \cdot \Delta p \cdot r^2) / (8 \cdot \eta \cdot L) \quad (4.2)$$

Die Parameter entsprechen denen in Gleichung 4.1 und Δp wird in $[g/cm \cdot s^2]$ angegeben. Mit den Werten von $\Delta p = 0.5psi = 3.44 \cdot 10^{-4}g/(cm \cdot s^2)$ und $t = 15s$ berechnet sich beispielsweise eine Höhe von $H = 1.1mm$, die einem Volumen $V = 2,3nl$ entspricht.

Im folgenden bezeichnen die Injektions- oder Aufgabemenge die in den Aufgabeblock der Kapillare gespritzte Menge (typischerweise $20\mu l$). Die Injektions- oder Aufgabezeit gibt den Zeitraum an, für den ein Höhenunterschied zwischen den Kapillarenden hergestellt wird. Dabei wandert die Probe in die Kapillare. Diese Mengen werden durch die Gleichungen 4.1 und 4.2 bestimmt und sind nicht mit der in den Block injizierten Menge identisch.

Eine Vergrößerung der Aufgabezeit führt zu einer Verlängerung der aufgegebenen Flüssigkeitssäule mit gleichbleibender Konzentration. Eine Signalvergrößerung kann somit nur erreicht werden, wenn das Detektionsfenster in der Kapillare größer als die Länge der injizierten Probe ist und alle Teilchen für die Detektion genutzt werden. In diesem Fall ist das Fluoreszenzsignal proportional zu der Aufgabezeit, wenn die Zeitpunkte zu dem die Probe in das Detektionsfenster hinein und hinaus gelangt vernachlässigt werden. Gleichzeitig wird jedoch mit zunehmender Aufgabezeit die Trennung der Substanzen verschlechtert und kann sogar verhindert werden.

In kommerziell erhältlichen Geräten wird häufig nur ein kleiner Teil der Probe (ca. $100\mu m$) für die Probendetektion verwendet, um eine hohe räumliche Trennung der Signale zu gewährleisten.

Somit muß ein Kompromiß in der Aufgabezeit zwischen einer guten Trennung und einem hohen Signal gebildet werden.

4.2 Die Lasersysteme

Für die Erzeugung der notwendigen UV-Strahlung konnten drei unterschiedliche und gepulste Lasersysteme verwendet werden. Das eine ist ein Farbstofflasersystem, welches von einem Nd:YAG-Laser gepumpt wurde und mit einer externen Frequenzverdopplung versehen war.

Die beiden anderen Systeme waren OPO-Lasersysteme (**O**ptical **P**arametric **O**scillator), die mit einem Nd:YAG-Laser betrieben wurden und sich durch den Aufbau zur Frequenzverdopplung unterschieden. Das im folgenden als erstes OPO-Lasersystem bezeichnete war mit einer externen Frequenzverdopplung ausgestattet, und das als zweites OPO-Lasersystem bezeichnete wurde mit einer internen Frequenzverdopplung betrieben.

4.2.1 Das Nd:YAG-lasergepumpte Farbstofflasersystem

Für die Erzeugung bestimmter Wellenlängen (213nm und 270nm) konnte das Farbstofflasersystem genutzt werden. Dafür stand als Pumplaser ein Nd:YAG-Laser (Spectra Physics, GCR 130-10) zur Verfügung, welcher ein Strahlprofil mit annähernd gaußförmiger Intensitätsverteilung aufweist. Die Wiederholfrequenz war auf 10Hz festgelegt, und die Pulsdauer betrug bei der verwendeten Wellenlänge 355nm ca. 7ns [110].

Für die Erzeugung von Laserstrahlung der Wellenlänge 270nm wurde der Farbstoff Coumarin 153 in einer Konzentration von 2,36g/l in Methanol verwendet und die Emission auf 540nm eingestellt. Die anschließende Frequenzverdopplung mit einem BBO-Kristall (55°) erzeugte die gewünschte Wellenlänge mit einer maximalen Leistung von 1,8 mJ/Puls bei einer Pumpleistung von 90mJ/Puls.

Die Isolation der UV-Wellenlänge und die Strahlführung zum Meßort wurde mit einem Pellin-Broca-Prisma realisiert, vgl. Abbildung 1.

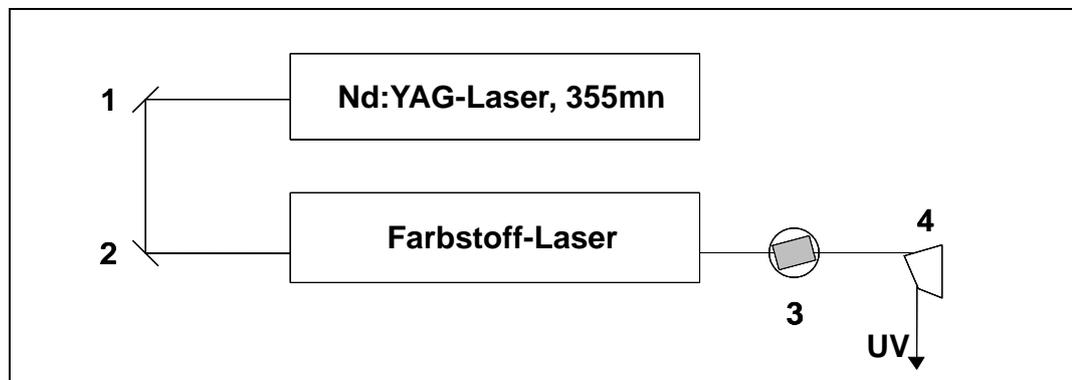


Abbildung 4.3: *Strahlführung des Nd:YAG-Farbstofflaser-Systems. 1), 2) 355nm-45°-Spiegel, 3) BBO-Kristall für Frequenzverdopplung, 4) Pellin-Broca-Prisma.*

Als zweite Wellenlänge konnten 212nm mit dem Farbstoff Bis-MSB bei einer Konzentration von 0,13g/l in Dioxan gelöst durch eine Frequenzverdopplung mit einem weiteren BBO-Kristall (80°) bereitgestellt werden.

Die maximale Ausgangsleistung betrug 1,5 mJ/Puls, wenn als Pumpleistung 90mJ/Puls zur Verfügung standen.

Das Strahlprofil des Farbstofflasers hatte vor der Frequenzverdopplung die in Abbildung 2 gezeigte Form.

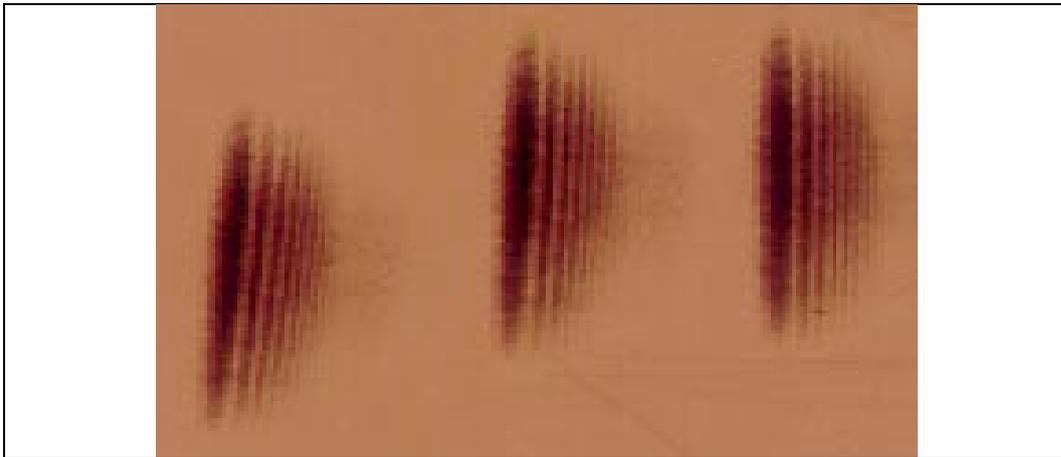


Abbildung 4.4: *Drei Strahlprofile des Farbstofflasers auf Fotopapier vor der Frequenzverdopplung.*

In jedem Profil ist im linken Bereich der relativ homogene und elliptische Teil zu erkennen, der für die Frequenzverdopplung genutzt wurde und für die Ausleuchtung eines 3mm langen Teils der Kapillare geeignet war.

4.2.2 Die OPO-Lasersysteme

Das Kernstück eines OPO-Systems ist ein BBO-Kristall², der in einem Resonator positioniert ist. Die durch diesen Kristall (im folgenden als OPO-Kristall bezeichnet) geleitete Laserstrahlung der Wellenlänge 355nm wird durch einen nicht linearen parametrischen Prozeß in zwei Anteile aufgespalten, die am Entartungspunkt bei 700nm gleiche Wellenlängen aufweisen, vgl. Abbildung 3. Bei dieser Wellenlänge beträgt der Winkel θ zwischen dem einfallenden Laserstrahl³ und der optischen Achse des OPO-Kristalls 33.8° . Bei kleineren Winkeln wird die Strahlung mit einer Wellenlänge größer 700nm als Idlerwelle und die Strahlung mit Wellenlängen kleiner 700nm als Signalwelle bezeichnet. Die Aufspaltung der einfallenden Strahlung in zwei Anteile unterschiedlicher Wellenlänge berücksichtigt die Energie- und Impulserhaltung.

Diese beiden erzeugten Strahlungen sind in ihrer Wellenlänge durch den Winkel θ zwischen der Laserstrahlung und der optischen Achse des OPO-Kristalls festgelegt. Eine Variation dieses Winkels kann die Wellenlänge über einen weiten Wellenlängenbereich kontinuierlich verändern, wie in Abbildung 3 dargestellt ist.

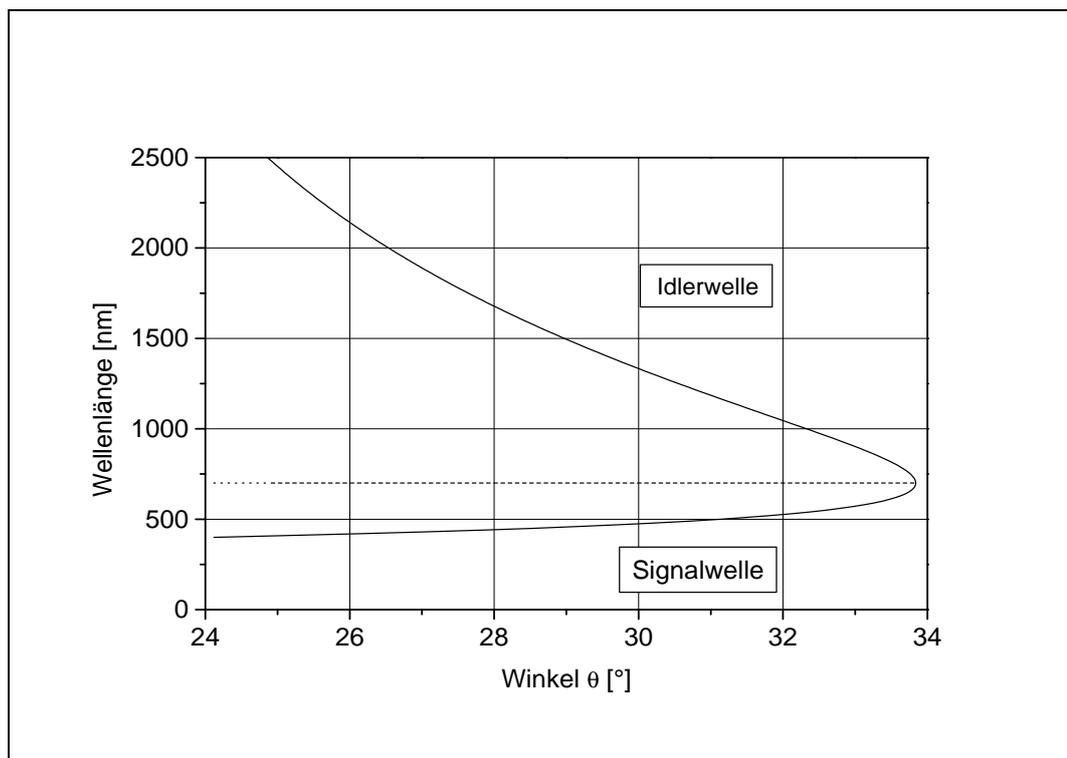


Abbildung 4.5: Die spektrale Position der Idler- und Signalwelle als Funktion des Winkels θ .

²Für alle hier eingesetzten OPO-Lasersysteme wurde derselbe Kristall verwendet: Eintrittsfläche $9 \cdot 11\text{mm}^2$, Länge 12mm , Schnittwinkel 30° .

³Die Richtung des Laserstrahlung wird durch den Wellenvektor \vec{k} bestimmt.

Für die Erzeugung durchstimmbarer UV-Strahlung kann die Signalwelle verwendet werden. Durch eine Frequenzverdopplung der Wellenlängen zwischen 400nm und 700nm wird UV-Strahlung im Bereich zwischen 200nm und 350nm erzeugt.

Die Wellenlängenbereiche der Signal- und Idlerwelle werden zusätzlich durch den effizienten Wellenlängenbereich der verwendeten Resonatorspiegel und der Wellenlänge der eingekoppelten Laserstrahlung bestimmt. Die effizienten Bereiche der Resonatorspiegel sind kleiner als der vom OPO-Kristall erzeugte Wellenlängenbereich. Daher sind drei Spiegelpaare erforderlich, um den Bereich zwischen 400nm und 700nm abzudecken. Die eingekoppelte Strahlung wurde von einem schmalbandigen, gepulsten Nd:YAG-Laser mit der Wellenlänge 355nm bereitgestellt.

Für diese Arbeit standen zwei OPO-Lasersysteme zur Verfügung, die sich durch ihre Möglichkeit zur Frequenzverdopplung der Signalwellenlänge unterschieden.

Das OPO-Lasersystem mit externer Frequenzverdopplung

Das erste OPO-Lasersystem war mit einer externen Frequenzverdopplung versehen und wird durch die Abbildung 4 schematisch dargestellt.

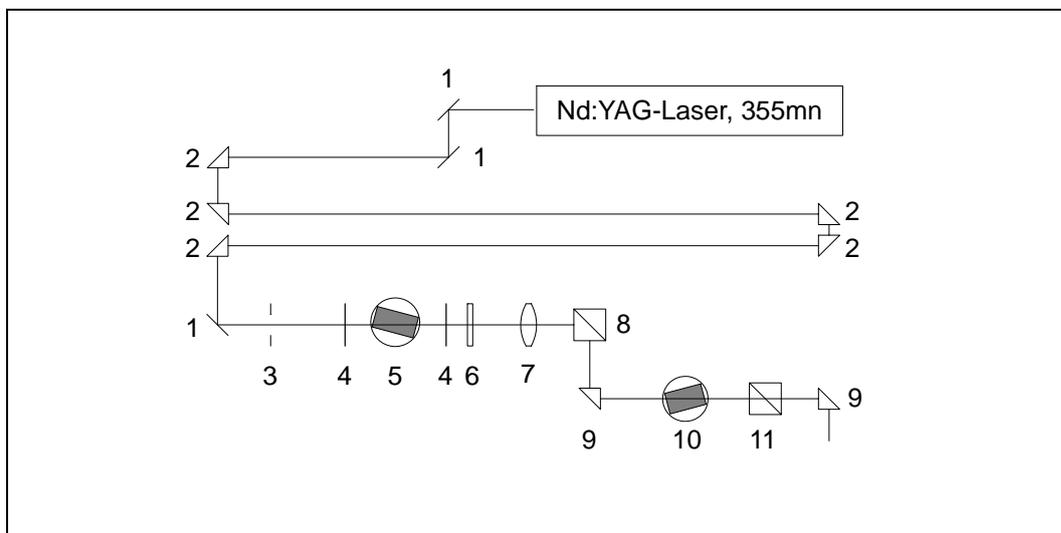


Abbildung 4.6: Der Aufbau des OPO-Systems mit externer Frequenzverdopplung. 1) 355nm-45°-Spiegel, 2) 90°-Quarzprisma, 3) Blende, 4) Resonatorspiegel, 5) OPO-Kristall, 6) IR-Filter, 7) Linse, 8) Strahlteilerwürfel, 9) 90°-Quarzprisma, 10) BBO-Kristall zur Frequenzverdopplung, 11) Glan-Prisma.

Die Strahlung des Nd:YAG-Lasers (Spectra GCR 290) durchlief zuerst eine Verzögerungsstrecke (gekennzeichnet durch die Quarzprismen 2), die durch die Nutzung anderer Experimente nötig war. Im Anschluß daran erfolgten die Konversion dieser Strahlung im OPO-Kristall (5), die Wellenlängenseparation und die Frequenzverdopplung(10).

Für die Messungen in dieser Arbeit wurden die Resonatorspiegelpaare um den OPO-Kristall mit den Bereichen 450nm-575nm und 405nm-480nm verwendet. Eine Blende vor dem OPO-Resonator begrenzte die Leistung des Pump lasers (Spectra GCR 290) auf maximal 280mJ/Puls um die Zerstörschwelle von $1.5J/cm^2$ der Resonatorspiegel und $2J/cm^2$ des OPO-Kristalls nicht zu überschreiten.

Am Ausgang des OPO-Resonators sind die nicht konvertierte Pumpwellenlänge (355nm), die Signalwellenlänge und die Idlerwellenlänge vorhanden. Für die Frequenzverdopplung der Signalwellenlänge mußten die anderen unterdrückt werden. Die Idlerwelle konnte mit einem IR-Filter eliminiert und die Pumpwelle mit einem Strahlteilerwürfel getrennt werden, da die Polarisations Ebenen der Signalwelle und der Pumpwelle senkrecht zueinander orientiert waren.

Die Frequenzverdopplung erfolgte durch die Fokussierung der Signalwelle in einen geeigneten BBO-Kristall⁴. Die Isolation der frequenzverdoppelten UV-Strahlung konnte ebenfalls durch ein polarisationsselektives Element (Glan-Prisma) herbeigeführt werden. Unter Ausnutzung der durch die Resonatorspiegel vorgegeben Wellenlängenbereiche ergeben sich als frequenzverdoppelte UV-Strahlung Wellenlängen im Bereich 220nm-240nm und 240nm-280nm.

Für eine Wellenlängenänderung wurden der OPO-Kristall und der Kristall zur Frequenzverdopplung über je eine Schrittmotorsteuerung vom PC kontrolliert und synchron variiert.

Diese Art der Erzeugung von UV-Strahlung war nicht sehr effizient, da der Akzeptanzwinkel des frequenzverdoppelnden Kristalls kleiner als der Winkel der dort hinein fokussierten Strahlung war [110, 111]. Die maximale Leistung von 0.6mJ/Puls wurde bei einer Pumpleistung von 20mJ/Puls der Signalwelle erreicht. Damit beträgt die Konversionseffizienz nur 3%.

Aus diesem Grund wurde dieses OPO-System mit dem Nd:YAG-Laser durch das zweite OPO-Lasersystem mit intracavity-Frequenzverdopplung ersetzt.

⁴Eintrittsfläche $8 \cdot 4mm^2$, Länge $7mm$, Schnittwinkel 55°

Das OPO-System mit intracavity-Frequenzverdopplung

Dieses OPO-System (GWU) unterscheidet sich von dem ersten darin, daß der BBO-Kristall für die Frequenzverdopplung⁵ in dem OPO-Resonator integriert war, wie die Abbildung 5 zeigt.

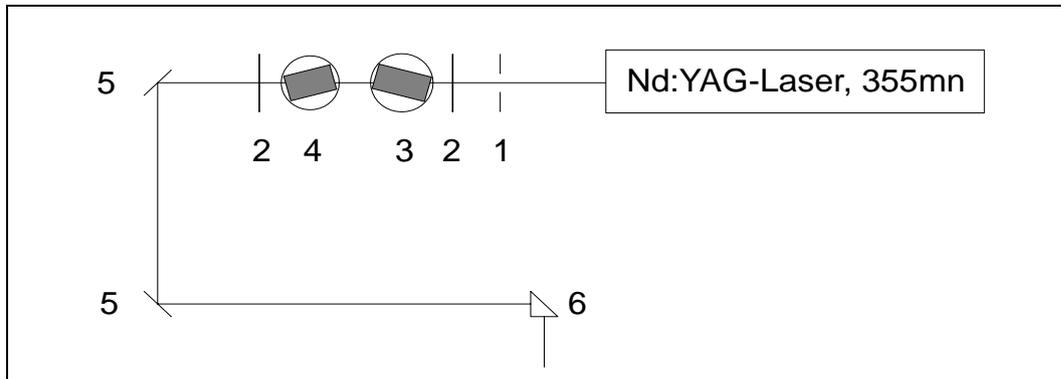


Abbildung 4.7: Der Aufbau des OPO-Systems mit interner Frequenzverdopplung. 1) Blende, 2) Resonatorspiegel, 3) OPO-Kristall, 4) BBO-Kristall zur Frequenzverdopplung, 5) UV-Breitband-Spiegel, 6) 90°-Quarzprisma.

Bei diesem Aufbau ist der Resonator in einer Entfernung von nur 30cm zum Nd:YAG-Laser (Spectra GCR 230) aufgestellt, um das homogene Nahfeld des Lasers für eine hohe Konversionseffizienz im OPO-Kristall zu nutzen. Eine Keramikblende begrenzt den Durchmesser des Laserstrahls, um die Zerstörungsschwelle der Resonatorspiegel und des OPO-Kristalls nicht zu überschreiten.

Die Signalwellenlänge wird im Resonator (effizienter Bereich: 450nm-574nm) frequenzverdoppelt, so daß vom OPO-System vier Wellenlänge emittiert werden:

- die dritte Harmonische des Nd:YAG-Lasers mit 355nm,
- die Signalwellenlänge,
- die Idler-Wellenlänge im Infrarotbereich und
- die aus der Signalwellenlänge frequenzverdoppelte UV-Strahlung

Eine Separation der UV-Wellenlänge kann im Gegensatz zum oben beschriebenen OPO-System nicht unter Verwendung von Polarisations-elementen erfolgen, da die UV-Strahlung und die 355nm des Nd:YAG-Lasers die gleiche Polarisationsrichtung aufweisen. Statt dessen wird die UV-Strahlung mit Hilfe zweier dielektrischer UV-Breitband-45° Spiegel [112] (HR-Bereich 240nm bis 275nm) isoliert, so daß eine wie in Abbildung 6 dargestellte wellenlängenabhängige UV-Leistung zur Verfügung stand.

⁵Eintrittsfläche $9 \cdot 11\text{mm}^2$, Länge 7mm , Schnittwinkel 49°

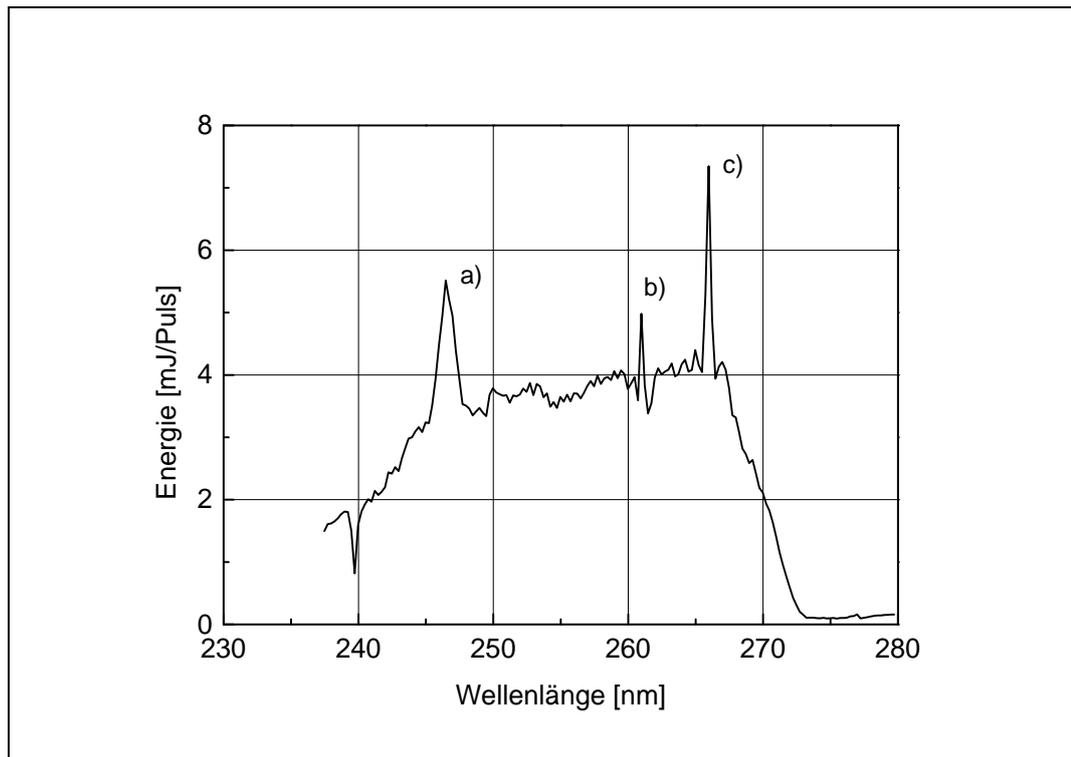


Abbildung 4.8: OPO-UV-Ausgangsleistung nach dielektrischer Strahlseparation über zwei 45° -UV-Breitband-Spiegel. a) 246.5nm, b) 261nm, c) 266nm.

Die Intensitätsspitzen ergeben sich, wenn bei der Erzeugung von a) 246.5nm der OPO-Kristall und von b) 261nm der Kristall zur Frequenzverdopplung mit ihrer Kristallfläche senkrecht im Laserstrahl stehen und somit die Resonatorverluste minimiert werden. Beim Signal c) 266nm wird der OPO durch nicht herausgefilterte Restanteile der 532nm Strahlung des Nd:YAG-Lasers geseedet und seine Effizienz gesteigert.

Auch hier konnten die beiden Kristalle durch je eine Schrittmotorsteuerung vom PC kontrolliert und synchron variiert werden.

Die kleinste und durch die Schrittmotoren und das Computerprogramm auflösende Schrittweite in der Wellenlängenänderung betrug für beide OPO-Lasersysteme 0.01nm. Aufgrund der kontinuierlichen Emissionsspektren wurde in späteren Messungen eine Schrittweite von 0.2nm gewählt. Damit konnte auch die Datenmenge der Kamerabilder und die Meßzeit reduziert werden.

4.3 Die ICCD-Kamera

Die Datenaufnahme bezieht sich bei diesen Messungen auf die Detektion von Fluoreszenzlicht, für die eine ICCD-Kamera mit einem Bildverstärker (intensivierte CCD-Kamera) zur Erzeugung zweidimensionaler Bilder zur Verfügung stand.

Die Kamera ist mit einem Frame-Transfer-Chip ausgestattet, der $768 \cdot 1144$ Pixel der Größe $22,5 \cdot 22,5 \mu\text{m}^2$ enthält und die Abmessungen $18 \cdot 12 \text{mm}^2$ besitzt. Die zur Belichtung freigegebene Fläche umfaßt $768 \cdot 572$ Pixel und ist direkt an den 18mm großen Ausgang eines Bildverstärkers (Firma Proxitronic, Bensheim) gekoppelt. Auf der Vorderseite ist der Bildverstärker mit einem Quarzfenster und einer UV-empfindlichen Photokathode (S20) ausgestattet, die eine Effizienz von 9% bis 23% im Wellenlängenbereich $200 - 600 \text{nm}$ besitzt, wie sie in Abbildung 4.9 dargestellt ist.

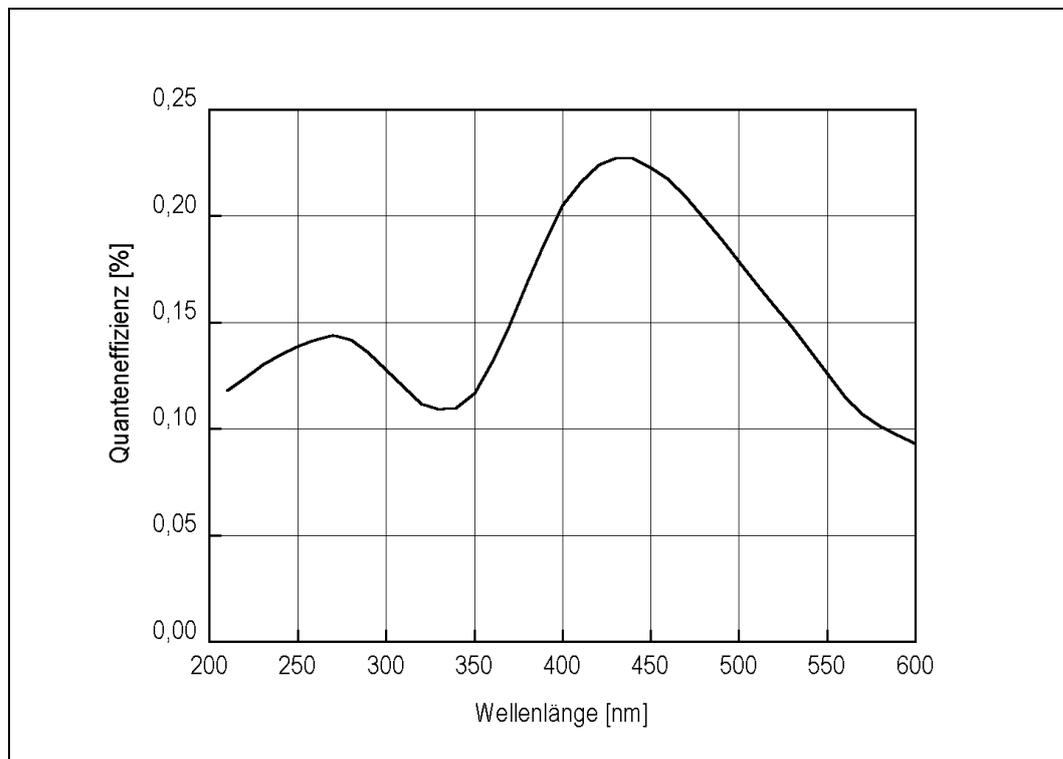


Abbildung 4.9: *Quanteneffizienz der Bildverstärkerfotokathode [113]*

Die von der Kamera aufgenommenen Bilder werden mit einer Rate von 620kHz pro Pixel über ein BNC-Kabel in einen AD-Wandler im Steuerungsrechner übertragen, dessen Auflösung von 12 Bit die Zerlegung der Intensitätssignale in 4096 Stufen ermöglicht.

Die kühlwasserunterstützte Peltierkühlung des CCD-Chips ermöglicht die Temperierung auf minimal -11° , um das thermische Rauschen und den Dunkelstrom zu reduzieren.

Eine wichtige Größe für die Charakterisierung des Signals ist das Signal-Rausch-Verhältnis S/N , welches sich bei einer CCD-Kamera mit einem Bildverstärker als das Verhältnis von Fotoelektronen N_e zu den Rausch-Elektronen N_r darstellen läßt [114]:

$$\frac{S}{N} = \frac{N_e}{N_r}. \quad (4.3)$$

Die Zahl der Rausch-Elektronen ergibt sich aus der Standardabweichung, die die Fotoelektronen aufweisen.

Die Fotoelektronen entstehen an der Fotokathode des Bildverstärkers. Ihre Anzahl steht in Verbindung mit dem Strom der auf den Bildverstärker treffenden Photonen N_p [$s^{-1}m^{-2}$]:

$$N_e = N_p \cdot t \cdot A \cdot \eta \quad (4.4)$$

wobei A [m^2] die beleuchtete Bildverstärkerfläche, t die Belichtungszeit [s] und η die Quanteneffizienz der Bildverstärkerfotokathode bezeichnen.

Die Quellen für Rausch-Elektronen und die Bezeichnungen der entsprechenden Standardabweichungen sind:

- das Photonenrauschen n_p
- das CCD-Rauschen n_{ccd} und
- das Verstärkerrauschen n_v .

Dabei gilt, daß die Standardabweichung n_p der am Bildverstärker ausgelösten Fotoelektronen aufgrund einer Poisson-Statistik gleich der Quadratwurzel aus der Anzahl der Fotoelektronen ist $n_p = \sqrt{N_e}$, und auch „shot noise“ genannt [115] wird.

Das CCD-Rauschen sind Elektronen, die durch das Ausleserauschen, den Dunkelstrom und das „fixed-pattern noise“ erzeugt werden. Ihre Verteilung wird durch die Angabe der Standardabweichung n_{ccd} gekennzeichnet.

Das Verstärkerrauschen wird durch Elektronen im Verstärker der CCD-Kamera und der AD-Karte im PC verursacht. Dieses Rauschen wird durch die Standardabweichung n_v beschrieben.

Alle drei Rauschquellen sind nicht korreliert und tragen gleichermaßen zum Rauschen bei, so daß sich als Standardabweichung des Rauschens folgender Ausdruck ergibt:

$$N_r = \sqrt{(\sqrt{N_p \cdot t \cdot A \cdot \eta})^2 + n_{ccd}^2 + n_v^2} \quad (4.5)$$

Die Gleichungen 4.5 und 4.4 können in Gleichung 4.3 eingesetzt werden. Für den Fall eines großen Signals

$$(\sqrt{N_p \cdot t \cdot A \cdot \eta})^2 \gg n_{CCD}^2 + n_v^2$$

dominiert das Photonenrauschen. Vereinfacht gilt dann, daß das Signal-Rausch-Verhältnis ungefähr der Wurzel aus der Anzahl der Foto-Elektronen ist:

$$\frac{S}{N} \approx \sqrt{N_e}. \quad (4.6)$$

Für den Fall eines schwachen Signals

$$(\sqrt{N_p \cdot t \cdot A \cdot \eta})^2 \ll n_{CCD}^2 + n_v^2$$

dominieren das CCD-Rauschen und das Verstärkerrauschen:

$$\frac{S}{N} \approx \frac{N_e}{\sqrt{n_{CCD}^2 + n_v^2}} \quad (4.7)$$

Eine Vergrößerung des Signal-Rausch-Verhältnisses kann durch eine Minimierung des Ausleserausens und die Maximierung des Signals, durch z.B. eine effizientere Abbildungsoptik, erreicht werden.

Die verwendete Kamera konnte in verschiedenen Binning-Modi betrieben werden. Dabei werden vor dem Auslesen des CCD-Chips mehrere Pixelinhalte zu einem Wert zusammengefaßt.

Die Anzahl der zusammenzufassenden Pixel war variabel und konnte mit den voneinander unabhängigen, horizontalen und vertikalen Werten 2,4,8 und 16 vorgegeben werden. Das Produkt der horizontal und vertikal zusammengefaßten Pixel wird im folgenden als Binning-Faktor b bezeichnet.

Durch das Zusammenfassen von Pixelinhalten wird je nach der Größe des Binning-Faktors

- die Auslesezeit verkürzt,
- die ausgelesene Bildgröße verkleinert,
- die räumliche Information des CCD-Chips verdichtet und
- der relative Anteil des Ausleserausens im Signal verringert.

Die in dieser Arbeit gemessenen Fluoreszenzspektren sind kontinuierlich und zeigen keine Struktur mit dicht benachbarten Linien, so daß durch das Zusammenfassen von Pixelinhalten in der Horizontalen, die eine spektrale Zerlegung widerspiegelt, keine relevante Information verloren geht. Ebenso kann die räumliche Information in der Vertikalen durch Binning verdichtet werden, ohne auf Information verzichten zu müssen.

Das Auslesen der vollen Bildgröße dauert 0,71s und kann durch das Binning $4 \cdot 8$ um den Faktor 32 auf 0,022s verkürzt werden. Während der Zeitspanne von 60s ist es dann möglich, eine Folge von 48 Bildern auszulesen, die jeweils eine Belichtungszeit von 1s haben.

Diese Belichtungszeit ergab sich durch die Migrationszeiten der Proben durch das Detektionsvolumen. Mit elektrischen Feldstärken $E = 500V/cm$ und typischen Mobilitätswerten $\mu = 2 \cdot 10^{-4}cm^2/(V \cdot s)$ (vgl. Seite 16) ergeben sich Migrationsgeschwindigkeiten in der Größenordnung $v = 1mm/s$.

Für das Durchlaufen eines 3mm langen Teilstückes der Kapillare wurde unter Berücksichtigung der konkurrierenden Größen Fluoreszenzsignalsummation, räumliche Auflösung und Dunkelbildrauschen eine Belichtungszeit der Kamera von 1s gewählt. Während dieser Zeit wird die CCD-Kamera 10 mal für die Dauer von 600ns vom Bildverstärker belichtet.

Mit dem Zusammenfassen von Pixelinhalten steigt der absolute Wert des Dunkelbilderausens und auch der des Signals an. Der Binning-Faktor b und die Varianz σ des Rauschens auf dem CCD-Chip sind multiplikativ miteinander verknüpft. Die Varianz des Rauschens σ_b bestimmt sich bei Betrieb in einem Binning-Modus b zu $\sigma_b = b \cdot \sigma$. Das Binning vergrößert somit die Standardabweichung um den Faktor \sqrt{b} , wenn keine anderen Rauschquellen berücksichtigt werden.

Das Signal/Rausch-Verhältnis kann unter Vernachlässigung anderer Rauschquellen als dem Photonen- und dem Ausleserausens durch folgenden Ausdruck angegeben werden [116]:

$$S/N = Z \cdot S / (Z \cdot S + Z \cdot \sigma)^{1/2} \quad (4.8)$$

in dem Z die Anzahl der übertragenen Signale (durch das Binning zusammengefaßte Pixelinhalte), S der durchschnittliche Wert eines Pixelsignals auf dem CCD-Chip und σ die Varianz des Ausleserausens bezeichnen.

Durch ein Binning wird die Zahl der übertragenen Signale Z verringert und bei gleichbleibendem Signal auf dem CCD-Chip das durchschnittliche Pixelsignal S erhöht. Der Gleichung 4.8 folgend, vergrößert sich dann das Signal/Rausch-Verhältnis.

Die in dieser Arbeit angegebene Einheit counts/Pixel bezieht sich auf die Größe des ausgelesenen Bildes im jeweiligen Binning-Modus und nicht auf die Pixel des CCD-Kamerachips. Die Angabe von z.B. 32counts/Pixel im Binning-

Modus 4 · 8 entspricht aufgrund verschiedener Einflüsse des Rauschens nicht der Angabe 1count/Pixel auf dem CCD-Kamerachip.

Die Kamera-Eichung:

Eine Eichung der CCD-Kamera ist erforderlich, um die in counts gemessene (relative) Intensität der Kamerabilder als (absolute) Zahl der Fotoelektronen angeben zu können.

Dafür wird die abgeschwächte Strahlung eines He/Ne-Lasers direkt auf die Fotokathode gelenkt. Aus der konstanten Leistung des Lasers und einer definierten Öffnungszeit der Fotokathode kann die Zahl der auf die Kathode treffenden Photonen berechnet werden. Mit Hilfe der Quanteneffizienz der Fotokathode, vgl. Abbildung 4.9, kann das Verhältnis zwischen counts und Fotoelektronen ermittelt werden. Dieses Verhältnis wird maßgeblich durch die Verstärkungsfaktoren des Bildverstärkers und des AD-Wandlers im PC bestimmt. Mit den für die Messungen zu dieser Arbeit einheitlichen Spannungen am Bildverstärker ergibt sich die Beziehung: 1count $\hat{=}$ 1.1 Fotoelektronen.

4.3.1 Das Dunkelbildrauschen

Das Bild eines unbelichteten ICCD-Chips enthält keine Information über ein detektiertes Signal. Statt dessen sind darin Information über das „dark-pattern-noise“ und das „thermische Rauschen“ verfügbar, die einen Untergrund erzeugen, auf dem ein Signal detektiert wird.

In diesen Messungen ist das „thermische Rauschen“ von besonderer Bedeutung, da der CCD-Chip über den Zeitraum von 1 Sekunde nicht ausgelesen wird und zur Belichtung freigegeben ist. Dabei sammeln sich Ladungsträger auf dem CCD-Chip, die nicht zum Signal gehören und zu einer bedeutenden Rauschquelle werden.

Das Dunkelbildrauschen wird durch die Standardabweichung $\sqrt{\sigma}$ der Pixelinhalte in einem beliebigen Rechteck des unbelichteten CCD-Bildes ermittelt, das durch Subtraktion zweier aufeinanderfolgender Bilder entsteht. Das Ausleserauschen der Elektronik in der Kamera und folgender Komponenten, wie z.B. der AD-Wandler sind in diesen Standardabweichungen enthalten.

Eine Reduktion dieses Rauschens ist durch eine Kühlung des CCD-Chips zu erreichen.

Neben der Temperatur hat auch der Binning-Faktor einen Einfluß auf das Rauschen. Ohne den Einfluß des Ausleserauschens skaliert die Standardabweichung mit der Quadratwurzel des Binning-Faktors b : $\sqrt{\sigma_b} \leftarrow \sqrt{b \cdot \sigma}$.

Die Werte des Dunkelbildrauschens sind für verschiedene Temperaturen und Binning-Modi in Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

Temperatur	Binning-Modus	
	1 · 1	4 · 8
−8° C	4.68	5.2
−9° C	2.2	2.6
−10° C	1.78	1.98

Tabelle 4.1: *Dunkelbildrauschen [Fotoelektronen] bei verschiedenen Temperaturen und Binning-Modi.*

Der Tabelle 4.1 ist zu entnehmen, daß eine verstärkte Kühlung das Dunkelbildrauschen reduziert und der Temperatursprung von −8°C auf −10°C eine Reduzierung des rms-Wertes⁶ von 4.68 um mehr als die Hälfte auf 1,78 bewirkt.

Der rms-Wert im Binning-Modus 4 · 8 ist bei vergleichbaren Temperaturen erwartungsgemäß höher, weicht aber mit dem Werte 1.98 bei Kühlung auf −10°C nur geringfügig vom Wert 1.78 im Binning-Modus 1 · 1 ab und deutet auf einen überwiegenden Einfluß des Ausleserauschens hin.

Für eine Reduktion des Dunkelbildrauschens wurde die Kamera immer auf die minimal mögliche Temperatur von ca. −10°C gekühlt.

⁶ root mean square

4.3.2 Linearität des Detektors

Damit Signale unterschiedlicher Intensität miteinander vergleichbar sind, muß der Detektor (ICCD-Kamera) eine Variation der Signalstärke linear aufzeichnen.

Eine Überprüfung dieses Verhaltens wurde mit einem HeNe-Laser durchgeführt. Um seine konstante Ausgangsleistung direkt auf die Photokathode des Bildverstärkers lenken zu können, wurde die Intensität durch Filter abgeschwächt. Die anschließende Variation der Signalstärke wurde durch geänderte Öffnungszeiten des Bildverstärkers realisiert und über den gesamten Wandlungsbereich des AD-Wandlers verändert, vgl. Abbildung 4.10.

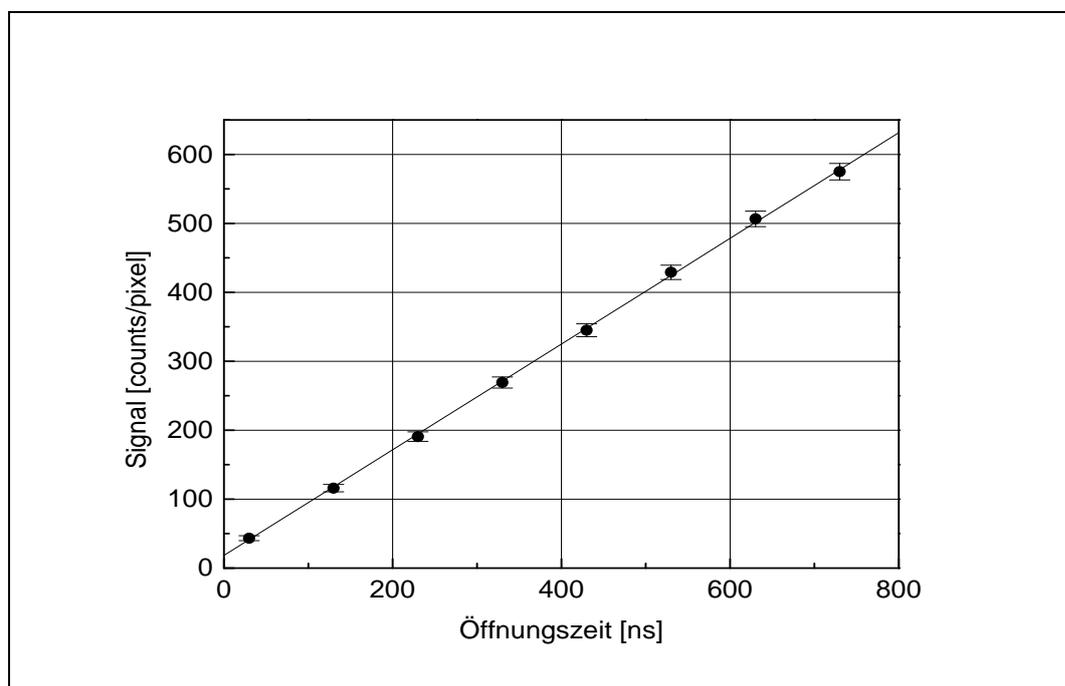


Abbildung 4.10: *Linearität des Signals bei Variation der Belichtungszeit.*

Zusätzlich ist in der Abbildung die Ausgleichsgerade eingezeichnet, deren Steigung sich aus dem Verstärkungsfaktor des Bildverstärkers ergibt.

Das Signal ist im gesamten Intensitätsbereich linear, und es treten bei hohen Intensitäten keine Sättigungseffekte auf. Die aufgetragenen Signalwerte bis 600 counts/Pixel sind aufgrund der Mittelung über einen Pixelbereich unterschiedlicher Intensität geringer als die zulässige Maximalintensität.

4.4 Die Abbildungsoptiken

Der Einsatz von intensiver Laserstrahlung und besonders die von gepulsten Systemen erfordert bei der Detektion eines Fluoreszenzsignals im Gegensatz zu leistungsschwächeren Lichtquellen eine drastische Reduktion des starken Rayleigh-Signals und des Streulichts von der Kapillaroberfläche. Die Effekte Rayleigh-, Mie- und Oberflächenstreuung führen zu einer Strahlung bei der Anregungswellenlänge [117] und müssen spektral von der Fluoreszenz getrennt werden, wenn eine zeitliche oder auf Polarisation basierende Diskriminierung nicht möglich ist. Andernfalls kann das Untergrundrauschen ansteigen, und das S/R-Verhältnis vermindert sich.

Dafür wurde eine Vielfalt von „on-column und „post-column Detektoren entwickelt, die verschiedenste Geometrien und Methoden für die Lichteinkopplung und Fluoreszenzdetektion verwenden [118]. Hier seien nur die Verwendung von Lichtleitern zur Bestrahlung der Kapillare und Detektion der Fluoreszenz [119], der Einsatz einer „sheath-flow Küvette [120], die Fluoreszenzabbildung mit Hilfe eines Mikroskops als räumlicher Filter [49, 121], die Bestrahlung der Proben durch ein Loch in der Kapillarwand [53] und die Einkoppelung des Laserlichtes mit Hilfe einer Glasfaser am Ende der Kapillare [78] genannt.

Im folgenden werden die apparativen Aufbauten bezüglich der Abbildungsoptiken vorgestellt, die eine Minimierung oben aufgezählter Streuprozesse durch die Verwendung einer Vergrößerungsoptik, von dielektrischen Filtern, Kantenfiltern und/oder eines Spektrometers erzielen. Dabei wurde die Kombination aus CCD-Kamera und Bildverstärker in zwei verschiedenen Versuchsanordnungen verwendet, die sich durch den Einsatz eines Spektrometers und der dazugehörigen Abbildungsoptik unterscheiden.

Messungen ohne Spektrometer:

Bei diesen CZE-Messungen wurde kein Spektrometer verwendet und die Fluoreszenz der Substanzen in der Kapillare als integrales Meßsignal detektiert. Eine spektrale Differenzierung und Identifizierung von verschiedenen Teilchen ist bei der Verwendung nur eines Kantenfilters nicht möglich und war für diese Messungen nicht notwendig.

Die Abbildung wurde in dieser Anordnung mit einem Kameraobjektiv realisiert, und die Abbildung 4.11 verdeutlicht folgende Ausführungen:

Als Lichtquelle wurde das erste OPO-Lasersystem verwendet. Die Strahlung im Bereich zwischen 240nm und 480nm wurde mit einer Linse (50mm Brennweite) auf einen 2mm langen Bereich der Kapillare gerichtet. Der Brennpunkt lag hinter der Kapillare, um eine Zerstörung dieser durch die hohen Leistungsdichten zu vermeiden. Das ausgeleuchtete Detektionsvolumen wurde über ein Kameraobjektiv (Canon, 50mm Brennweite, $f=1,2$) mit einer Vergrößerung

von 1:20 direkt auf den Bildverstärker abgebildet. Das nicht aus Quarzglas hergestellte Objektiv wirkt in dieser Anordnung auch als UV-Filter, und eine weitere Selektion des LIF-Signals erfolgte durch den Einsatz eines Kantenfilters (OG530) [122], welcher direkt vor dem Bildverstärker positioniert wurde.

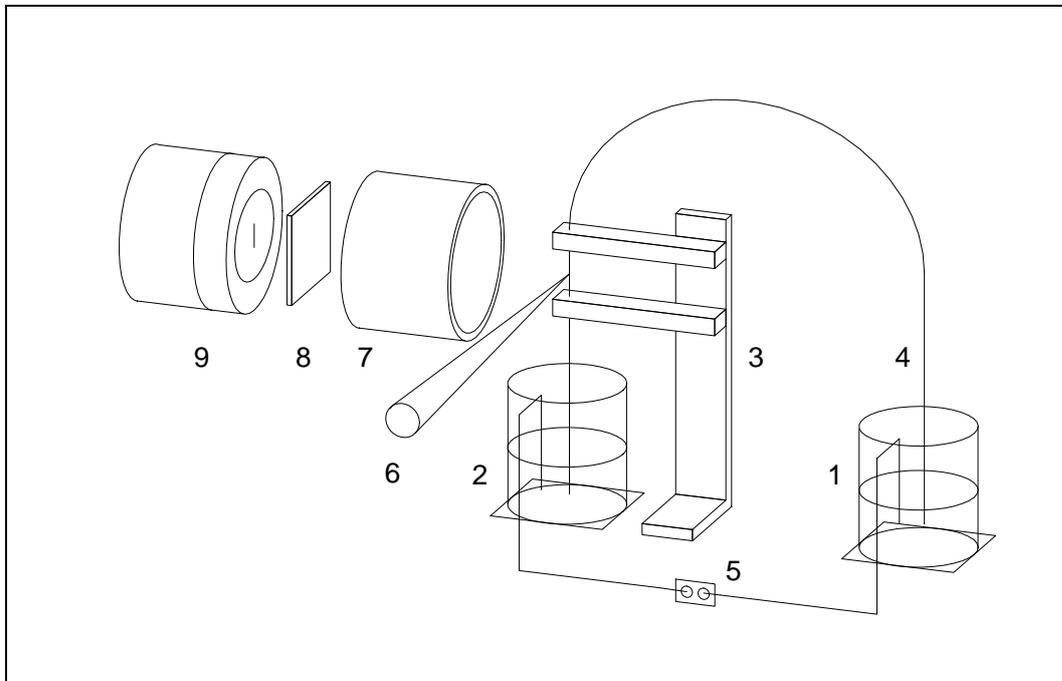


Abbildung 4.11: Schematischer Aufbau der Abbildungsoptik zur Fluoreszenzdetektion ohne Spektrometer unter Verwendung eines Objektivs. 1), 2) Reservoir, 3) Kapillarhalterung, 4) Kapillare, 5) HV-Spannungsquelle, 6) Laserstrahl, 7) Kameraobjektiv, 8) Kantenfilter, 9) CCD-Kamera.

Dieser Aufbau ermöglicht in einfacher Weise den Nachweis von Teilchen, deren Fluoreszenz im sichtbaren Bereich des Wellenlängenspektrums liegt und bei denen somit eine Trennung zwischen einer UV-Anregungswellenlänge und der anschließenden Fluoreszenzemission unproblematisch ist.

Messungen mit Spektrometer:

Diese CZE-Messungen wurden mit einem Spektrometer durchgeführt, um im Vergleich zu Kanten- oder Interferenzfiltern die Möglichkeit einer spektralen Identifizierung der Arzneistoffe zu vergrößern. Neben der zeitlichen Information der CZE kann diese spektrale Charakterisierung für eine Interpretation der CZE-Messung herangezogen werden. Der apparative Aufbau ist in der Abbildung 4.12 skizziert:

Die Strahlung aus dem Farbstofflaser wurde von einer rechteckigen Blende (3mm Höhe, 1mm Breite) begrenzt über eine Zylinderlinse ($f_{270nm} = 7.4mm$, $f_{212nm} = 6.7mm$, 10mm Höhe) auf die Kapillare gelenkt.

Durch die Ausrichtung der Zylinderlinse mit der ebenen Seite zur Kapillare wurden die Abbildungsfehler minimiert und eine homogene Ausleuchtung der Kapillare erzielt. Damit wurde eine Blasenbildung durch das Verdampfen des Puffers vermieden, die zu dem Abbruch einer CZE-Messung führt.

Über einen aluminiumbedampften und wellenlängenneutral abbildenden Hohlspiegel ($\emptyset = 5\text{cm}$, $f_{\#} = 1.1$) wurde das Detektionsvolumen, ein 3mm langer Bereich der Kapillare, um den Faktor vier vergrößert, auf den Eintrittsspalt des Spektrometers abgebildet. Eine Anpassung der Spaltbreite (ca. $200\mu\text{m}$, sofern nicht anders angegeben) auf das Abbild des Detektionsvolumens in der Kapillare ermöglichte eine Streulichtunterdrückung.

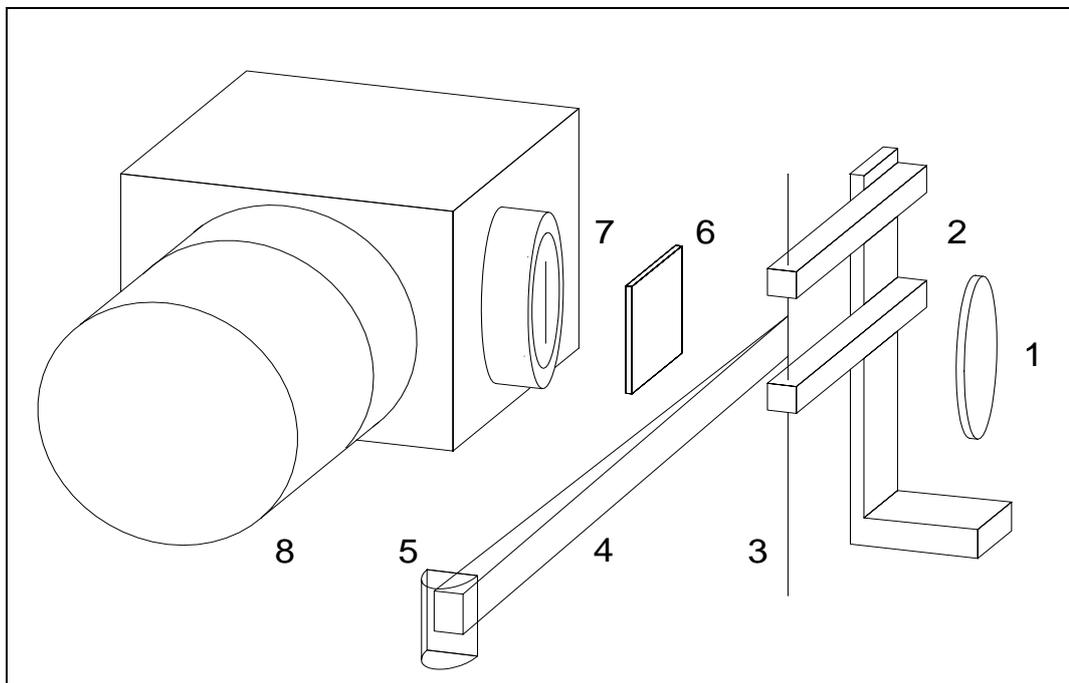


Abbildung 4.12: Schematischer Aufbau der Abbildungsoptik zur Fluoreszenzdetektion mit Spektrometer: 1) Hohlspiegel, 2) Kapillarhalterung, 3) Kapillare, 4) Laserstrahl, 5) Zylinderlinse, 6) optischer Filter, 7) Spektrometer, 8) ICCD-Kamera.

Dabei wurden die Abstände zwischen dem Spektrometer, der Kapillare und dem Hohlspiegel so gewählt, daß eine an die f -Zahl des Spektrometers angepaßte Abbildung erfolgte.

Das LIF-Signal wurde mit Hilfe eines Spektrometers (Firma Oriol, Multispec 77417) analysiert, an das die Einheit aus Bildverstärker und CCD-Kamera angeschlossen war. Der Betrieb des Spektrometers erfolgte ohne Austrittsspalt,

so daß die gesamte Eingangsfläche des Bildverstärkers für die Signaldetektion genutzt werden konnte.

Somit wird am Ausgang des Spektrometers ein Abbild erzeugt, welches parallel zum Spalt eine räumliche und senkrecht dazu eine spektrale Auflösung besitzt. Diese zweidimensionale Information wird von der Kamera aufgenommen und kann in einem PC verarbeitet werden.

Für spektral aufgelöste Messungen mit der kontinuierlich variierenden Strahlung der OPO-Lasersysteme wurde dieser Aufbau modifiziert, indem die Kapillare am Detektionsort durch eine Küvette ersetzt und die Laserstrahlung hindurch geleitet wurde (sofern nicht anders angegeben).

Die Spektrometergitter:

In dem Spektrometer wurden zwei verschiedene Gitter eingesetzt. Das erste Gitter hat eine Strichdichte von 400 Linien/mm und besitzt eine Blazewellenlänge bei 500nm, bei der die Reflektivität ca.80% beträgt. Die Effizienz dieses Gitters ist bei 250nm mit nur noch 2% angegeben, während bei 600nm noch 69% Effizienz erreicht werden, vgl. Kurve a) in Abbildung 4.13.

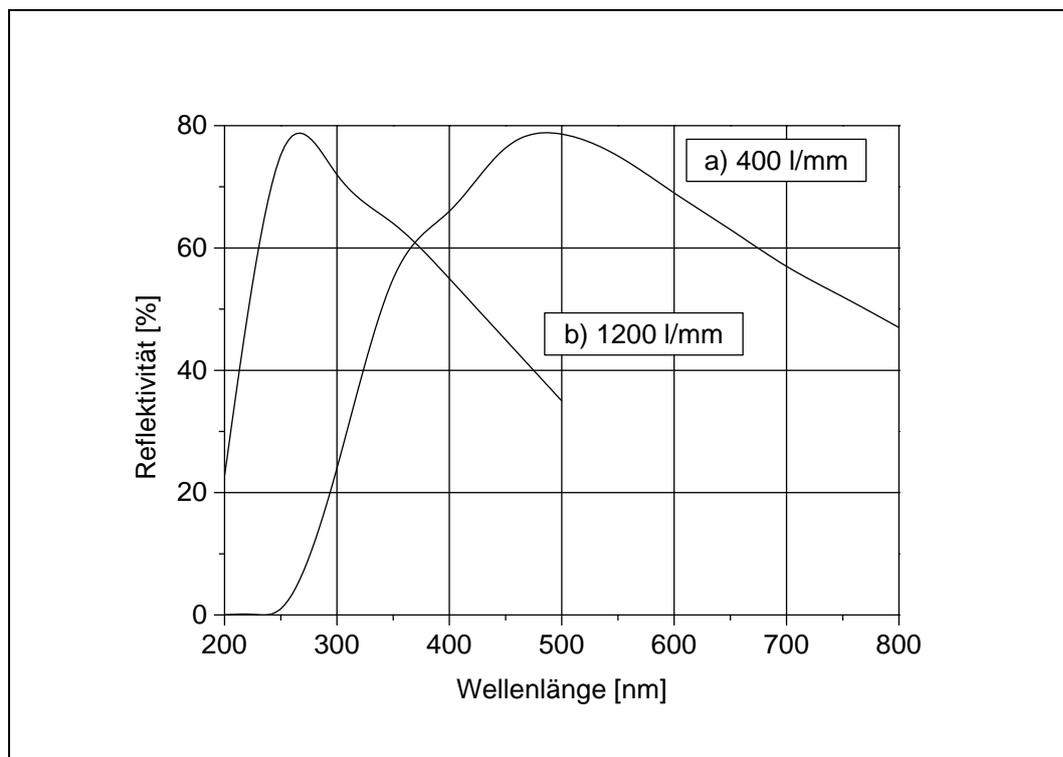


Abbildung 4.13: Effizienzkurven der Spektrometergitter: a) 400 l/mm, Blazewellenlänge 500nm, b) 1200 l/mm, Blazewellenlänge 250nm [123].

In Kombination mit der flächigen Detektionseinheit am Spektrometerausgang entsteht ein beobachtbarer Bereich von ca. 330nm, der für die CZE-Messungen der Urin-Proben und die Anregungs-/Emissionsspektren (Kapitel 7) gewählt wurde, um einen möglichst großen Wellenlängenbereich detektieren zu können. Das zweite Gitter hat 1200 Linien/mm und eine Blazewellenlänge bei 250nm, welches für die CZE-Messungen einzelner Substanzen eingesetzt wurde und mit einem Sichtbereich von ca. 110nm die Fluoreszenz vollständig erfaßte. Die Reflektivität dieses Gitters beträgt bei 200nm noch 24%, steigt bis auf 80% bei 255nm und fällt dann bis auf 30% bei 530nm ab.

Eine zusammenfassende Darstellung der Gittereffizienz (400l/mm) und der Fotokathode ist in Abbildung 4.14 gezeigt (linke Skala). Zusätzlich ist die Gesamteffizienz bestimmt worden (rechte Skala), in die die Reflektivität der beiden aluminiumbedampften Spiegel im Spektrometer eingehen.

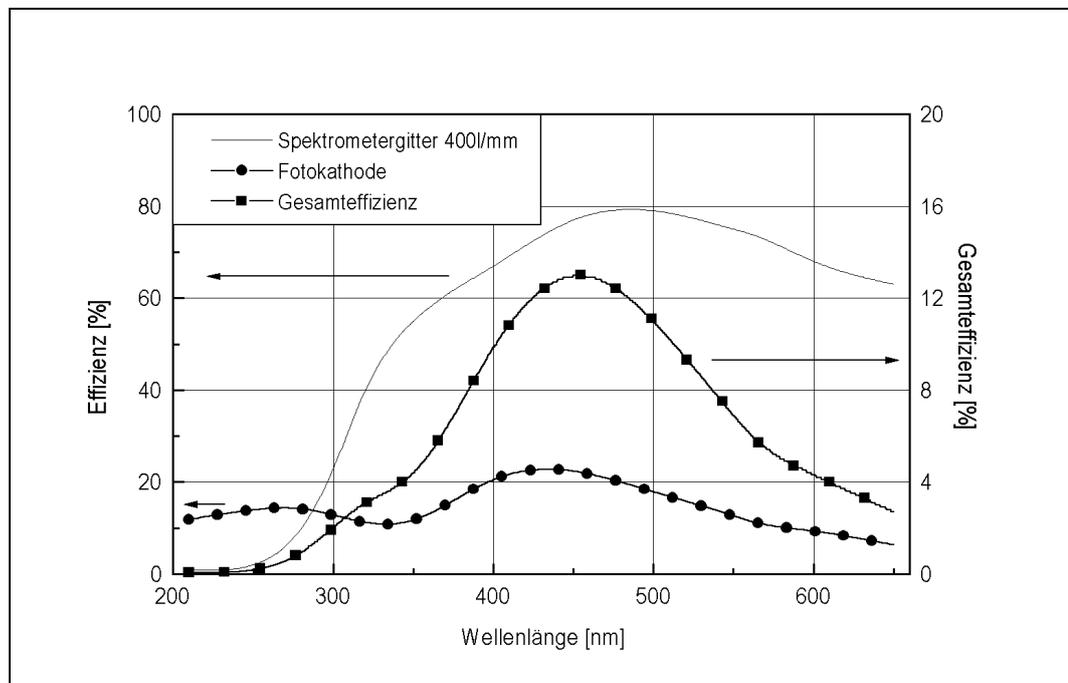


Abbildung 4.14: Effizienzkurven des Spektrometergitters 400 l/mm, der Fotokathode (linke Skala) und der um den Faktor 5 vergrößert dargestellten, resultierenden Gesamteffizienz (rechts Seite).

Experimentell wurde diese Effizienz durch den Vergleich eines gemessenen Spektrums mit einem normierten Spektrum bestimmt. Dafür wurde das Licht einer Deuteriumlampe auf das Spektrometer abgebildet, von diesem spektral zerlegt und von der CCD-Kamera aufgezeichnet. Ein Vergleich mit den Herstellerangaben über das kontinuierliche Spektrum der Lampe liefert für beide Spektrometergitter die notwendigen Effizienzkurven, mit denen alle in dieser Arbeit aufgeführten Spektren korrigiert worden sind.

Kapitel 5

Experimentelles

Nachdem der apparative Aufbau in den vorherigen Kapiteln beschrieben worden ist, folgt hier die Charakterisierung einzelner Komponenten an Hand von vorbereitenden Messungen.

5.1 Optische Filter

In dieser Arbeit wurde eine „on-column“ Detektion eingesetzt und die Minimierung des Streu- und Rayleighlichtes mit Hilfe von Kantenfiltern, dielektrischen Spiegeln und einem Spektrometer realisiert.

Eine zeitliche Trennung der Fluoreszenz von dem Streu- und Rayleighlicht war nicht möglich, da der Laserpuls eine Dauer von 7ns aufweist und die Halbwertsbreite des Fluoreszenzsignals von z.B. Tramadol-HCl in 50mM Boraxpuffer pH=10.65 mit einem ps-Lasersystem zu 2.3ns bestimmt worden ist [124]. Die Fluoreszenzhalbwertbreiten von Aromaten in Flüssigkeiten werden oftmals in dieser Größenordnung gemessen [125].

Bei der Anregungswellenlänge 212nm können die CZE-Messungen mit einem Spektrometer ohne die Verwendung eines abschwächenden Filters für 213nm durchgeführt werden. Die räumliche Auflösung des abbildenden Spiegels erfaßt den Innenbereich der Kapillare, und das Spektrometer unterdrückt das einfallende Rayleighlicht hinreichend gut, da die Anregungswellenlänge und die Fluoreszenz (beginnend bei ca. 270nm) weit voneinander entfernt sind. Das setzt konstante Temperaturverhältnisse voraus, die eine Variation des Strahlengangs ausschließen. Andernfalls führt eine Dejustage der strahlführenden Elemente zu einem Anstieg des in das Spektrometer fallende Streulicht von der Kapillaroberfläche. In diesem relativ kleinen Spektrometer können die dann erhöhten Intensitäten nicht hinreichend unterdrückt werden, so daß ein unregelmäßiger und mit der Intensität des Signals vergleichbarer Untergrund auf dem CCD-Chip hervorrufen wurde.

Deshalb wurde bei dieser Anregungswellenlänge immer ein dielektrischer 213nm-45°-Spiegel vor dem Eintrittsspalt des Spektrometers positioniert, dessen Transmission bei 212nm weniger als 1% beträgt, vgl. Abbildung 5.1, um damit das Rayleighsignal und abgebildetes Streulicht bei 212nm zu unterdrücken .

Weiterhin wurde eine Kombination aus einem Kantenfilter WG280 mit 1mm Schichtdicke und einer Borsilikatscheibe (1mm Schichtdicke) verwendet, die bei langwelligen Fluoreszenzen ($\lambda > 350\text{nm}$) Verwendung findet. Die Transmission dieser Kombination liegt für Wellenlängen unter 280nm bei weniger als 0.1%. Die Transmissionscharakteristiken sind in Abbildung 5.1 dargestellt.

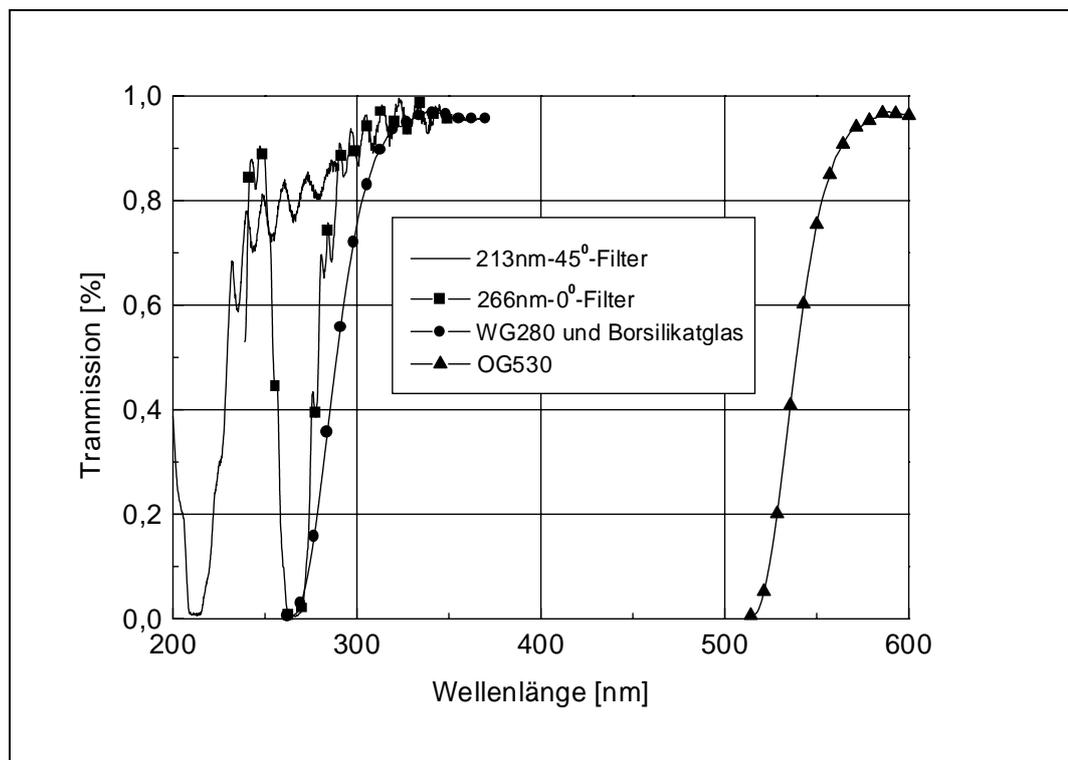


Abbildung 5.1: *Transmissionskurven optischer Filter.*

Bei CZE-Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 270nm wurde die bei 290nm auftretende Fluoreszenz von der Intensität des Streulichtes überdeckt. Das Spektrometer kann diese Intensitäten nicht hinreichend diskriminieren, so daß ein Betrieb ohne Abschwächer nicht möglich war. Als abschwächender Filter wurde ein dielektrischer 266nm-0°-Spiegel verwendet, der eine Transmission von weniger als 1% bei 270nm aufweist. Die Transmissionskurve des Spiegels ist ebenfalls in Abbildung 5.1 wiedergegeben.

Für Fluoreszenzmessungen im sichtbaren Spektralbereich wurde die Anregungswellenlänge bei 488nm durch einen Kantenfilter OG530 unterdrückt, dessen Transmissionskurve in Abbildung 5.1 dargestellt ist.

Eine weitere Möglichkeit der Signalunterdrückung bietet sich im Fall des Rayleighsignals, dessen Polarisations Ebene parallel zu der des anregenden Laserlichtes ist und relativ zum Spektrometerspalt ausgerichtet werden kann. Das Rayleigh-Signal und das Fluoreszenzlicht von N-Desmethyltramadol (in Wasser gelöst) in einer Küvette sind für zwei verschiedene Polarisations Ebenen \vec{E} des Farbstofflasers bei der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 270nm$ in Abbildung 5.2 dargestellt.

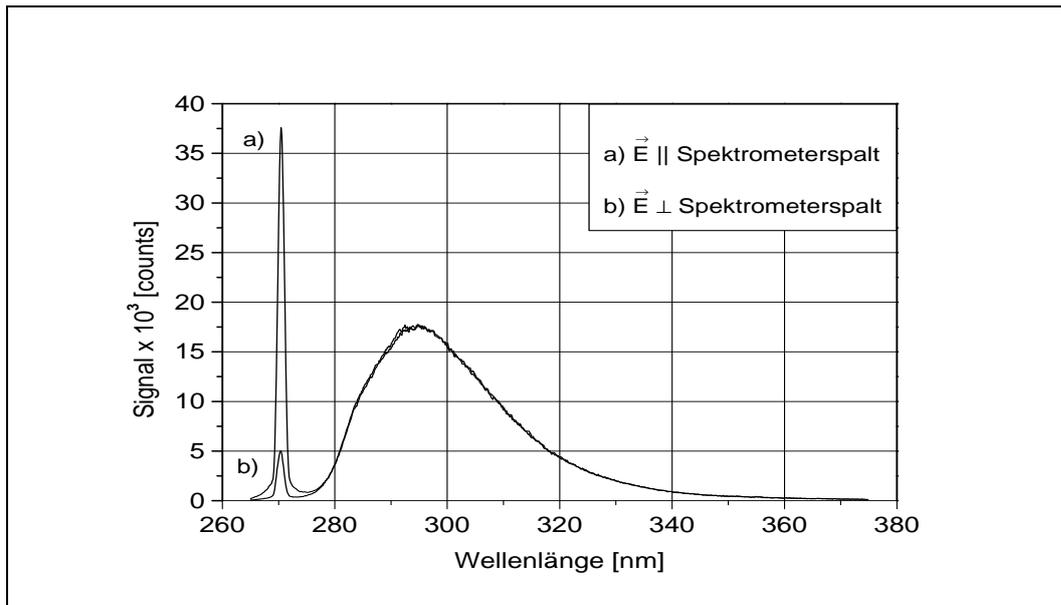


Abbildung 5.2: Reduktion des Rayleighsignals durch verschiedene Polarisations Ebenen des einfallenden Laserlichtes am Beispiel von N-Des-Tramadol. a) Polarisations Ebene parallel, b) Polarisations Ebene senkrecht zum Spektrometerspalt.

Die Kurve a) ist mit einer zum Spektrometerspalt parallelen Polarisations Ebene und die Kurve b) ist mit der dazu senkrechten Polarisations Ebene gemessen worden. Durch die Drehung der Polarisations Ebene des auf die Küvette fallenden Lichtes mit einem Fresnel-Rhombus konnte eine Signalreduzierung des Rayleigh-Lichtes mit diesem apparativen Aufbau um den Faktor 8 erreicht werden. Das Restsignal ist auf unpolarisiertes Streulicht, depolarisiertes Rayleighlicht und den großen Öffnungswinkel des Hohlspiegels zurückzuführen. Das Fluoreszenzsignal ist für beide Polarisationsrichtungen gleich und weist auf eine unpolarisierte Fluoreszenz in Flüssigkeiten hin.

Von der Drehung der Polarisations Ebene ist auch das Wasser-Raman-Signal betroffen, dessen Polarisations Ebene ebenfalls parallel zur der anregenden Laserstrahlung ist. Das Ramansignal ist in Abbildung 5.2 nicht sichtbar, wird aber durch die parallele Ausrichtung von Spektrometerspalt und Laserpolarisations Ebene nicht verstärkt.

5.2 Das Wasser-Raman-Signal

Der Raman-Effekt basiert auf einer sich zeitlich verändernden Polarisierbarkeit der Moleküle durch Dreh- und Streckbewegungen der Atome und kann in Vibrations-Raman- und Rotations-Raman-Streuung unterteilt werden. Eine ausführliche, mathematische Darstellung findet sich zum Beispiel in [126].

Die Raman-Streuung kann als Spektrum gemessen werden, in dem die energetische Verschiebung bezüglich der Anregungswellenlänge aufgetragen und in Abbildung 5.3 für den Fall von flüssigem Wasser dargestellt ist [45].

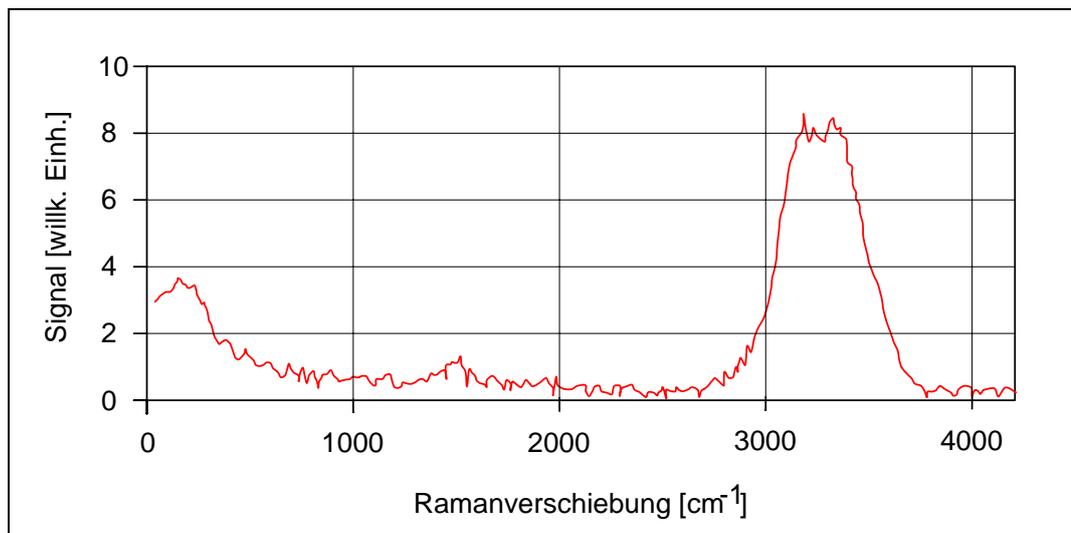


Abbildung 5.3: *Raman-Spektrum von flüssigem Wasser [45].*

Der Raman-Effekt äußert sich hauptsächlich in einer spektralen Linie, die gegenüber der Anregungswellenlänge eine konstante Verschiebung von 3200cm^{-1} bis 3400cm^{-1} aufweist und auf eine OH-Streckschwingung zurückzuführen ist.

Die Intensitätsabhängigkeit des Ramansignals von der vierten Potenz der anregenden Frequenz hat zur Folge, daß zum Beispiel dieses Signal bei einer Anregung mit 270nm um den Faktor 16 größer ist als bei einer Anregung mit der 540nm. Zusätzlich ist das Ramansignal direkt proportional zur Intensität der anregenden Strahlung, die bei gepulst betriebenen Lasern höher als bei kontinuierlich betriebenen Lasern ist.

Somit ist die Raman-Streuung bei der Verwendung von UV-Licht von Bedeutung, wenn die Fluoreszenz und das Ramansignal sich spektral überlappen. In diesem Fall kann eine spektrale Filterung eine Trennung beider Signale herbeiführen, wenn die Fluoreszenz im Gegensatz zum Ramansignal sich über einen größeren spektralen Bereich erstreckt.

Das Ramansignal tritt wie das Rayleighsignal zeitgleich mit der Anregung auf und kann von einer dazu zeitlich verzögerten Fluoreszenz mit hinreichend kurzen Laserpulsen und schnellen Detektoren getrennt werden.

Bei den Anregungswellenlängen 270nm und 212nm sind die entsprechenden Ramansignale bei der Wellenlänge 296nm bzw. 227nm zu detektieren. Letztere war jedoch außerhalb des von der ICCD-Kamera detektierten Spektralbereiches. Die Abbildung 5.4 zeigt das Profil eines Kamerabildes mit dem Ramansignal bei 296nm einer wässrigen Lösung (KH_2PO_4 -Puffer) und paralleler Ausrichtung von Spektrometerspalt und Laserpolarisationsebene.

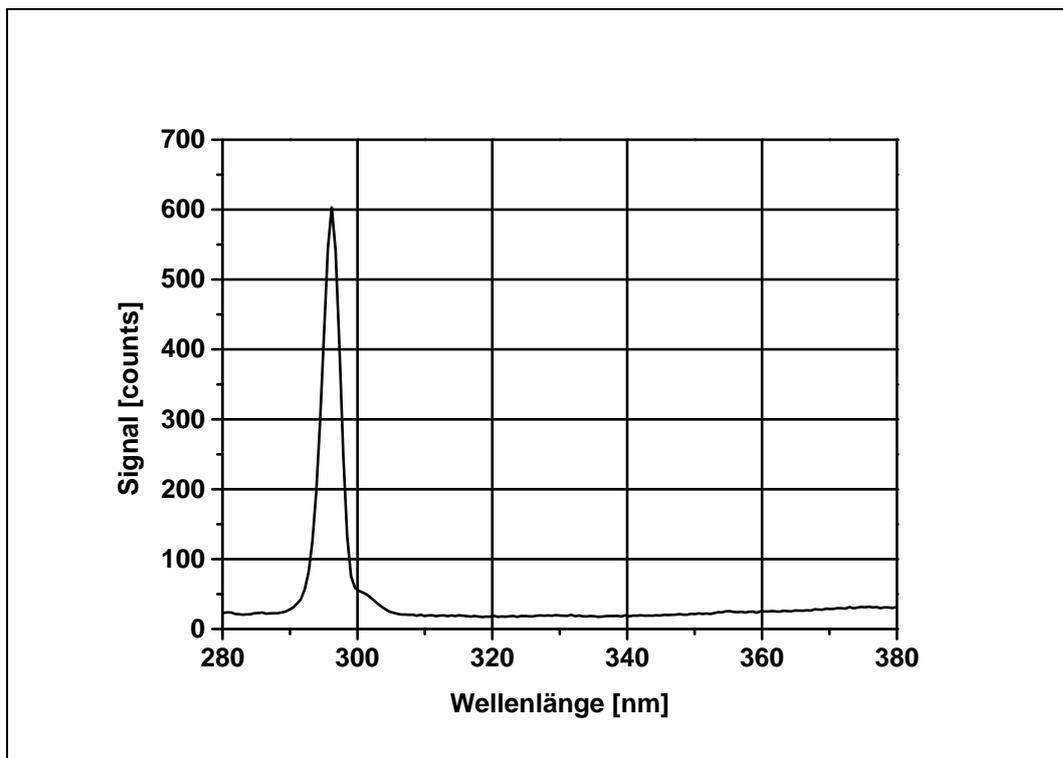


Abbildung 5.4: *Spektrum einer wässrigen Lösung (50mM KH_2PO_4 -Puffer) mit Wasser-Ramansignal (Kapillare), $\lambda_{ex} = 270nm$.*

Das Ramansignal ist nicht vollständig unterdrückt. Dieses Restsignal ist auf depolarisierende Effekte und den großen Öffnungswinkel des abbildenden Hohlspiegels zurückzuführen.

Substanzen wie zum Beispiel Tramadol und die Metaboliten weisen eine Fluoreszenz auf, die ein Maximum bei ca. 300nm haben. In diesen Fällen ist bei der Anregungswellenlänge 270nm eine spektrale Trennung der Signale vorzunehmen und nicht das gesamte Fluoreszenzsignal auszuwerten. Bei der Wel-

Wellenlänge 212nm ist das Ramansignal hinreichend gut von der Fluoreszenz getrennt und durch den dielektrischen Spiegel und das Spektrometer diskriminiert.

Eine Separation des Fluoreszenzmaximums bei 300nm von dem Ramansignal kann durch eine Änderung der Anregungswellenlänge erfolgen. Eine Verschiebung des Ramansignals auf zum Beispiel 285nm erfordert eine Anregungswellenlänge von 260.5nm und kann den Rückgang der Fluoreszenzintensität nach sich ziehen. Diese Möglichkeit wurde bei der Anregung mit der Wellenlänge 270nm in dieser Arbeit nicht verfolgt, sondern die spektrale Trennung bevorzugt.

5.3 Die Quarzkapillare

Kapillaren für die CE werden aus verschiedensten Materialien gefertigt [102] und haben spezifische Eigenschaften.

Für die Fluoreszenzanregung mit Wellenlängen im tiefen UV-Bereich ($\lambda_{ex} < 300nm$) sind nur Quarzkapillaren (fused silica) geeignet, weil sie mit einer Transmission $T > 95\%$ für Wellenlängen $\lambda > 200nm$ die Voraussetzung erfüllen, einen LIF-Nachweis in diesem Wellenlängenbereich durchführen zu können¹.

Dazu ist es notwendig, die Polyamidbeschichtung der Kapillare zu entfernen. Entgegen der Methode eines aufwendigen Ätzverfahrens [127] wurde das Polyamid über eine Länge von ca. 10mm mit Hilfe einer Flamme (z.B. Feuerzeug) abgebrannt und die Asche mit einem Alkohol (z.B. Isopropanol) und einem Tuch entfernt, vgl. auch [128].

Verwendet wurden Kapillaren mit einem Innendurchmesser von $50\mu m$ und einer durch den apparativen Aufbau bestimmten Gesamtlänge L zwischen $L=53cm$ und $L=80cm$.

Nach sorgfältiger Entfernung aller Rückstände auf der Quarzoberfläche und Kontrolle mit einem Mikroskop konnte die Kapillare verwendet werden.

Die Enden der Kapillare wurden mit Hilfe eines Diamantschneiders gebrochen und mit einem Mikroskop die Bruchflächen auf Unebenheiten untersucht. Für die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit der Messungen sind ebene Endflächen eine notwendige Voraussetzung.

Bei der Anwendung eines LIF-Nachweises ist das Strahlprofil des Lasers und seine Leistung hinsichtlich der Haltbarkeit der Kapillare zu berücksichtigen. Ein inhomogenes Strahlprofil, wie es z.B. bei einem OPO-Lasersystem zu finden ist, führt nicht nur zu einer Fluoreszenz, die ohne Normierung die Intensitätsverteilung des Laserprofils und nicht die der Probe widerspiegelt, sondern es ist auch für die Zerstörung der Quarzkapillare verantwortlich.

Kleine Intensitätsspitzen können bei dauerhafter Belastung der Kapillaroberfläche zu einer Beschädigung derselben führen, die als deutlicher Anstieg des Streulichtanteils zu beobachten ist. Zugleich wird die Transmission der Quarzoberfläche reduziert, so daß das Fluoreszenzsignal an Intensität verliert. Nicht selten führt eine punktförmige Belastung der Oberfläche zu Löchern in der Wand und zu einem Bruch der Kapillare.

Zur Verdeutlichung dieser Effekte ist in Abbildung 5.5 eine Kapillaroberfläche abgebildet, die der Belastung eines inhomogenen, mit Intensitätsspitzen behafteten Strahlprofils des Farbstofflasers ausgesetzt war.

¹Qualitätsunterschiede des Quarzmaterials werden seitens der Hersteller nicht angegeben.

Der Innenbereich *i* und die Außenflächen *a* der Kapillare sind im rechten Bildbereich gekennzeichnet. In weiten Bereichen des linken Bildbereiches ist die glatte Oberfläche entlang einer Linie zerstört und aufgeraut (vgl. Pfeil im linken Bildbereich).

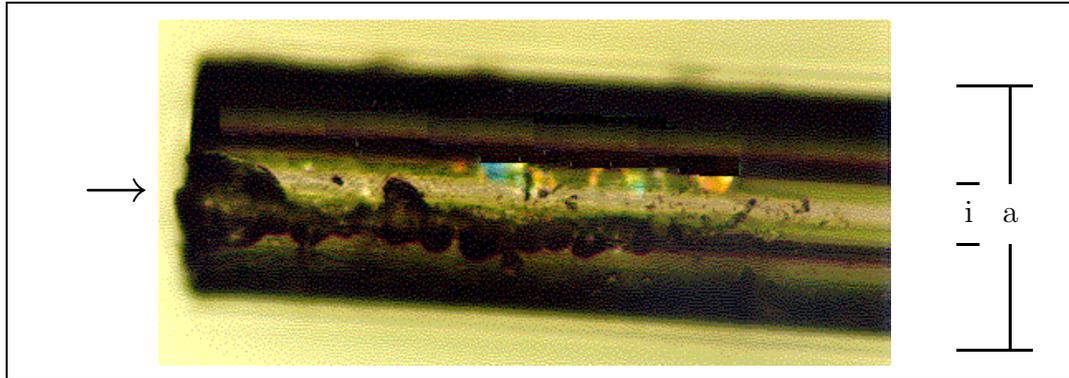


Abbildung 5.5: *Bild einer Kapillare, die durch ein inhomogenes Laserstrahlprofil zerstört wurde, i) Innenbereich $\emptyset = 50\mu\text{m}$, a) Außenbereich der Kapillare $\emptyset = 200\mu\text{m}$.*

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich für den dauerhaften Einsatz einer Kapillare die maximale Belastung von 0.5mJ/Puls durch ein homogenes Strahlprofil des Farbstofflasers.

5.4 Schwankungen der Laserintensität

Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zu der Intensität der anregenden Strahlung. Dieser Zusammenhang ist in Gleichung 2.3 dargestellt. Für Vergleiche verschiedener Fluoreszenzsignal oder die Angabe absoluter Intensitäten ist eine Normierung auf die Intensität der anregenden Strahlung notwendig. Als Referenzwert für das Maß dieser Intensität können bei diesen Fluoreszenzmessungen prinzipiell direkte Messungen der Intensität (z.B. mit einer Diode), das Rayleigh- und das Ramansignal im Kamerabild verwendet werden. Mit Hilfe solch einer Normierung kann die Stärke eines Fluoreszenzsignals bzgl. der Laserintensitätsschwankungen korrigiert werden.

Im folgenden werden die mit einer Diode und dem Wasser-Raman-Signal ermittelten Schwankungen des Farbstofflasersystems und die am Rayleighsignal bestimmten Intensitätsschwankungen der OPO-Systeme vorgestellt.

Die Intensitätsschwankungen des Nd:YAG-Lasers werden vom Farbstofflaser übernommen und bei der nachfolgenden Frequenzverdopplung verstärkt. Verantwortlich dafür sind nichtlineare Effekte zwischen dem Elektrischen Feld der Laserstrahlung und der induzierten Polarisation [129].

Die Intensitätsschwankungen der Einzelpulse wurden mit einer UV-empfindlichen Diode (aktive Fläche 4.6mm^2 , UV-250BQ, EG&G) aufgezeichnet, die einen Reflex des gesamten Laserstrahlprofils detektierte. Die Datenaufnahme erfolgte simultan, so daß die zu einem Kamerabild mit 1s Öffnungszeit korrespondierenden 10 Laserpulse gemessen werden konnten.

Die mit der Diode gemessenen Einzelpulsintensitäten weisen eine Standardabweichung von 8% auf. Dieser Wert ist für ein Lasersystem dieser Konfiguration üblich. In Abbildung 5.6 gibt ein Histogramm die relativen Anteile der Mittelwerte aus einer Menge von 770 Werten an, die jeweils über 10 Einzelpulse gemittelt worden sind. Die Werte dieser gemittelten Intensitäten weisen erwartungsgemäß eine Standardabweichung von 2.5% auf.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Intensitätsschwankungen besteht in der Auswertung des Wasser-Raman-Signals, welches direkt proportional zur Laserleistung und bei der Anregung mit 270nm im Kamerabild vorhanden ist.

Dieses Ramansignal besteht aus dem integrierten Signal von 10 Einzelpulsen. Die Intensitätsschwankung dieser gemittelten Ramansignale weist eine Standardabweichung von 2.9% auf. Diese Abweichung zu dem Wert von 2.5% der Diodenmessung ist auf die Unterschiede im detektierten Laserstrahlprofil zurückzuführen:

Die Diode kann mit ihrer aktiven Fläche das gesamte Strahlprofil aufzeichnen und erfaßt auch räumliche Intensitätsvariationen. Das Ramansignal hingegen ergibt sich aus einem Ausschnitt des Strahlprofils, wie es in Abbildung 2 dargestellt ist.

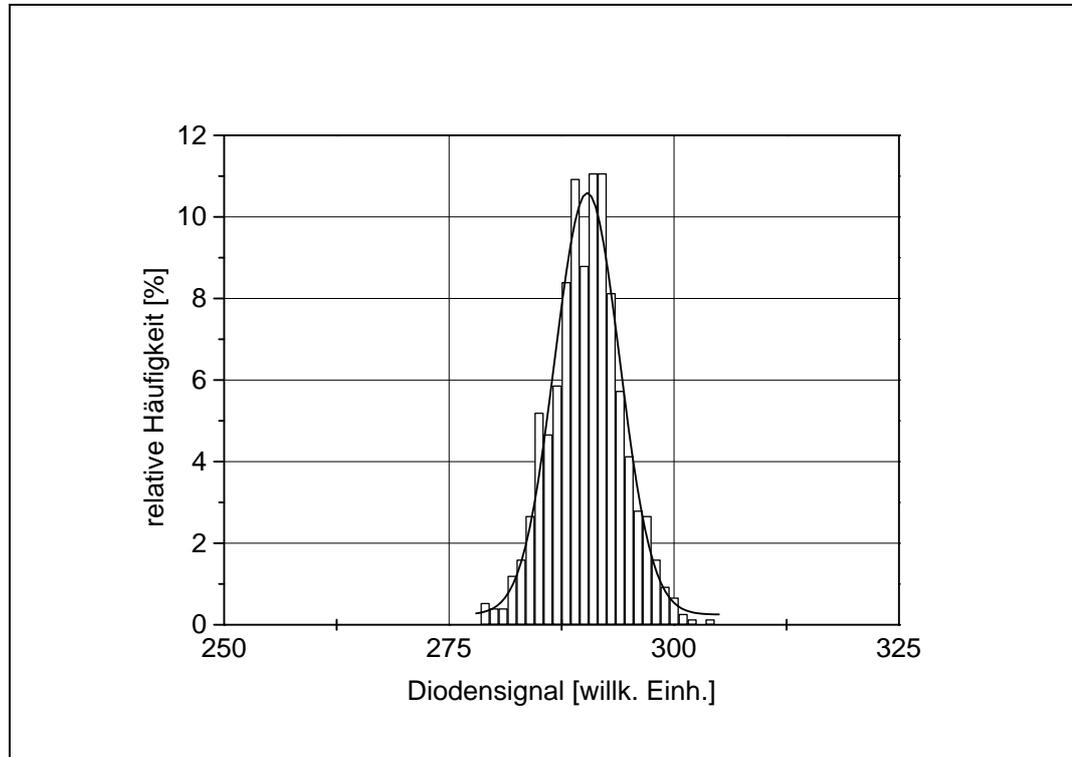


Abbildung 5.6: *Histogramm der Laserintensitätsschwankung aus Diodensignalen, die über 10 Einzelpulse gemittelt worden sind.*

Ein Teil des Strahlprofils wird durch die Schlitzeblende abgedeckt, die vor der auf die Kapillare abbildenden Zylinderlinse positioniert ist, um das Streulicht im Spektrometer zu reduzieren. Räumliche Intensitätsschwankungen des Laserprofils werden nicht vollständig erfaßt und spiegeln sich somit in einer erhöhten Standardabweichung des Ramansignals wieder.

Das Ramansignal kann nicht zur Intensitätsnormierung verwendet werden, wenn es spektral mit dem Fluoreszenzsignal überlappt. Die meisten der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen weisen eine Fluoreszenz bei 296nm auf, so daß auf die Normierung mit Hilfe des Diodensignals zurückgegriffen werden muß. Die Abbildung 5.7 zeigt das Wasser-Raman-Signal aus einer gefluteten Kapillare vor und nach der Normierung auf das Diodensignal.

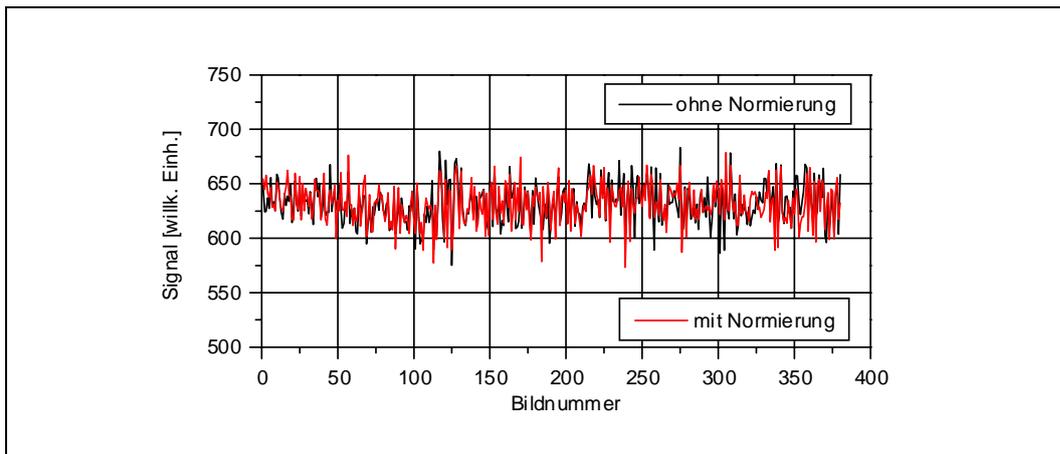


Abbildung 5.7: Gemittelte Wasser-Raman-Signale vor und nach einer Intensitätsnormierung mit einer Diode (Farbstofflasersystem).

Das Ramansignal weist vor und nach der Normierung eine Standardabweichung von 2.9% auf. Die Normierung führt nicht zu einer Reduzierung der Schwankungen und wird deshalb bei den Messungen mit dem Farbstofflasersystem nicht durchgeführt.

Bei den spektral aufgelösten Messungen mit den OPO-Lasersystemen wurde das Rayleighsignal mit im Kamerabild detektiert und kann für eine Intensitätsnormierung verwendet werden, da nur langwelligere Fluoreszenzen beobachtet worden sind.

Die Schwankungen sind bei diesen Lasersystemen durch die zusätzliche Nutzung nicht linearer Prozesse im OPO-Kristall höher als bei dem das Farbstofflasers und liegen bei 10%. Besonders sind jedoch die Intensitätsspitzen bei 246.1nm, 261nm und 266nm zu berücksichtigen, die die Ausgangsleistung des zweiten OPO-Lasersystems prägen, vgl. Abbildung 6.

Die spektral aufgelösten Messungen wurden auf das Rayleighsignal normiert, und die Messungen mit den OPO-Lasersystemen bei einer festen Wellenlänge wurden auf ein Diodensignal normiert, welches einen Reflex des Laserprofils aufzeichnete. Die Intensitätsschwankungen konnten in beiden Fällen auf ca. 6% reduziert werden. Die verbleibenden Schwankungen sind wie oben beschrieben auf räumliche Intensitätsschwankungen, die bei den OPO-Lasersystemen deutlich größer als beim Farbstofflasersystem sind, und die nicht vollständige Abbildung des Laserprofils zurückzuführen.

5.5 Arzneistoffe

Die in dieser Arbeit untersuchten Arzneistoffe sind Aromate und enthalten mindestens einen Benzolring, dessen H-Atome in vielfältiger Weise, nicht nur durch Methyl- oder Hydroxylgruppen, substituiert sind. Die zu erwartende Fluoreszenz dieser Stoffe geht von dem π -Elektronensystem aus, das durch einen oder mehrere Benzolringe realisiert wird. Die folgende Aufzählung enthält alle hier verwendeten Arzneistoffe und klassifiziert sie nach der Anzahl ihrer Benzolringe.

Die Substanzen mit einem Benzolring sind:

- Tramadol und seine Metabolite N- und O-Desmethyltramadol und N,O-Bi- und N,N,O-Tridesmethyltramadol.
- Salbutamol
- Metoprolol
- Dimetinden
- Synephrin (Oxedrin)

Die Substanzen mit zwei Benzolringen sind:

- Fenoterol
- Astemizol
- Norefensin
- Verapamil

Die Substanz mit zwei kondensierten Benzolringen:

- Propranolol

Substanzen aus der Reihe der Anthracycline:

- Daunorubicin
- Idarubicin

Die Arzneistoffe wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Blaschke, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Münster bereitgestellt und entsprechen mindestens DAB-Qualität².

Die Strukturformeln aller oben aufgezählten Arzneistoffe sind im Anhang A angegeben.

²Deutsche Arzneibuch

Kapitel 6

Absorptionsmessungen

Die Absorptionsmessungen dienen der Bestimmung des Wellenlängenbereiches, in dem eine Anregung der Teilchen erfolgen kann. Weiterhin wird ein Ausschnitt dieses Bereiches bestimmt, der für die Erstellung der AE-Spektren im Rahmen der Möglichkeiten des OPO-Systems geeignet ist.

Die Absorptionsmessungen wurden mit Hilfe des kontinuierlichen Spektrums einer Deuteriumlampe durchgeführt, die die Küvette¹ mit der gelösten Substanz durchleuchtete, vgl. Abbildung 6.1. Als Maß für die Absorption wurde der Ausdruck

$$\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot x \cdot c \quad (6.1)$$

berechnet, in dem I die transmittierte Intensität und I_0 die einfallende Intensität der Deuteriumlampe bedeuten.

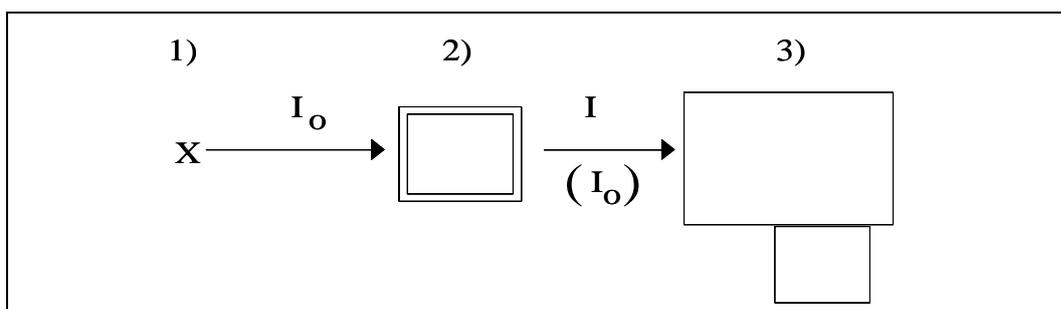


Abbildung 6.1: Schematischer Versuchsaufbau für die Absorptionsmessungen in Draufsicht. 1) Deuteriumlampe, 2) Küvette, 3) Spektrometer mit ICCD-Kamera. Die Intensitäten I_0 und I vor bzw. nach der Küvette.

Die Intensität I wurde vom Spektrometer spektral zerlegt und mit Hilfe der ICCD-Kamera detektiert. Um die Einflüsse der Küvette und des Lösungsmittels

¹Suprasil I, $2 \cdot 2\text{cm}^2$.

zu berücksichtigen, wurde als Wert für I_0 die Intensität nach einer nur mit Lösungsmittel gefüllten Küvette gewählt. Damit läßt sich der molare Absorptionskoeffizient $\epsilon [cm^2 \cdot mol^{-1}]$ bei bekannter molarer Konzentration $c [mol \cdot l^{-1}]$ und bekannter Absorptionslänge $x [cm]$ bestimmen. Den Werten für die molaren Absorptionskonstanten ϵ liegen die Gewichtsangaben der reinen Substanzen ohne Salze oder Basen zugrunde. Die Substanzen lagen in wässrigen Lösungen (Phosphat- oder Boraxpuffer) vor, deren Konzentration (50mM) und pH-Werte durch die Anforderungen der nachfolgenden CZE-Messungen vorgegeben sind.

Eine äquivalente Darstellung kann mit Hilfe des Absorptionsquerschnitts σ erfolgen, der durch das Gesetz von BEER-LAMBERT bestimmt wird:

$$I = I_0 \cdot e^{-\sigma \cdot x \cdot n}, \quad (6.2)$$

in dem $x [cm]$ die Länge der Absorptionsstrecke und $n [Teilchen \cdot cm^{-3}]$ die Teilchendichte bezeichnen. Somit ergibt sich folgender Zusammenhang zwischen der molaren Absorptionskonstanten ϵ und dem Absorptionsquerschnitt σ :

$$\sigma = \frac{-1}{x \cdot n} \cdot \ln \left(\frac{I}{I_0} \right) = 2.3 \cdot \epsilon \cdot N^{-1}$$

($N = 6.023 \cdot 10^{23}$ Teilchen: Avogadro-Konstante).

Im Folgenden wird der Wert der Anregungsrate abgeschätzt:

Die Anregungsrate γ wird durch den Ausdruck

$$\gamma = \sigma \cdot I$$

berechnet [45], in dem der Absorptionsquerschnitt $\sigma [cm^2]$ und die Intensität der einfallenden Strahlung $I [Photonen \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}]$ benötigt werden. Die verwendete Deuteriumlampe hatte eine Intensität von ca. $I \approx 2 \cdot 10^{12} [Photonen \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}]$ (Herstellerangabe), so daß sich bei einem Absorptionsquerschnitt $\sigma = 3 \cdot 10^{-17}$ Anregungsraten in den Größenordnung $\gamma \approx 6 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ ergaben. Bei einer Belichtung für den Zeitraum von 1s werden ca. $6 \cdot 10^{-5}\%$ der Teilchen im Grundzustand angeregt.

In den nachfolgenden Abbildungen ist der molare Absorptionskoeffizient ϵ auf der linken Seite als Funktion der Wellenlänge aufgetragen, die auf Werte zwischen 210nm und 320nm beschränkt wurde. Auf der rechten Seite der Abbildungen ist der Absorptionsquerschnitt σ angegeben. Bei größeren Werten als 320nm ist keine meßbare Absorption vorhanden, so daß auf die Darstellung aus Gründen der Übersicht verzichtet worden ist.

6.1 Tramadol und seine Metabolite

In der Abbildung 6.2 sind die molaren Absorptionskonstanten und der Absorptionsquerschnitt σ für Tramadol und einige seiner Metabolite aufgetragen, die in 0.05M Boraxpuffer mit pH=10.65 gelöst waren.

Die Werte für Tramadol und N-Desmethyltramadol zeigen einen ähnlichen Verlauf: Er ist gekennzeichnet durch ein Maximum bei 270nm mit einer Halbwertsbreite von ca. 10 nm und einer Abnahme zu längeren Wellenlängen. Tramadol hat ein Minimum bei 250nm und N-Desmethyltramadol bei ca. 245nm. Zu kürzeren Wellenlängen steigen beide Absorptionskoeffizienten bis 210nm monoton an. Die Metabolite O-Des-, N,O-Dides- und N,N,O-Tridesmethyltramadol zeigen ebenfalls ähnliche Werte. Die Verläufe weisen bei 290nm ein Maximum mit einer Halbwertsbreite von ca. 20nm auf und das Minimum ist bei 260nm erreicht.

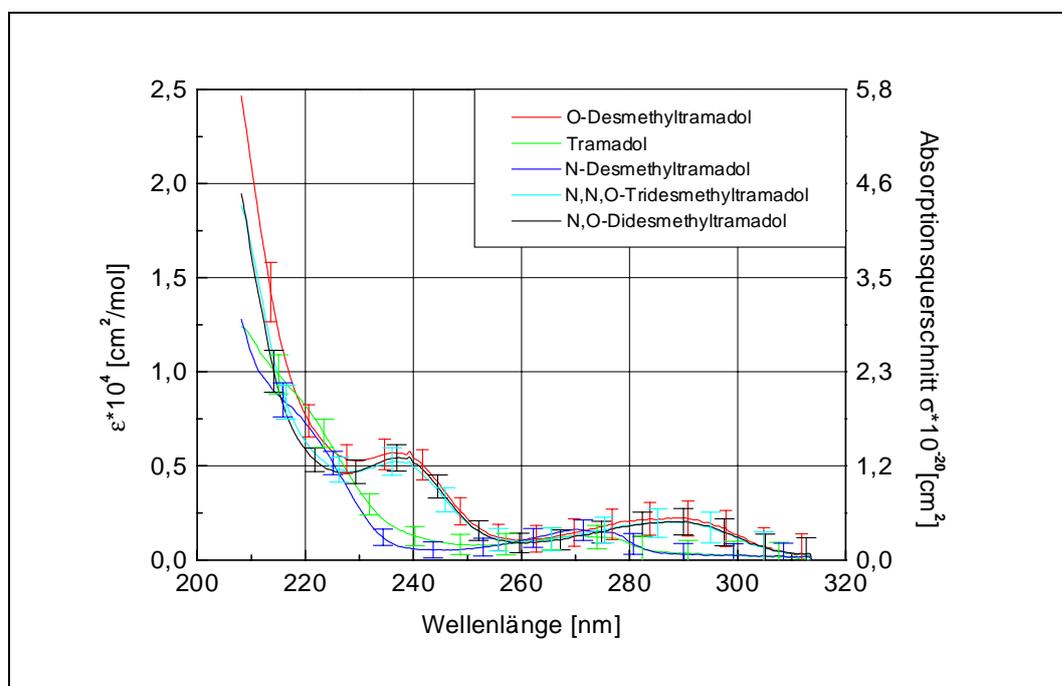


Abbildung 6.2: Molarer Absorptionskoeffizient ϵ und Absorptionsquerschnitt σ von Tramadol und den Metaboliten in 0.05M Boraxpuffer, pH=10.65.

Ein zweites relatives Maximum ist bei 239nm mit einer Halbwertsbreite von ca. 10nm vorhanden, welches doppelt so groß, wie das bei 270nm ist. Darin unterscheiden sich diese Metaboliten von Tramadol und N-Desmethyltramadol. Zu kürzeren Wellenlängen steigen die Absorptionskoeffizienten bis 210nm monoton an. Diese Einteilung in zwei Klassen mit ähnlichen Absorptionskonstanten kann mit Hilfe der Übersicht im Anhang A erklärt werden:

Tramadol und N-Desmethyltramadol besitzen das π -Elektronensystem eines Benzolringes und unterscheiden sich bei diesem pH-Wert durch eine Methylgruppe bzw. einem Wasserstoffatom in einer angehängten Seitenkette.

Die anderen Metaboliten weisen ebenfalls das π -Elektronensystem eines Benzolringes auf, der jedoch phenolischen Charakter hat. Die Differenzen der molaren Absorptionskonstanten bei den Metaboliten werden ebenfalls durch Unterschiede in einer angehängten Seitenkette hervorgerufen.

Die Substanzen zeigen eine Absorption im UV-Bereich bei Wellenlängen kleiner ca. 320nm mit relativen Maxima. Bei größeren Wellenlängen ist keine Absorption vorhanden. Für eine Anregung dieser Moleküle können alle Wellenlängen in diesem UV-Bereich $\lambda_{ex} < 320nm$ verwendet werden, jedoch ist der Bereich mit der höchsten Absorption bei 210nm der effektivste. Im Vergleich dazu besitzt Benzol in Cyclohexan gelöst bei 210nm den Wert $\epsilon \approx 1 \cdot 10^4$ [29]. Diese molare Absorptionskonstante liegt in der gleichen Größenordnung wie bei den vorliegenden Substanzen.

Als Folge einer Anregung kann während des Relaxationsprozesses eine Fluoreszenz möglich sein. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen zu diesen Substanzen bei verschiedenen Anregungswellenlängen werden in Kapitel 7.1.1 vorgestellt.

6.2 Ausgewählte Arzneistoffe

Die ausgewählten Arzneistoffe wurden in 50mM Phosphatpuffer mit pH=4.6 gelöst. Die molaren Absorptionskonstanten ϵ , bzw der Absorptionsquerschnitt σ der Substanzen Astemizol, Salbutamol und Verapamil in Abbildung 6.3 zeigen einen ähnlichen Verlauf. Den Substanzen ist ein Absorptionsmaximum um 280nm mit einer Halbwertsbreite von 10nm bis 15nm gemeinsam. Ein Minimum ist bei 255nm vorhanden. Zu kürzeren Wellenlängen schließt sich bei 235nm bis 240nm ein zweites relatives Maximum an, das bei Astemizol und Salbutamol nur als Schulter ausgebildet ist. Bis 210nm steigen die molaren Absorptionskonstanten monoton an.

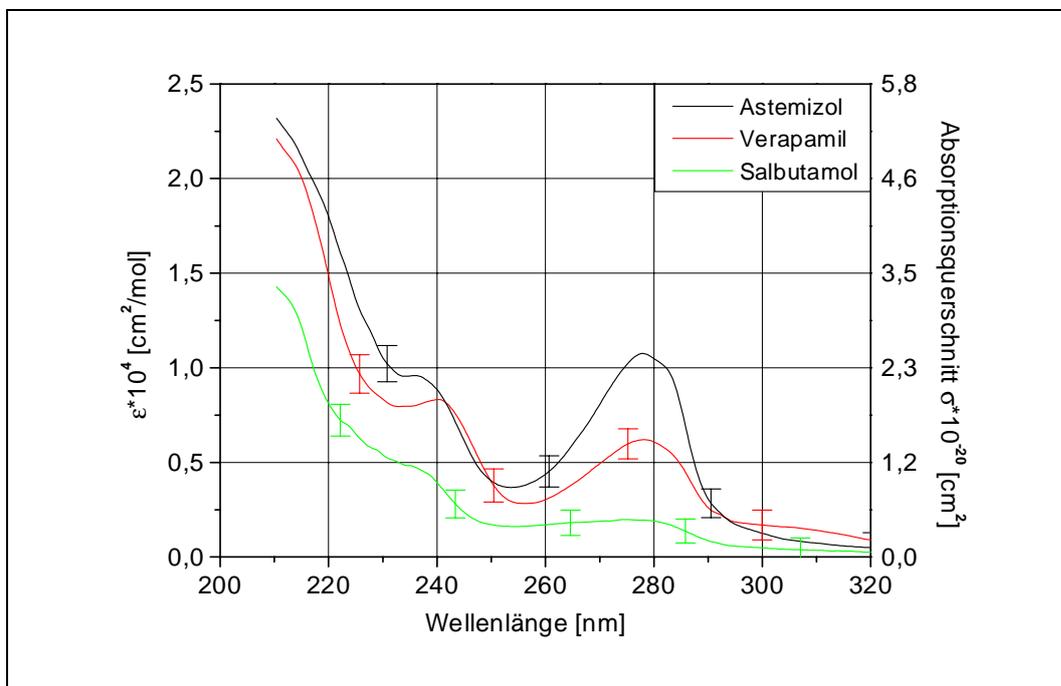


Abbildung 6.3: Molare Absorptionskonstanten ϵ und Absorptionsquerschnitte σ von Astemizol, Verapamil und Salbutamol.

In Abbildung 6.4 sind die molaren Absorptionskonstanten von Propranolol, Fenoterol, Dimetinden und Metoprolol dargestellt.

Mit Ausnahme von Dimetinden sind die Verläufe auch bei diesen Substanzen durch zwei Maxima gekennzeichnet. Propranolol hat ein Maximum bei 290nm und ein Minimum bei 255nm. Es schließt sich ein Maximum bei ca. 242nm an und bis 210nm nimmt die Absorptionskonstante monoton zu.

Die Maxima der anderen Substanzen liegen zwischen 270nm bis 280nm und weisen eine Halbwertsbreite von 10nm auf. Es existieren Minima zwischen 260nm und 250nm. Im Bereich von 230nm bis 240nm liegt jeweils ein schwaches Maximum, welches als Schulter ausgebildet ist. Zu kürzeren Wellenlängen steigen die Werte monoton an.

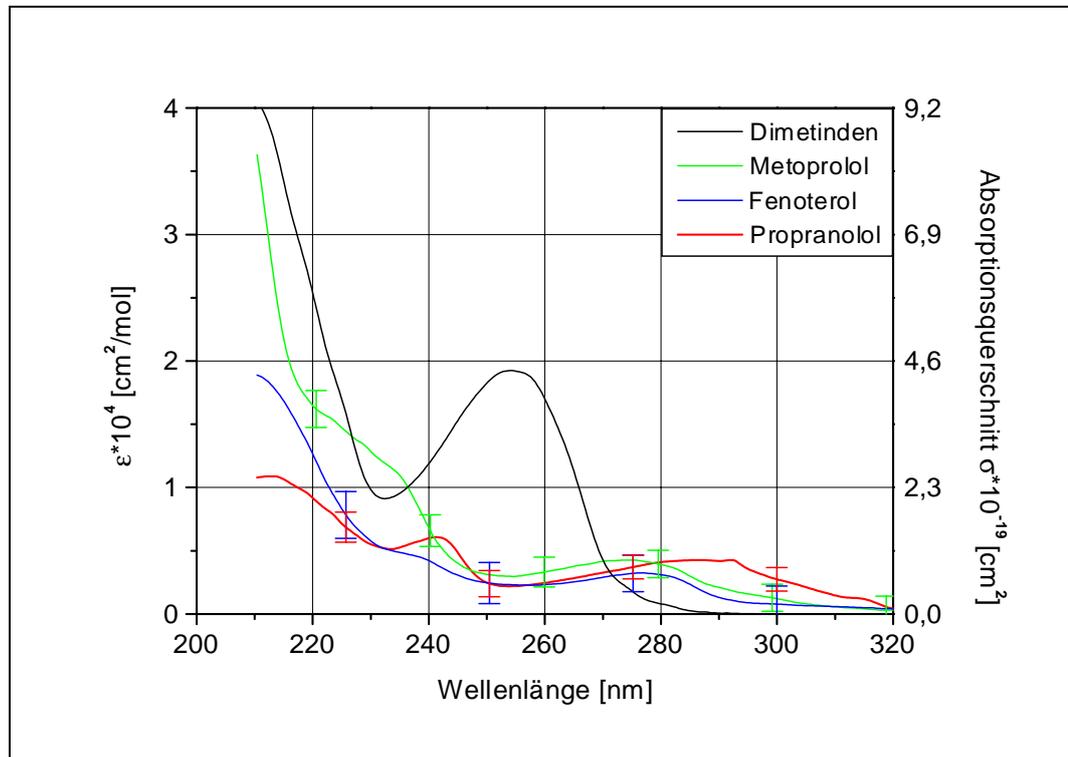


Abbildung 6.4: Molare Absorptionskonstanten ϵ und Absorptionsquerschnitte σ von Dimetinden, Metoprolol, Fenoterol und Propranolol.

Der Stoff Dimetinden hebt sich davon ab, indem nur ein relatives Maximum vorhanden ist, welches bei 255nm liegt. Ein Minimum schließt sich bei 230nm an und die Absorptionskonstante steigt zu kürzeren Wellenlängen an.

Auch bei diesen Substanzen ergeben sich die verschiedenen Werte der molare Absorptionskonstanten durch die vielfältigen Kopplungen von Atomen und Molekülgruppen an das π -Elektronensystem der Benzolringe. Ein Absorptionsmaximum ist mit Ausnahme von Dimetinden bei allen Arzneistoffen im Bereich 270nm bis 290nm und zwischen 230nm und 240nm gegeben.

Neben einem Absorptionsbereich im UV weist Daunorubicin mit seinen vier kondensierten Benzolringen einen Absorptionsbereich im sichtbaren Spektralbereich auf. Das Absorptionsspektrum für den Wellenlängenbereich 200nm bis 600nm von $17\mu\text{g/ml}$ Daunorubicin-HCl in Methanol ist in Abbildung 6.5 dargestellt [130].

Das Absorptionsspektrum weist zwei benachbarte Maxima bei 495nm und 475nm auf und nimmt über ein Maximum bei 532nm ab. Zum kurzwelligeren Bereich nimmt die Absorption ohne weitere Maxima ab und erreicht bei 320nm ein Minimum. Danach steigt die Absorption über Maxima bei 290nm und 252nm bis zum absoluten Maximum bei 234nm und fällt danach wieder ab.

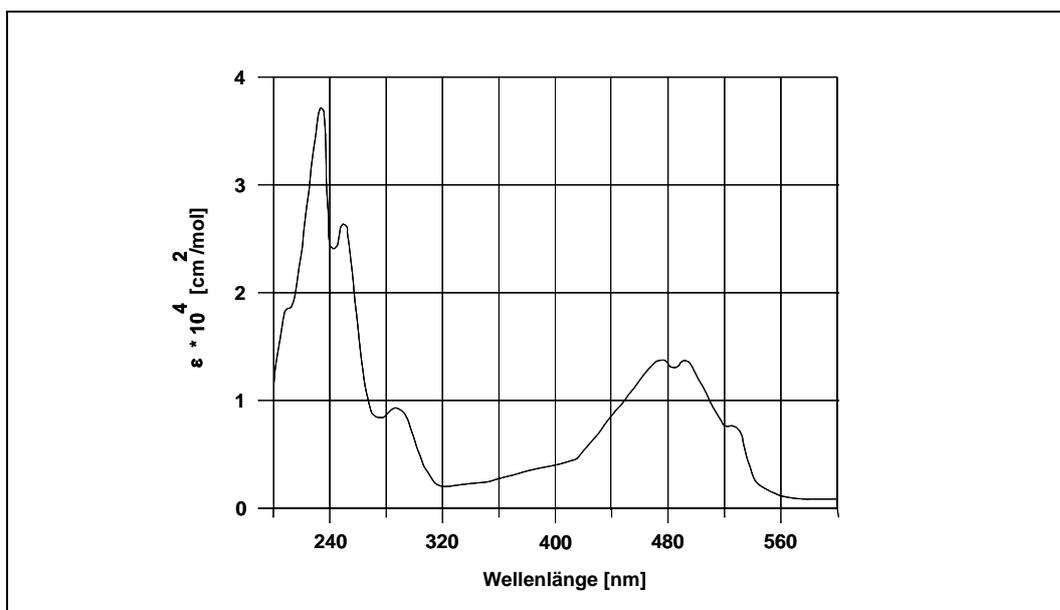


Abbildung 6.5: Molare Absorptionskonstante ϵ von Daunorubicin-HCl in Methanol [130].

Somit zeigt dieses Spektrum im Gegensatz zu den obigen Absorptionsspektren die Möglichkeit einer Absorption sowohl im UV- als auch im sichtbaren Spektralbereich.

Mit Ausnahme von Daunorubicin weisen diese ausgewählten Arzneistoffe eine Absorption nur im UV-Bereich mit Wellenlängen $\lambda < \text{ca. } 320\text{nm}$ auf. Für LIF-Messungen ergibt sich daraus die Notwendigkeit entsprechender Laserwellenlängen in diesem Bereich. Für eine Anregung dieser Substanzen ist der Bereich mit der höchsten Absorption bei 210nm (234nm bei Daunorubicin) besonders geeignet.

Die Ergebnisse von Fluoreszenzmessungen bei verschiedenen Anregungswellenlängen sind in Kapitel 7.1.1 dargestellt.

Im Vergleich zu effizienten Laserfarbstoffen wie z.B. Rhodamin 6G, dessen Maximum des Absorptionsquerschnitts mit $\sigma \approx 4 \cdot 10^{-16}[\text{cm}^2]$ angegeben wird [34], handelt es sich bei diesen Arzneistoffen um relativ schwache Absorber.

Kapitel 7

Fluoreszenzmessungen

Das Fluoreszenzsignal kann von vielen Parametern beeinflusst werden, die Gegenstand der folgenden Untersuchungen sind. Im einzelnen sind das

- die Anregungswellenlänge
- die Polarisation der Fluoreszenzstrahlung
- der pH-Wert des Lösungsmittels
- die Zeitdauer der UV-Bestrahlung
- die Konzentration der Substanzen und
- der von dem Puffer und/oder der Kapillare verursachte Signaluntergrund.

Die Ergebnisse dieser entsprechenden Messungen werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

7.1 Anregungs-/Emissionsspektren

Die Absorptionmessungen zeigen, daß eine Anregung vieler Substanzen nur mit Wellenlängen kleiner als ca. 320nm möglich ist. Bei Anwendung einer UV-LIF-Detektion sind die Anregungswellenlängen zu bestimmen, die eine hohe Fluoreszenzausbeute ermöglichen. Dafür wurde für viele der hier verfügbaren Substanzen eine spektral aufgelöste Fluoreszenz bei vielen verschiedenen Anregungswellenlängen mit der kontinuierlichen UV-Strahlung (240nm bis 270nm) eines OPO-Systems gemessen und in Form von Anregungs-/Emissionsspektren (A/E-Spektren) dargestellt. Zusätzlich werden den Fluoreszenzspektren nach einer Anregung mit 270nm die Fluoreszenzspektren nach einer Anregung mit 212nm gegenübergestellt. Dabei werden die Ergebnisse für Tramadol und die Metabolite von den anderen Arzneistoffen getrennt aufgezeigt.

Im Anschluß daran sind A/E-Spektren für Daunorubicin (240nm bis 280nm) und Idarubicin (220nm bis 240nm), sowie Fluoreszenzspektren bei einzelnen Wellenlängen aufgeführt.

Die spektrale Zerlegung der Fluoreszenz bietet Information über molekulare Energieübergänge und ist somit molekulspezifisch. Eine Ausweitung des Informationsinhaltes kann erfolgen, wenn nicht nur eine Anregungswellenlänge zu Grunde gelegt wird, sondern eine Vielfalt von Anregungswellenlängen. Bei Variation der Anregungswellenlänge und Detektion der spektral zerlegten Fluoreszenzen entsteht eine zwei-dimensionale Matrix mit den entsprechenden Dimensionen: Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge. Diese Spektren werden bei diskreter Variation der Anregungswellenlänge auch als „total luminescence spectrum“ bezeichnet [131, 132].

Die Abbildung 7.1 zeigt schematisch die Erstellung eines A/E-Spektrums: In einem Kamerabild a) wird die Fluoreszenz bei Anregung mit einer Wellenlänge über die die räumliche Ausdehnung x integriert oder gemittelt und zu einem Profil b) mit spektraler Auflösung verdichtet, welches als eine Zeile im A/E-Spektrum c) niedergelegt wird, in der die Intensität farblich codiert ist. Bei den in dieser Arbeit gezeigten A/E-Spektren ist auf der Horizontalen die Emissionswellenlänge und in der Vertikalen die Anregungswellenlänge angegeben.

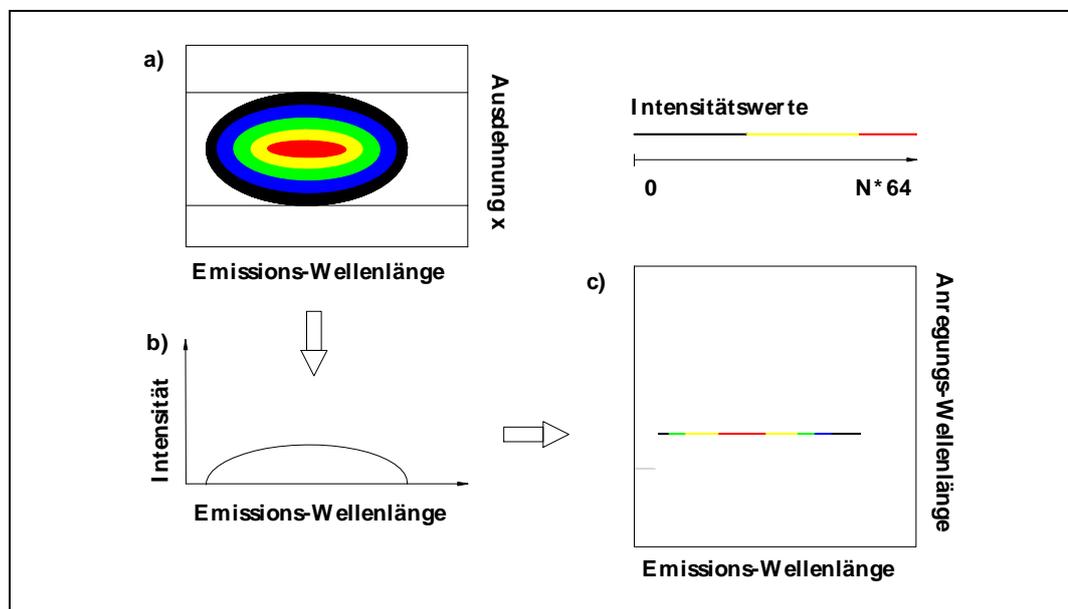


Abbildung 7.1: Erstellung eines A/E-Spektrums c) aus einzelnen Kamerabildern a) über die verdichtete Information eines Profils b). Eine beispielhafte Farbskala ist oben rechts abgebildet.

Die Intensitätswerte in einem Bild werden mit Hilfe einer Falschfarbenskala dargestellt. Als farbliche Darstellung stehen 64 Farben zur Verfügung, so daß für die Darstellung von Werten bis maximal $N \cdot 64$ jeweils N aufeinander folgende Werte durch eine Farbe repräsentiert werden.

Für die Messung der Anregungs-/Emissionsspektren wurde die kontinuierliche Strahlung der OPO-Lasersysteme verwendet. Der apparative Aufbau entsprach dem in Abbildung 4.12 mit einer Küvette¹ anstelle der Kapillare. Optische Filter wurden für die Erstellung der A/E-Spektren nicht verwendet.

Die A/E-Spektren von Daunorubicin und Idarubicin wurden mit dem ersten OPO-Lasersystem erstellt. Die Anregungswellenlänge konnte zwischen 240nm-280nm, bzw. zwischen 220nm-240nm mit einer Schrittweite von jeweils 0,2nm variiert werden. Das Lösungsmittel der Substanzen war ein Na_2HPO_4 -Puffer mit Acetonitrilzusatz. Vor Eintritt in die Küvette wurde das UV-Licht mit Quarzprismen geführt und mit einer Blende auf einen Durchmesser von drei Millimeter und eine Leistung von 0,2 mJ/Puls begrenzt. Ein Ausbleichen der Substanzen konnte damit vermieden werden, wie Intensitätsvergleiche zu Beginn und am Ende der Messung bei der Startwellenlänge zeigen. Das Fluoreszenzlicht wurde mit einem Hohlspiegel gesammelt, in das Spektrometer fokussiert und mit der ICCD-Kamera aufgezeichnet.

Die A/E-Spektren der anderen Substanzen wurden mit dem zweiten OPO-Lasersystem gemessen, und die Wellenlänge variierte im Bereich 240nm bis 270nm mit einer Schrittweite von 0.20nm.

Die Substanzen waren in einem KH_2PO_4 -Puffer bzw. einem Boraxpuffer für Tramadol und die Metabolite gelöst. Der apparative Aufbau entsprach dabei den vorhergehenden Ausführungen.

¹Maße $2 \cdot 2cm^2$, Material: Suprasil 1

7.1.1 Tramadol und seine Metabolite

In den A/E-Spektren für Tramadol und die Metabolite sind in Abbildung 7.2 auf der Horizontalen die Emissionswellenlänge (475-275nm) und in der Vertikalen die Anregungswellenlänge (240-270nm) aufgetragen.

Die Stärke der Fluoreszenz ist als Zahl der Fotoelektronen, vgl. Seite 37, in einer Falschfarbendarstellung codiert, deren Werteverlauf für alle in Abbildung 7.2 dargestellten Spektren durch die dort gezeigte Farbskala dargestellt ist. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden alle Konzentrationen der in 50mM Boraxpuffer, pH=10.65 gelösten Substanzen auf 10 μ g/ml normiert.

Die fünf Substanzen besitzen in ihren A/E-Spektren eine ähnliche Struktur. Eine Fluoreszenz ist bei der Anregungswellenlänge $\lambda=240$ nm kaum zu beobachten. Bei einem Übergang zu langwelligeren Anregungen nimmt die Fluoreszenz stetig zu und erreicht bei allen fünf Substanzen ihr Maximum um 270nm. Messungen der spektral nicht aufgelösten Fluoreszenz bei einer Anregung zwischen 200nm und 300nm zeigen ebenfalls bei allen fünf Substanzen ein Maximum der Fluoreszenz bei 270nm [133]. Eine Struktur in Form von relativen Minima und Maxima ist nicht zu beobachten. Die Fluoreszenz ist auf den angegebenen UV-Bereich beschränkt und darüber hinaus nicht nachzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Emissionsmessungen sind nicht allein mit den zugrundeliegenden Absorptionsspektren zu erklären, in denen Absorptionsmaxima der phenolischen Metabolite bei 290nm vorhanden sind. Die maximale Fluoreszenzemission ist jedoch für diese Substanzen bei der Anregungswellenlänge 270nm zu detektieren. Die Kenntnis des Absorptionsspektrums gibt hier keine verlässliche Information über die Stärke einer Fluoreszenz.

Charakteristisch für Aromaten ist die Begrenzung der Fluoreszenz zu kleinen Wellenlängen: Die Emission beginnt unabhängig von der Anregungswellenlänge immer bei Werten größer ca. 280nm. Dieses Verhalten ist mit der Theorie konsistent. Danach findet nach dem Übergang in den ersten angeregten Zustand ($S_0 \rightarrow S_1$) eine Relaxation in den niedrigsten Vibrationszustand des Zustandes S_1 statt. Von dort erfolgt eine Energieabgabe, hier als Fluoreszenz, in die Vibrationsniveaus des Grundzustandes S_0 . Eine Zunahme der Fluoreszenz bei Übergang zu höheren Wellenlängen als 240nm zeigt, daß zuerst strahlungslose Relaxationsprozesse vorherrschen, die mit steigender Wellenlänge abnehmen, so daß die Möglichkeit einer Fluoreszenz wahrscheinlicher wird.

Eine Darstellung dieser A/E-Spektren mit einer Normierung auf die Fluoreszenzmaxima ist in Abbildung 7.3 gezeigt.

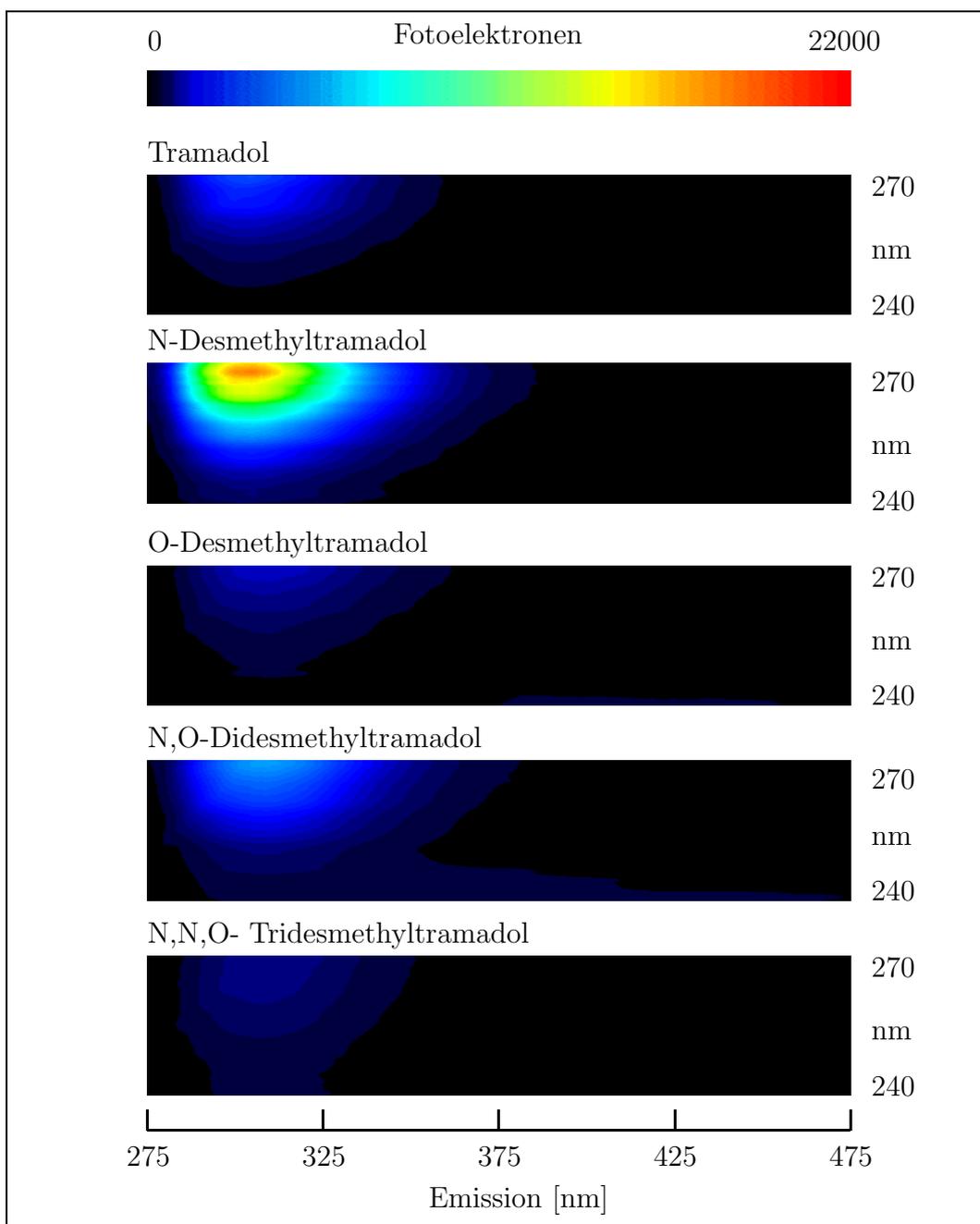


Abbildung 7.2: oben: Farbskala, darunter Anregungs-/Emissionsspektren: Tramadol und Metabolite gelöst in 50mM Boraxpuffer, pH=10.65. Normierung auf 10 μ g/ml.

Das Emissionsspektrum spiegelt die Grundzustandbesetzung wieder und zeigt bei allen fünf Substanzen keine weitere Struktur: Die Fluoreszenz hat bei ca. 290nm ein Maximum und nimmt zu längeren Wellenlängen langsamer ab, als zu kürzeren Wellenlängen.

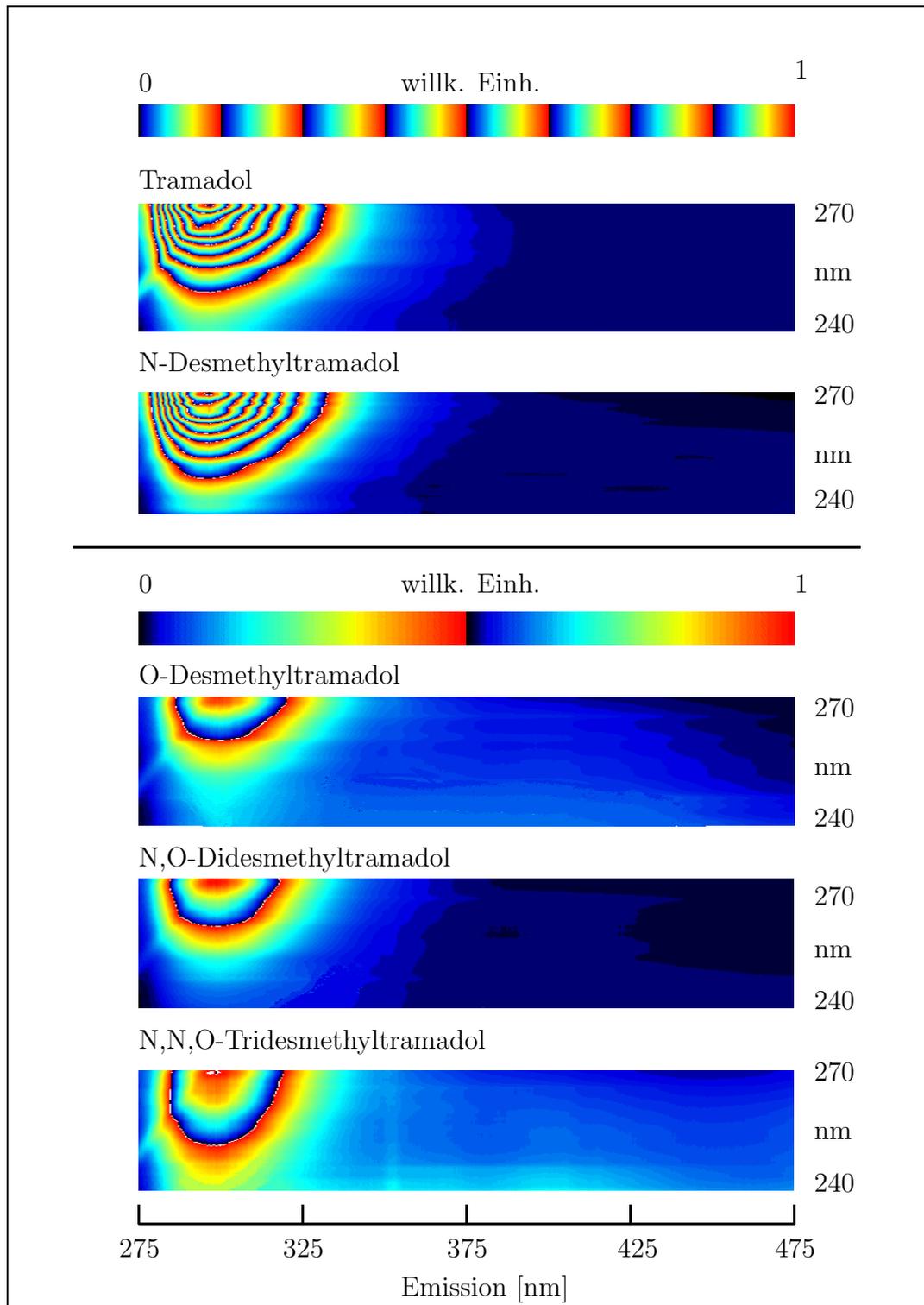


Abbildung 7.3: Intensitätsnormierte Anregungs-/Emissionsspektren von Tramadol und Metaboliten gelöst in 50mM Boraxpuffer, pH=10.65.

Die Stärke der Fluoreszenz ist bei den fünf Substanzen nicht gleich. Eine Übersicht über die in einer Küvette ermittelten Emissionsspektren der fünf Stoffe nach einer Anregung mit 270nm des Farbstofflasers und Normierung auf

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ findet sich in Abbildung 7.4. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 7.5 die entsprechenden intensitätsnormierten Spektren dargestellt.

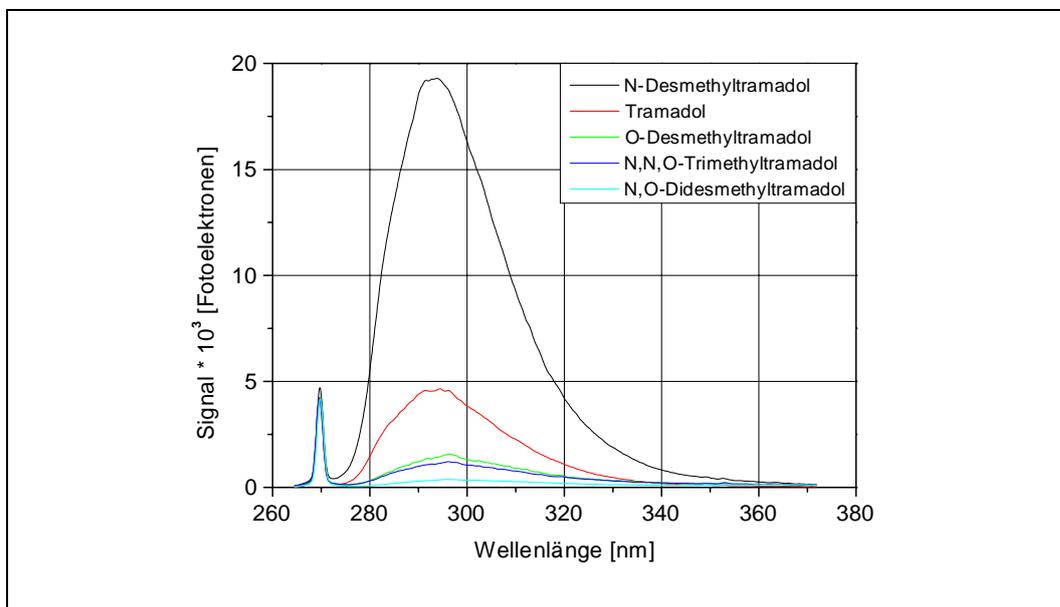


Abbildung 7.4: Fluoreszenzspektren von Tramadol und Metaboliten bei $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ in einer Küvette, 50mM Boraxpuffer pH=10.65, 0.1mJ/Puls, Normierung auf 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

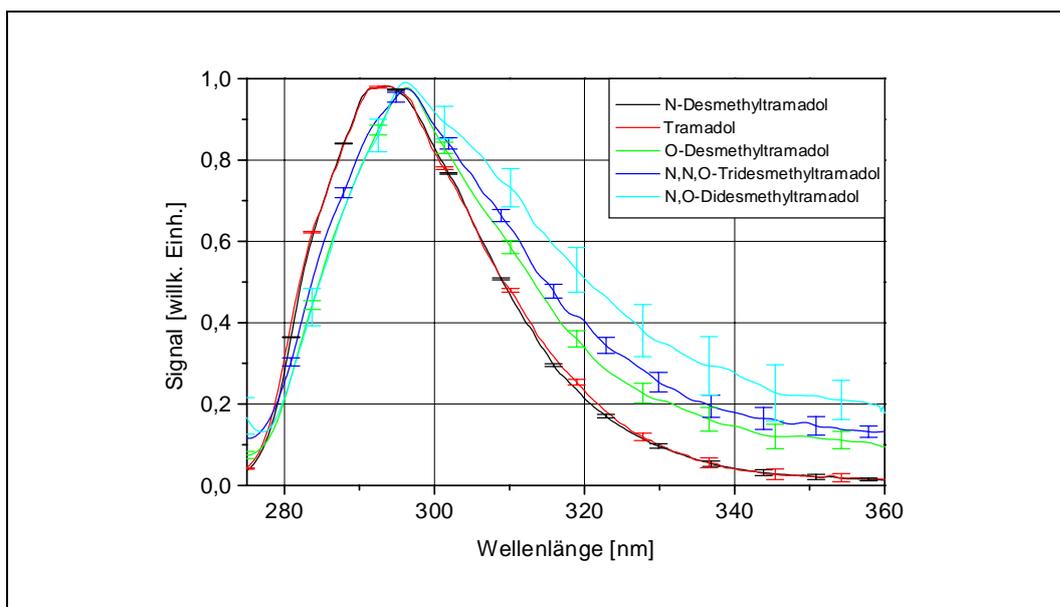


Abbildung 7.5: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von Tramadol und Metaboliten bei $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ in einer Küvette, 50mM Boraxpuffer pH=10.65.

Die Substanzen sind in 50mM Boraxpuffer pH=10.65 gelöst worden. Die Fluoreszenz ist bei N-Desmethyltramadol am größten und vier mal stärker als die von Tramadol. Die anderen Metaboliten weisen eine Fluoreszenzintensität auf, die ca. um den Faktor 10 kleiner als die von N-Desmethyltramadol ist.

Die Emissionen sind für die Substanzen Tramadol und N-Desmethyltramadol identisch. Die Lage der Fluoreszenzmaxima kann bei beiden Stoffen mit 293nm angegeben werden. Unterschiede in den Fluoreszenzemissionen können im Rahmen der Fehlergrenzen nicht festgestellt werden.

Die Metaboliten O-Desmethyl-, N,O-Didesmethyl und N,N,O-Tridesmethyltramadol weisen ein gemeinsames Fluoreszenzmaximum bei 296nm auf. Deutliche Unterschiede in der Emissionsstruktur ergeben sich bei größeren Wellenlängen, so daß unterschiedliche Halbwertsbreiten² der Fluoreszenzemission bestimmt werden können. Für Tramadol und N-Desmethyltramadol beträgt sie 32nm, bei O-Desmethyltramadol 36nm, bei N,O-Didesmethyltramadol 46nm und bei N,N,O-Tridesmethyltramadol 40nm. Bei Wellenlängen kleiner als 296nm sind im Rahmen der Fehlergrenzen keine Unterschiede in der Emission festzustellen.

Die Fluoreszenzspektren dieser Substanzen bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ sind in Abbildung 7.6 dargestellt.

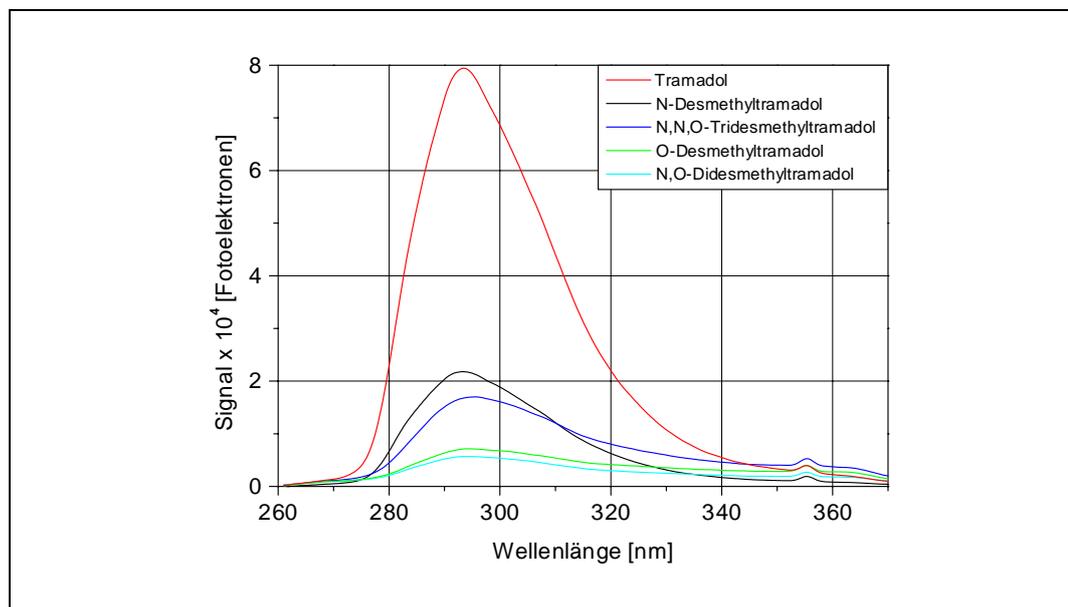


Abbildung 7.6: *Fluoreszenzspektren von Tramadol und Metaboliten bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ in einer Kapillare, 50mM Boraxpuffer pH=10.65 (Küvette), 0.1mJ/Puls, Normierung auf 10 $\mu\text{g/ml}$.*

²Damit wird der Wellenlängenbereich bezeichnet, bei dem die Intensität des Maximums I_{max} auf den Wert I_{max}/e gesunken ist.

Eine Normierung der Emissionen von Tramadol und den Metaboliten auf die Fluoreszenzmaxima ist für die Anregungswellenlänge 212nm in Abbildung 7.7 dargestellt.

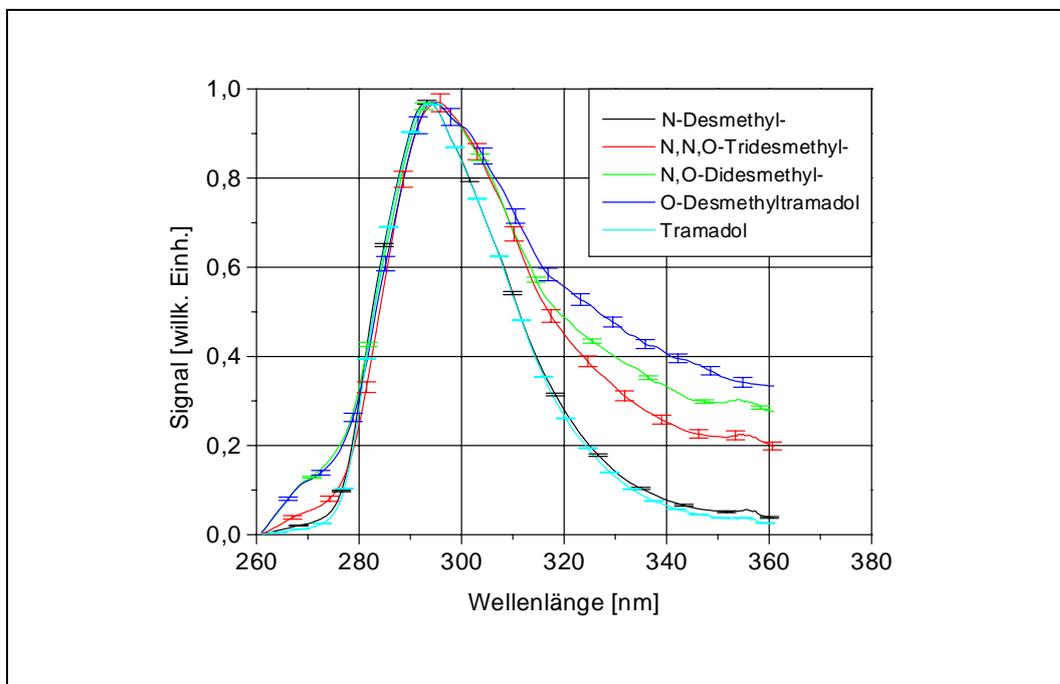


Abbildung 7.7: *Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von Tramadol und Metaboliten bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ in einer Kapillare, 50mM Boraxpuffer pH=10.65 (Küvette).*

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen³ wurden diese Messungen nicht aus einer Küvette, sondern aus einer gefluteten Kapillare aufgenommen, vgl. Abbildung 4.12, und die Laserleistung auf 0,1mJ/Puls reduziert. Das Lösungsmittel war ebenfalls ein 50mM Boraxpuffer mit pH=10.65. Aufgrund der unterschiedlichen Probenvolumina können die Intensitäten aus den Abbildungen 7.4 und 7.6 nicht miteinander verglichen werden.

Die Fluoreszenzen besitzen bei dieser Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ die gleiche spektrale Struktur wie in den Abbildungen 7.4 und 7.5. Die Fluoreszenzmaxima von Tramadol und N-Desmethyltramadol liegen unverändert bei 293nm. Die Maxima für die Substanzen O-Desmethyl-, N,O-Didesmethyl- und N,N,O-Tridesmethyltramadol liegen bei 294nm. Es ergeben sich somit leichte Verschiebungen der Fluoreszenzmaxima (von 296nm auf jetzt 294nm) zu kürzeren Wellenlängen gegenüber einer Anregung mit 270nm.

³Alle Lösungen wurden nur einmal verwendet, um Folgefehler z.B. durch Verunreinigungen ausschließen zu können.

Eine deutliche Änderung ergibt sich hinsichtlich der Fluoreszenzintensität: Die stärkste Fluoreszenz zeigt sich jetzt bei Tramadol, welche doppelt so groß wie bei N-Desmethyltramadol ist. Bei der Anregung mit 270nm wird bei N-Desmethyltramadol die größte Fluoreszenz beobachtet.

Bei den anderen Metaboliten weisen nur O-Desmethyl- und N,O-Didesmethyltramadol eine gleiche Intensität auf. In Bezug darauf ist die Fluoreszenz von N,N,O-Tridesmethyltramadol doppelt so groß.

Dieses Verhalten von Tramadol und N-Desmethyltramadol ist mit den Absorptionskoeffizienten allein nicht zu erklären. Diese sind bei beiden Wellenlängen für beide Stoffe im Rahmen der Fehlergrenzen gleich. Unter Berücksichtigung der fluoreszenzbeeinflussenden Parametern, wie z.B. der Temperatur und dem Lösungsmittel mit seiner Konzentration und seinem pH-Wert kann die Fluoreszenz kaum prognostiziert werden.

Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang das Ausbleichen der Substanzen. Dieser Effekt ist bei Messungen in der Kapillare größer als bei Messungen in der Küvette, wo ein Ausbleichen der Substanzen nicht beobachtet wurde. Mit einem Vorgriff auf die Ergebnisse des Kapitels 7.4 kann der Effekt des Ausbleichens allein die Intensitätsumkehr nicht erklären, da beide Substanzen in der Kapillare bei Bestrahlung mit UV-Licht gleich schnell an Fluoreszenzintensität verlieren.

Zusätzlich sind die molekularen Strukturen von Bedeutung, deren Unterschiede im Fall von Tramadol und N-Desmethyltramadol scheinbar gering sind (vgl. Anhang A) aber doch zu Änderungen in der Fluoreszenzstärke führen⁴ können.

Änderungen bei dem Wechsel der Anregungswellenlänge ergeben sich auch bei den Halbwertbreiten. Sie beträgt bei Tramadol und N-Desmethyltramadol 29nm und ist 4nm kleiner als bei einer Anregung mit 270nm. Bei O-Desmethyltramadol vergrößert sich die Halbwertsbreite um 13nm von 36nm auf jetzt 49nm. Im Fall von N,O-Didesmethyltramadol nimmt die Halbwertsbreite von 46nm (270nm) auf 44nm (212nm) ab und bei N,N,O-Tridesmethyltramadol nimmt sie von 40nm (270nm) auf 38nm (212nm) ab. Eine Vergrößerung der Halbwertsbreite ist somit nur bei O-Desmethyltramadol zu beobachten.

⁴ Eine Auflistung von Substituten an Benzolringen und deren Einfluß auf eine Fluoreszenzminderung oder -steigerung findet sich z.B. in [66].

7.1.2 Ausgewählte Arzneistoffe

In Abbildung 7.8 sind die Anregungs-/Emissionsspektren der in 50mM Phosphatpuffer, pH=4.6 gelösten Substanzen Verapamil, Propranolol, Salbutamol, Metoprolol und Fenoterol dargestellt. Auf der Horizontalen ist die Emissionswellenlänge und in der Vertikalen die Anregungswellenlänge aufgetragen. Die Spektren sind auf eine Konzentration von 10 μ g/ml normiert. Die Fluoreszenzstärke ist als Zahl der Fotoelektronen in einer Falschfarbendarstellung codiert, deren Werteverlauf für die dargestellten Spektren durch die dort angegebenen Farbskalen dargestellt ist. Die Abbildung 7.9 zeigt diese Spektren nach einer Normierung auf die Intensitätsmaxima und die für alle Stoffe geltende Farbskala.

Diese fünf Arzneistoffe zeigen, ebenso wie die A/E-Spektren von Tramadol und seinen Metaboliten, eine Fluoreszenz im Anregungsbereich zwischen 240nm und 270nm mit folgenden Merkmalen:

Mit Ausnahme von Verapamil ist der höchste Fluoreszenzwert bei einer Anregung mit $\lambda_{ex} = 270nm$ vorhanden. Die größte Emission zeigt Verapamil nach einer Anregung mit $\lambda_{ex} = 240nm$.

Allen Substanzen aus Abbildung 7.8 ist ebenfalls eine gleichmäßige Begrenzung der Fluoreszenz zu kurzen Wellenlängen bei Variation der Anregungswellenlänge gemeinsam, die einen Hinweis auf die aromatische Struktur der Moleküle gibt. Die Begrenzung verändert sich innerhalb des Spektrums und im Vergleich zu anderen Substanzen nur um wenige Nanometer. Die einzige Ausnahme davon bildet Propranolol, welches als Aromat mit zwei kondensierten Benzolringen eine Fluoreszenz größer als ca. 310nm emittiert und die größte Emission bei ca. 335nm zeigt. Eine Verschiebung des Emissionsspektrums zu größeren Wellenlängen deutet auf einen energetisch geringeren Abstand zwischen dem Grundzustand und dem ersten angeregten Zustand hin, als er bei den anderen Substanzen vorhanden ist. Damit ist eine Verschiebung der kurzwelligen Fluoreszenzgrenze verbunden, die im Fall von Propranolol zu längeren Emissionswellenlängen gerückt ist.

Weiterhin sind die Fluoreszenzen dieser Arzneistoffe viel stärker als bei Tramadol und seinen Metaboliten. Ein direkter Vergleich ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Pufferlösungen und pH-Werte nicht möglich.

Neben diesen Gemeinsamkeiten zeigen sich folgende Unterschiede in den Fluoreszenzen: Erstens sind bei einer Variation der Anregungswellenlänge von 240nm bis 270nm bei diesen Arzneistoffen Fluoreszenzminima bei ca. 245nm bis 250nm vorhanden, die bei Tramadol und seinen Metaboliten in Abbildung 7.2 nicht zu beobachten sind. Dort nimmt die Fluoreszenz nach einer Anregung von 270nm bis 240nm stetig ab.

Zweitens besitzt Salbutamol nach der Anregung mit einer Wellenlänge zwei getrennte Emissionsbereiche, von dem der eine zwischen 475nm und 365nm und der andere zwischen 365nm und 275nm liegt.

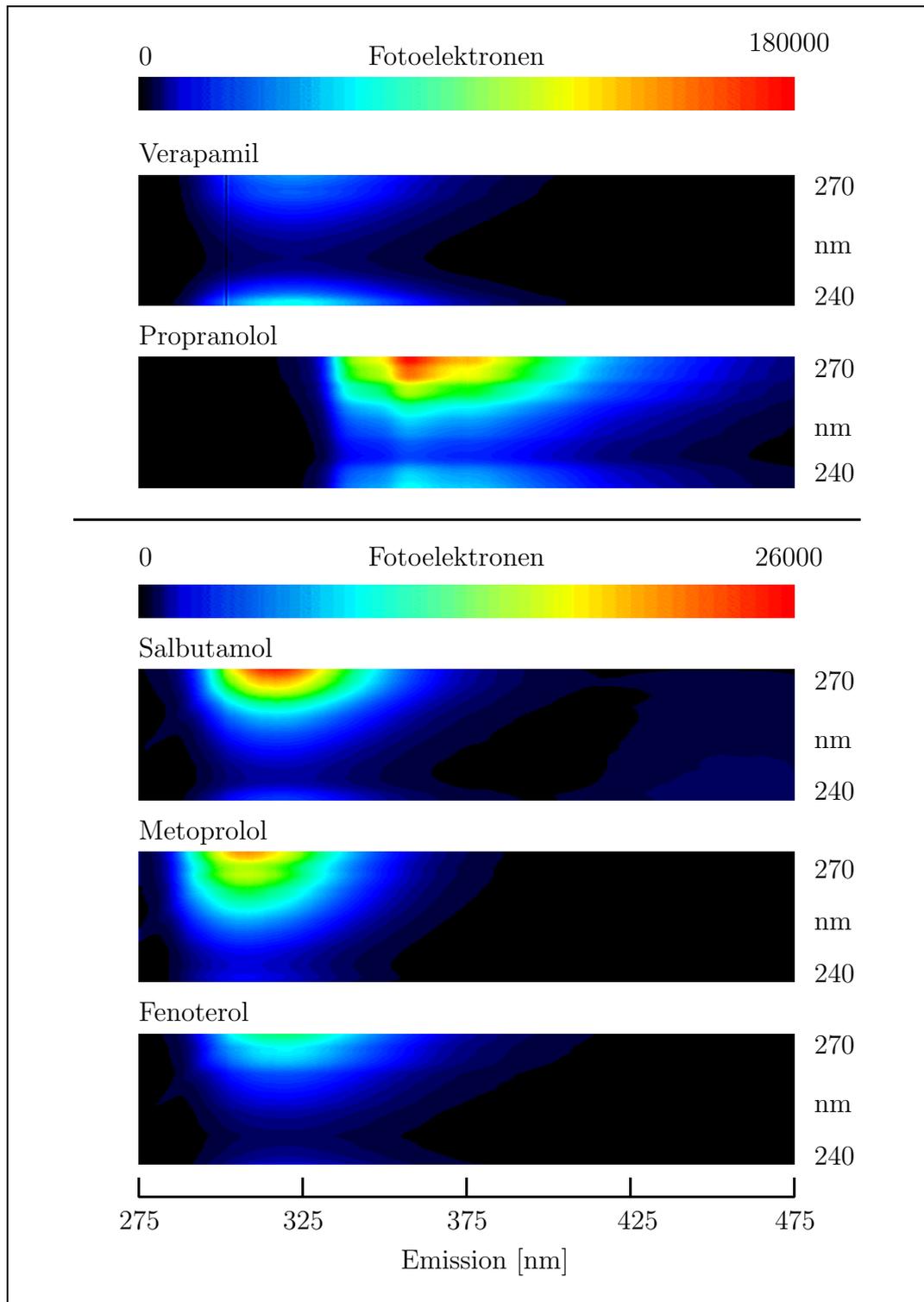


Abbildung 7.8: Anregungs-/Emissionsspektren von Arzneistoffen, gelöst in 50mM Phosphatpuffer, pH=4.6 (Küvette), 0.2mJ/Puls, Normierung auf 10µg/ml.

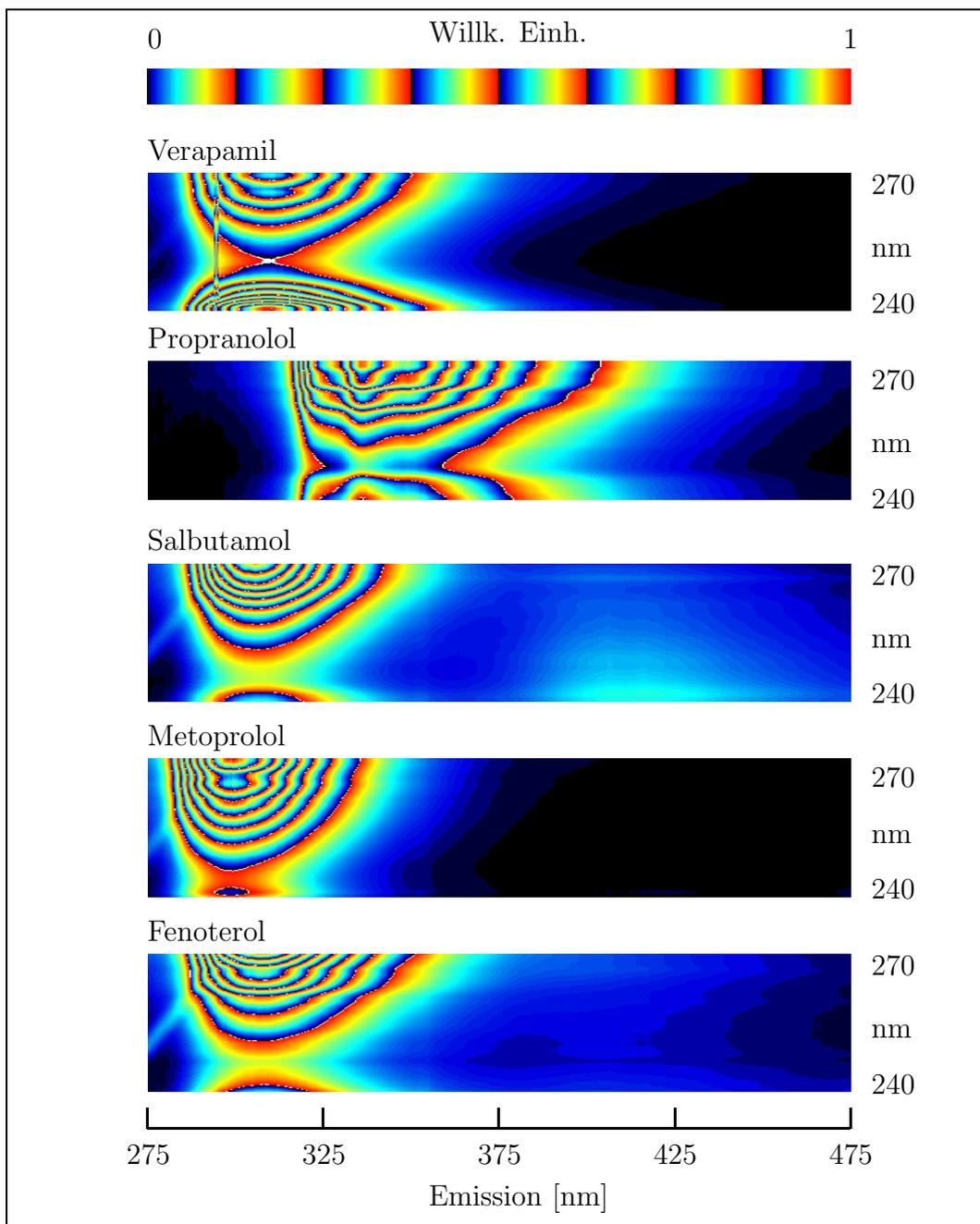


Abbildung 7.9: oben: Farbskala, darunter: Intensitätsnormierte Anregungs-/Emissionsspektren von Arzneistoffen, gelöst in 50mM Phosphatpuffer, $pH=4,6$.

Diese Zweiteilung des Spektrums von Salbutamol ist bei den anderen Substanzen nicht zu beobachten. Anhand dieses A/E-Spektrums kann Salbutamol eindeutig aus der Menge der anderen hier gezeigten A/E-Spektren identifiziert werden.

In der Abbildung 7.10 sind die Fluoreszenzspektren von Metoprolol, Norefensin und Fenoterol nach einer Anregung mit 212nm in der Kapillare gezeigt.

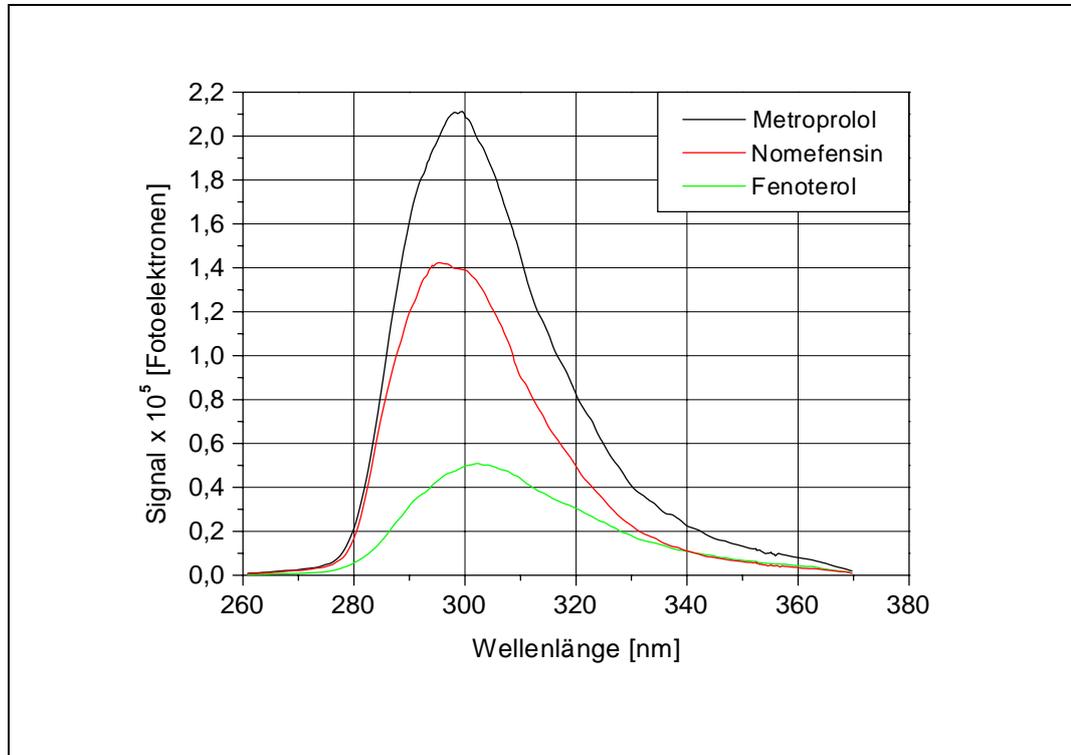


Abbildung 7.10: Fluoreszenzspektren von Metoprolol, Norefensin und Fenoterol bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ in einer Kapillare, 50mM Phosphatpuffer, Normierung auf $10\mu\text{g/ml}$.

Die Fluoreszenzspektren der Substanzen Propranolol, Verapamil, Synephrin und Salbutamol nach einer Anregung mit 212nm in der Kapillare sind in der Abbildung 7.11 dargestellt.

Die Substanzen in den Abbildungen 7.10 und 7.11 weisen Fluoreszenzen für Wellenlängen größer als ca. 270nm auf und zeigen mit Ausnahme von Propranolol einen ähnlichen Verlauf. Dieser ist durch ein Maximum im Bereich 295nm bis 305nm und einer abnehmenden Fluoreszenz bis ca. 340nm gekennzeichnet und ähnelt den A/E-Spektren von Tramadol und den Metaboliten in Abbildung 7.8.

Die Fluoreszenz der Substanz Propranolol zeichnet sich durch ein Maximum bei 290nm aus, welches zwischen 245nm und 255nm auf der kurzwelligen und zwischen 272nm und 278nm auf der langwelligen Seite von einem Plateau be-

grenzt wird. Diese Struktur ist nur bei Propranolol und bei keiner anderen der hier untersuchten Substanzen vorhanden.

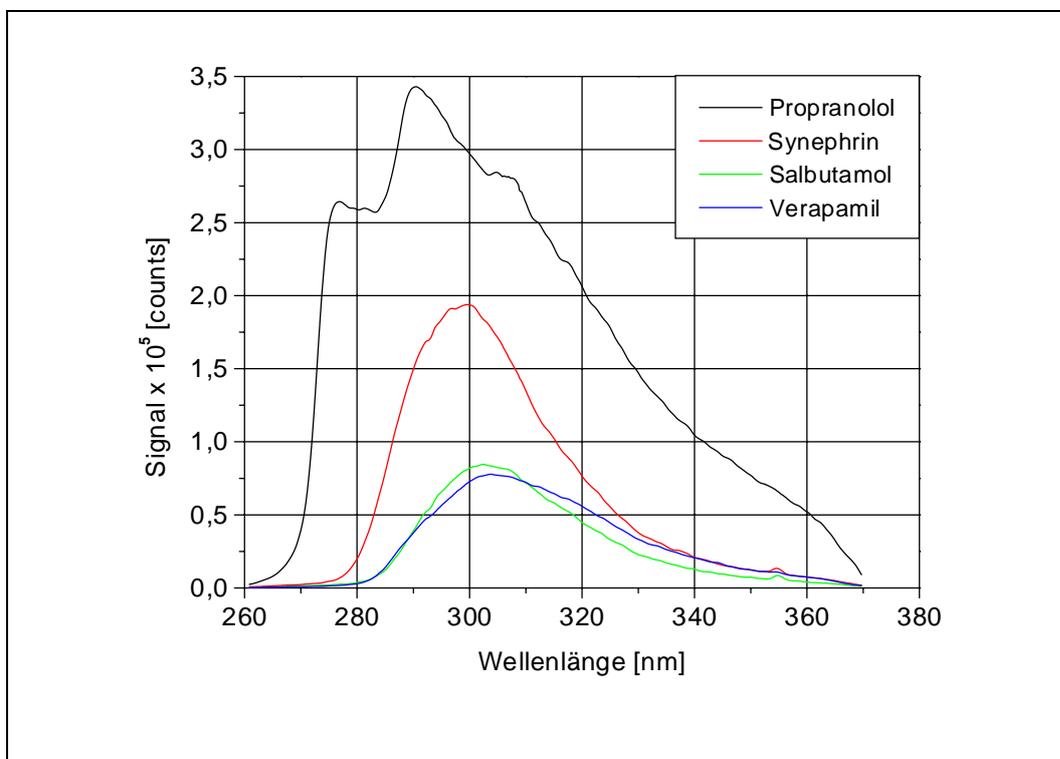


Abbildung 7.11: Fluoreszenzspektren von Propranolol, Synephrin, Salbutamol und Verapamil bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ in einer Kapillare, 50mM Phosphatpuffer, Normierung auf $10\mu\text{g/ml}$.

Gegenüber der Anregung mit 270nm zeigt sich hier eine deutliche spektrale Verschiebung der Fluoreszenzemission zu kürzeren Wellenlängen. Das Maximum der Emission verschiebt sich von 355nm nach einer Anregung mit 270nm zu 290nm nach einer Anregung mit 212nm. Dieser ausgeprägte Einfluß der Anregungswellenlänge auf das Emissionsspektrum kann bei den anderen Substanzen nicht beobachtet werden und ist auf die Molekülstruktur zurückzuführen: Propranolol besitzt als einzige der hier untersuchten Substanzen zwei kondensierte Benzolringe, die anderen Stoffe haben kein kondensiertes Ringsystem, vgl. Anhang A. Damit sind Unterschiede in der elektronischen Struktur der Moleküle verbunden, die hier sichtbar werden.

Eine Darstellung dieser Spektren nach einer Normierung auf ihr Fluoreszenzmaximum ist in Abbildung 7.12 für die Substanzen Metoprolol, Norefensin und Fenoterol und in Abbildung 7.13 für die Stoffe Propranolol, Synephrin, Salbutamol und Verapamil gegeben.

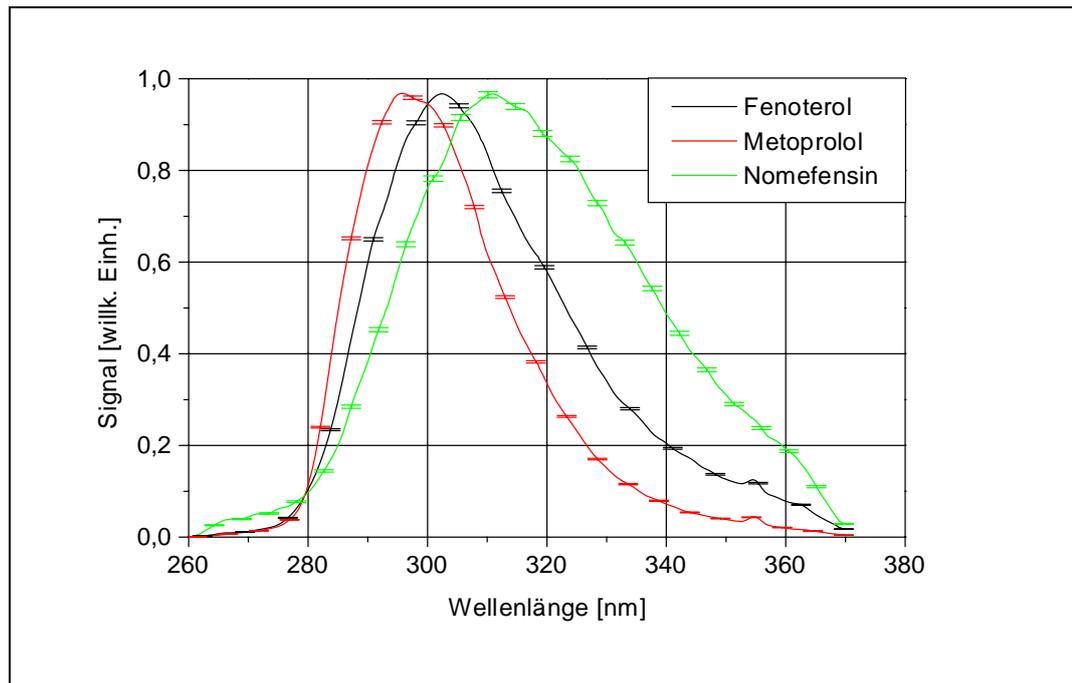


Abbildung 7.12: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von Metoprolol, Norefensin und Fenoterol bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ in einer Kapillare, 50mM Phosphatpuffer.

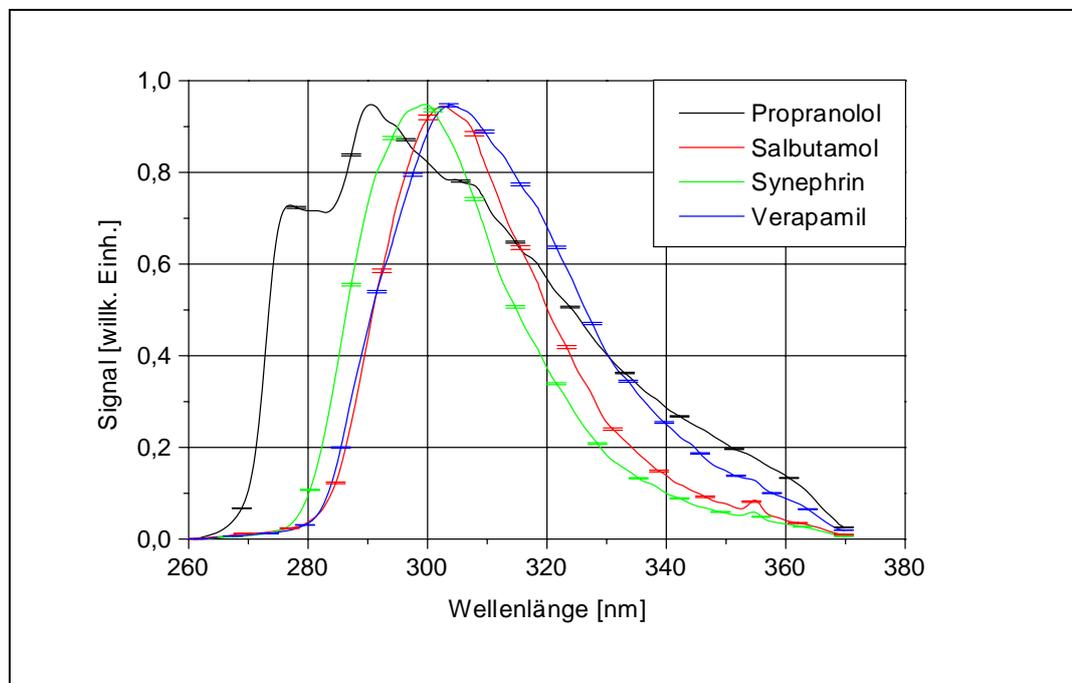


Abbildung 7.13: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von Propranolol, Salbutamol, Synephrin und Verapamil bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ in einer Kapillare, 50mM Phosphatpuffer.

Die Fluoreszenzspektren dieser Substanzen weisen nach einer Anregung mit der Wellenlänge 212nm Maxima bei unterschiedlichen Wellenlängen auf, die in der Tabelle 7.1 zusammengefaßt sind:

Substanz	Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums
Fenoterol	302nm
Metoprolol	296nm
Nomefensin	311nm
Propranolol	290nm
Salbutamol	302nm
Synephrin	299nm
Verapamil	303nm

Tabelle 7.1: *Wellenlängen der Fluoreszenzmaxima ausgewählter Arzneistoffe nach einer Anregung mit 212nm.*

Eine spektrale Fluoreszenzverteilung anderer Art ist bei Daunorubicin zu beobachten. Dieser Aromat aus der Reihe der Anthracycline hat zwei voneinander getrennte Fluoreszenzbereiche. Der eine liegt im UV-Bereich und die andere im sichtbaren Spektralbereich [135]. Durch eine UV-Anregung wird eine Fluoreszenz in beiden Spektralbereichen verursacht. Eine Anregung mit sichtbarer Strahlung führt zu einer Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich.

Die Abbildung 7.14 zeigt die Fluoreszenzemissionen von 9µg/ml Daunorubicin-HCl in 0.1mM Na_2HPO_4 -Puffer pH=9.0 in einer Kapillare, die der Signalsumme von fünf Laserpulsen mit je 0.2mJ/Puls entsprechen (die anderen Bilder sind mit einer Summation von 10 Laserpulsen erstellt worden). Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Kameraobjektives auf das Spektrometer abgebildet, vgl. Abbildung 4.1.

Ausgangspunkt für die Wahl der Wellenlängen 252nm und 488nm war das Absorptionsspektrum in Abbildung 6.5. Dort ist ein relatives Maximum der Absorption für die Wellenlänge 252nm abzulesen, welches größer als das Maximum bei 488nm ist.

Die auf die Intensitätsmaxima normierten Spektren von Daunorubicin aus Abbildung 7.14 sind in Abbildung 7.15 gezeigt.

Die Emissionen zeigen unabhängig von der Anregungswellenlänge eine identische Struktur über den Bereich von ca. 150nm. Die Verwendung des Kantenfilters OG530 unterdrückt die Fluoreszenz bei Wellenlängen kürzer als 530nm und vermindert sie bis ca. 560nm. Die Emissionen zeigen ein Maximum bei 560nm, welches nach einer Anregung mit $\lambda_{ex} = 488nm$ um den Faktor 2.5 größer ist als das nach der Anregung mit $\lambda_{ex} = 252nm$. Die Fluoreszenz reicht mit abnehmender Intensität bis zu Wellenlängen größer als 700nm.

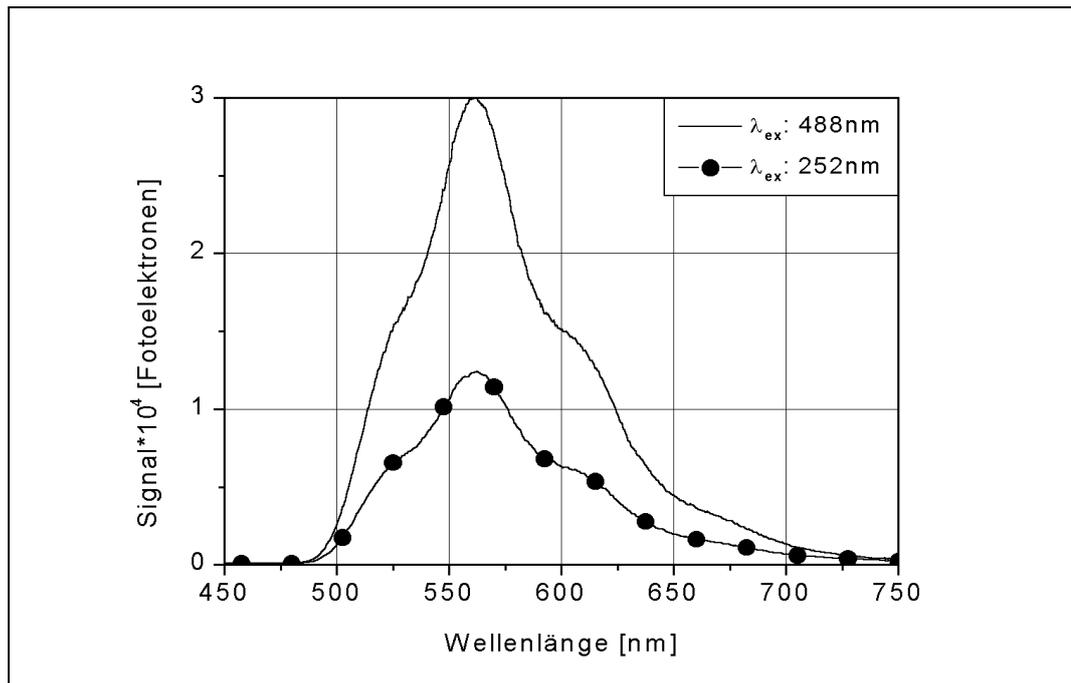


Abbildung 7.14: Fluoreszenzspektrum von Daunorubicin $9\mu\text{g/ml}$ in 0.1mM Na_2HPO_4 -Puffer $\text{pH}=9.0$ in einer Kapillare mit Kantenfilter OG530.

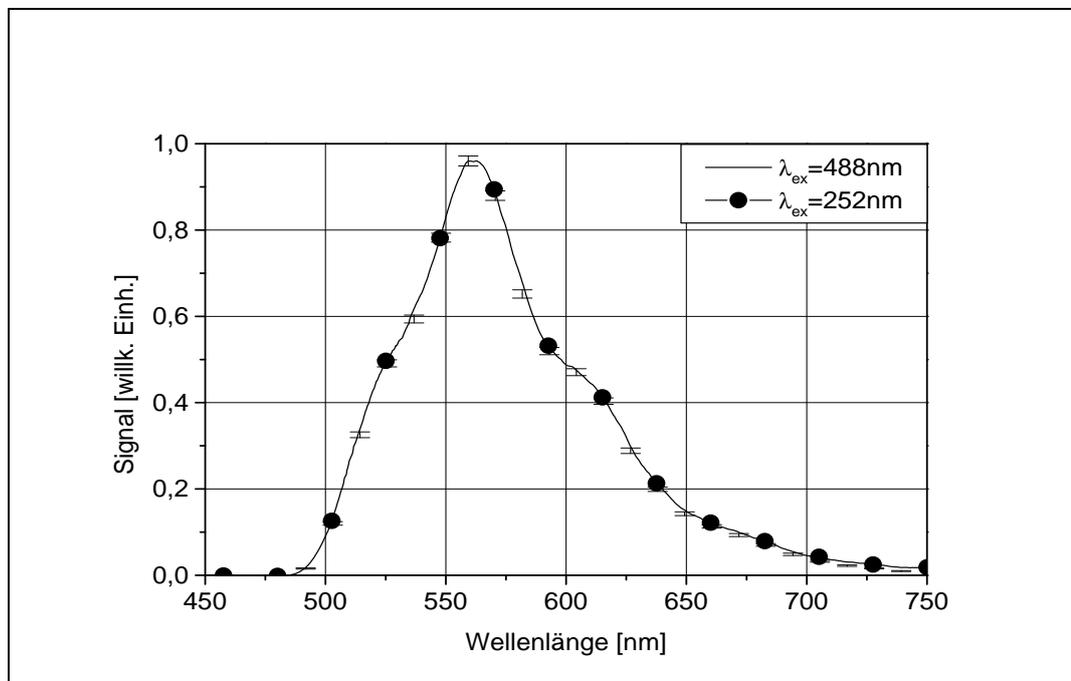


Abbildung 7.15: Intensitätsnormiertes Fluoreszenzspektrum von Daunorubicin in 0.1mM Na_2HPO_4 -Puffer $\text{pH}=9.0$ in einer Kapillare mit Kantenfilter OG530.

Die Ergebnisse dieser Messung bestätigen die auf Seite 74 dargestellten Ausführungen:

Unterschiede in den Absorptionskoeffizienten spiegeln sich nicht zwingend in entsprechenden Fluoreszenzen wieder. Ein Absorptionsmaximum muß nicht zu einem Maximum der Fluoreszenzemission führen. Dieses muß mit einem A/E-Spektrum ermittelt werden.

Die beiden Emissionsspektren unterscheiden sich nach einer Intensitätsnormierung im Rahmen der Fehlergrenzen nicht und sind somit für die Anregungswellenlänge 488nm und der deutlich kürzeren UV-Wellenlänge 252nm identisch.

Die Abbildung 7.16 zeigt ein mit dem ersten OPO-Lasersystem gemessenes A/E-Spektrum von $9\mu\text{g/ml}$ Daunorubicin gelöst in $0.1\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, $\text{pH}=9$ mit 30% Acetonitril in einer Küvette bei 0.2mJ/Puls .

Auf der Horizontalen ist die Emissionswellenlänge von 280nm bis 520nm und auf der Vertikalen ist die Anregungswellenlänge von 240nm bis 280nm eingetragen.

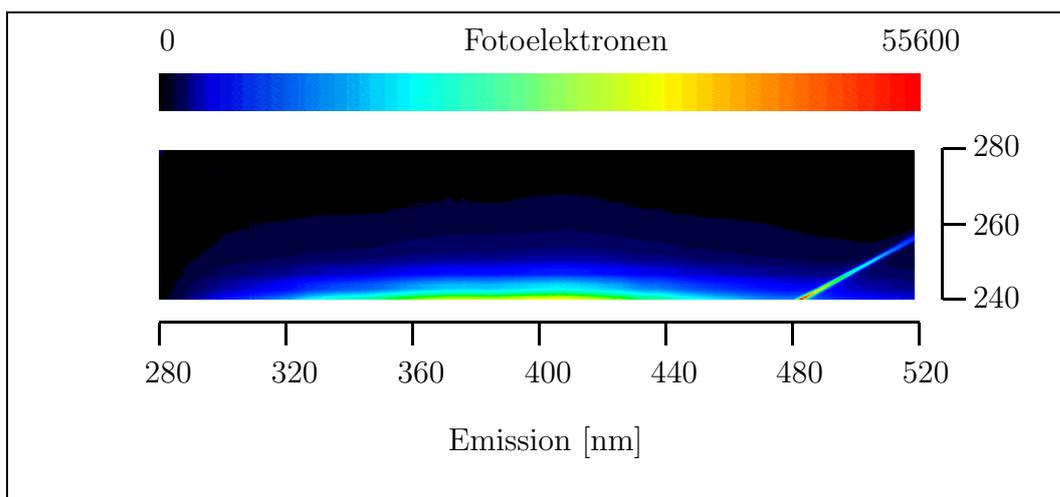


Abbildung 7.16: *A/E-Spektrum von $9\mu\text{g/ml}$ Daunorubicin-HCl gelöst in $0.1\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, $\text{pH}=9.0$ mit 30% Acetonitril in einer Küvette.*

Im rechten Bildrand überschneiden sich das linienförmige, in zweiter Ordnung beobachtete Rayleigh-Signal und das Fluoreszenzsignal, welches bei Variation der Anregungswellenlänge von 240nm auf 280nm stetig zunimmt.

Der größte Fluoreszenzwert ist in diesem A/E-Spektrum bei der Anregungswellenlänge 240nm gegeben und im Vergleich zu dem Fluoreszenzsignal bei einer Anregung mit 252nm um den Faktor 8 größer. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß der Absorptionskoeffizient bei 240nm kleiner als bei 252nm ist.

Die bisherigen A/E-Spektren sind mit Anregungswellenlängen $\lambda_{ex} > 240\text{nm}$ aufgenommen worden. In Verbindung mit einer Frequenzverdopplung gestattet der „grüneSpiegelsatz des OPO-Resonators aus dem ersten OPO-Lasersystem die Variation der Anregungswellenlänge von 220nm bis 240nm.

Somit ist ein Wellenlängenbereich zugänglich, bei dem alle hier vermessenen Substanzen eine Absorption aufweisen. Die zeitlich begrenzte Nutzungsdauer des ersten OPO-Systems hatte zur Folge, daß nur von Idarubicin ein A/E-Spektrum mit diesen Wellenlängen aufgezeichnet werden konnte.

Die Abbildung 7.17 zeigt ein A/E-Spektrum von $10\mu\text{g/ml}$ Idarubicin in einer Küvette mit einem Anregungsbereich von 220nm bis 240nm in der Vertikalen. Die Horizontale gibt die Emission zwischen 480nm und 720nm wieder und entspricht dem sichtbaren Spektrum bei Daunorubicin. Als Lösungsmittel für die $10\mu\text{g/ml}$ Idarubicin-Lösung wurde ein 0.1M NaHPO_4 -Puffer mit $\text{pH}=9.0$ und 30% Acetonitril verwendet. Die Laserleistung betrug 0.1mJ/Puls und der Spektrometerspalt war auf 0.1mm eingestellt. Der apparative Aufbau für die Abbildung der Fluoreszenz entspricht dem der vorherigen Messung an Daunorubicin.

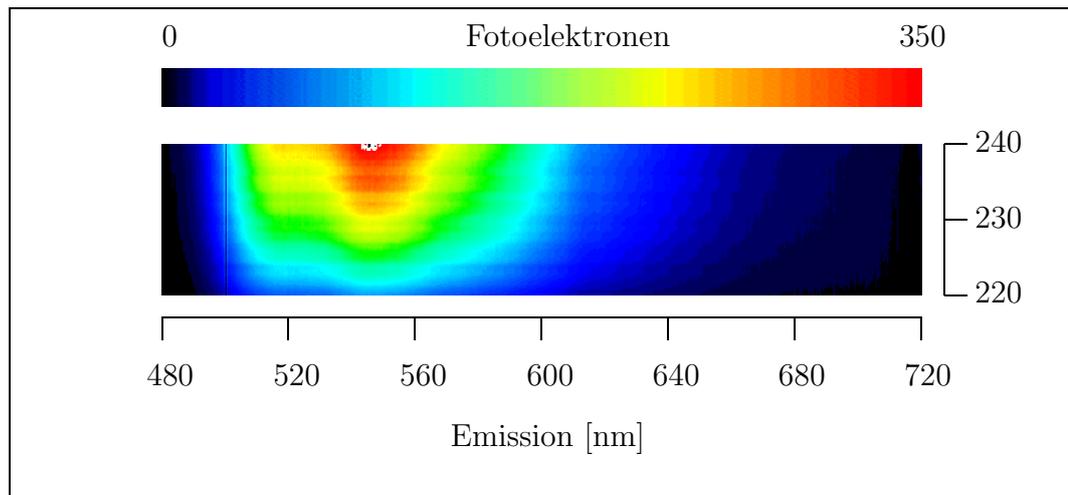


Abbildung 7.17: *A/E-Spektrum von $10\mu\text{g/ml}$ Idarubicin-HCl gelöst in Na_2HPO_4 -Puffer, $\text{pH}=9.0$ mit 30% Acetonitril in einer Küvette.*

Die Fluoreszenzstärke nimmt bei einer Anregung von 220nm bis 240nm stetig zu und erreicht bei 240nm ihren höchsten Wert. Die Emission verändert ihre spektrale Lage dabei nicht und hat ein Fluoreszenzmaximum bei 550nm. Die Fluoreszenz zeigt eine ähnliche Struktur wie Daunorubicin und ist Ausdruck des verwandten Molekülaufbaus.

Unter der willkürlichen Auswahl von Arzneistoffen fand sich nur ein Wirkstoff, der nicht ausreichend fluoreszierte: Dimetinden.

Im durchgeführten Bereich für die A/E-Spektren von 240nm bis 270nm (im Maximum der Absorption, vgl. Abbildung 6.4) konnte bis zu einer Konzentration von $10\mu\text{g/ml}$ (!) keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Ein Nachweis von Dimetinden bei Konzentrationen bis $5\mu\text{g/ml}$ ist in der CZE mit UV-Absorption möglich [134] und wurde deshalb bei den Fluoreszenzmessungen nicht weiter verfolgt.

In weiten Wellenlängenbereichen ist die Fluoreszenzintensität nicht aus den entsprechenden Absorptionskoeffizienten zu prognostizieren, da sie keine Information über die beteiligten Relaxationsprozesse und deren relativen bzw. absoluten Anteile enthalten.

Die Fluoreszenz reagiert sensibel auf Umgebungsparameter und muß immer im konkreten Fall untersucht werden. Die Angabe eines Absorptionsspektrums liefert den Ausgangspunkt für Fluoreszenzmessungen, wobei der für eine Anregung mögliche Wellenlängenbereich angegeben wird.

Die Erstellung von A/E-Spektren über den Bereich von 40nm bzw. 20nm gibt Information über die Stärke und die spektrale Verteilung der Fluoreszenz, so daß eine geeignete Wellenlänge oder Wellenlängen für LIF-Untersuchungen ausgewählt werden können.

In diesem Sinne sind Absorptionsmessungen und A/E-Spektren zwei Informationsquellen, die sich gegenseitig ergänzen.

7.2 Polarisationsmessungen

Das Rayleigh-Signal kann durch die Wahl der Polarisationsebene des Lasers reduziert werden. Bei der Ausrichtung dieser Polarisationsebene muß überprüft werden, ob die Fluoreszenz polarisiert ist und mit verminderter Intensität detektiert wird.

Zur Überprüfung der Fluoreszenzpolarisation an Tramadol und den Metaboliten wurde ein apparativer Aufbau verwendet, wie er in Abbildung 2.3, Seite 14, skizziert ist: Die senkrecht polarisierte Strahlung des Farbstofflasers wurde durch eine Küvette geführt, die mit den Substanzen gefüllt wurde. Ein Spiegel bildete die Fluoreszenz durch ein als Analysator wirkendes Glan-Prisma auf den Eintrittsspalt des Spektrometers ab. Die Fluoreszenzsignale nach Drehung des Prismas um 90° wurden entsprechend der Gleichung 2.5 ausgewertet.

Für diese Messungen waren alle Substanzen in 50mM Boraxpuffer pH=10.65 bei einer Temperatur von 21°C gelöst. Die Abbildung 7.18 zeigt exemplarisch die beiden Fluoreszenzspektren von Tramadol-HCl mit den Intensitäten I_{\parallel} und I_{\perp} nach Drehung des Prismas.

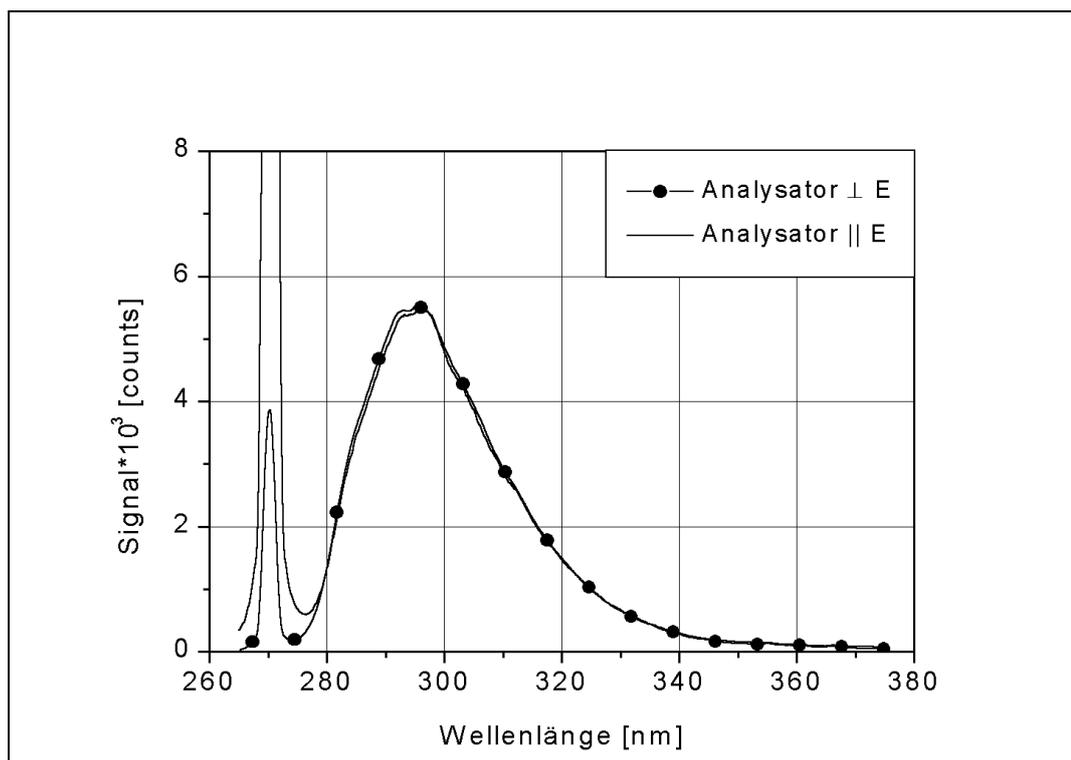


Abbildung 7.18: *Polarisationsspektren von Tramadol nach Anregung mit 270nm. –: Analysator parallel, •: Analysator senkrecht zur Polarisationsebene des Lasers.*

Die beiden Fluoreszenzspektren unterscheiden sich am deutlichsten in der Stärke des Rayleighsignals, welches ohne depolarisierende Effekte parallel zum Laserlicht polarisiert ist und bei Wahl einer dazu senkrechten Beobachtungsebene um den Faktor acht reduziert werden kann.

Aus diesen Messungen ergeben sich unter Berücksichtigung der Fluoreszenz im Bereich 280nm bis 360nm für Tramadol und die Metaboliten Polarisationsgrade mit Werten kleiner als $9 \cdot 10^{-3}$, die im Bereich der Meßungenauigkeit liegen. Somit wird bei diesen Substanzen keine Fluoreszenzpolarisation beobachtet.

Für die weiteren Messungen an der Kapillare wurde eine horizontale Polarisationsebene der Laserstrahlung gewählt und das Prisma vor dem Spektrometer aufgrund des geringen Öffnungswinkels und einer erhöhten Streustrahlung im Spektrometer durch die Nähe zur Kapillare entfernt.

Speziell für diese Substanzen und unter Ausdehnung der Annahme einer nicht polarisierten Fluoreszenz auf die anderen ausgewählten Arzneistoffe ist die Reduktion des Rayleigh- und Ramansignals durch Drehung der Laserpolarisationsebene gerechtfertigt. Eine Minderung des Fluoreszenzsignals ist damit nicht verbunden.

7.3 Einfluß des pH-Wertes

Für die erfolgreiche Trennung eines Substanzgemisches kann in der CZE der pH-Wert von entscheidender Bedeutung sein (vgl. Kapitel 3 und 8.4) und zugleich kann der pH-Wert Einfluß auf die Stärke der Fluoreszenz ausüben. Die CZE-Messungen für Tramadol und seine Metabolite wurden bei $\text{pH}=10.65$ durchgeführt.

Um den Einfluß des pH-Wertes auf die Fluoreszenzstärke aufzuzeigen sind in den Abbildungen 7.19 und 7.20 die auf eine Konzentration von $10\mu\text{g}/\text{ml}$ normierten und mit einem $266\text{nm}-0^\circ$ -Spiegel als optischen Filter aufgenommenen Fluoreszenzmessungen aus einer Küvette für Tramadol und seine Metabolite bei zwei Einstellungen des pH-Wertes dargestellt: $\text{pH}=9.6$ und $\text{pH}=10.65$.

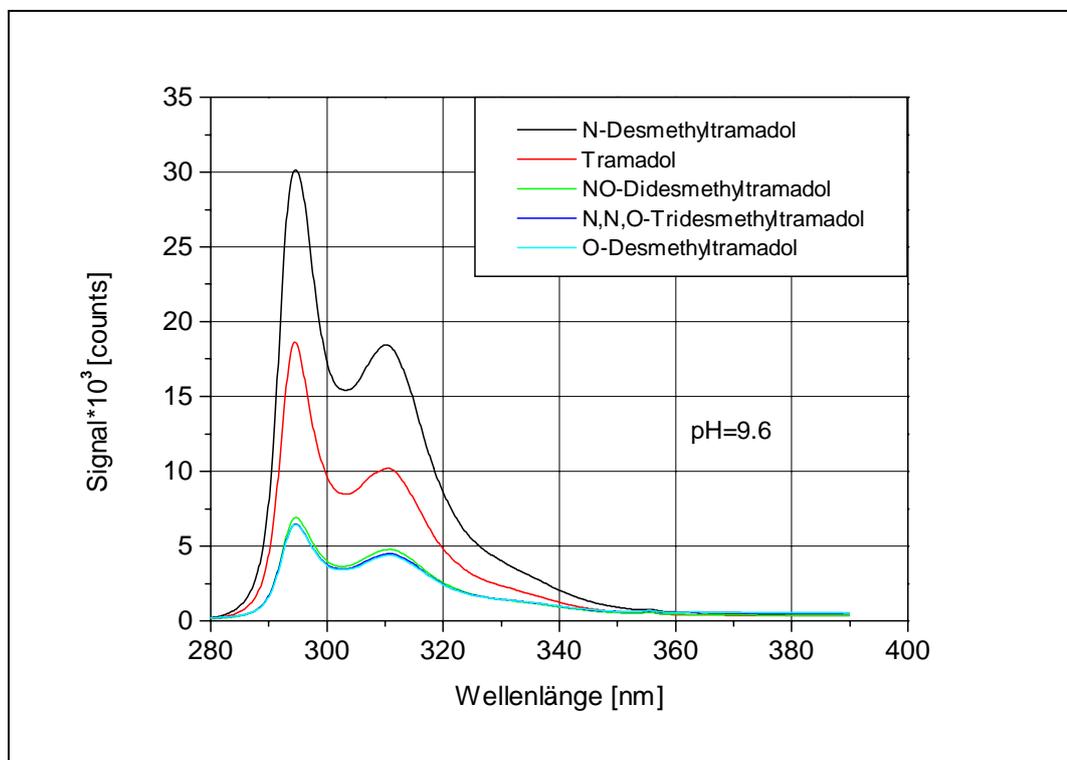


Abbildung 7.19: Fluoreszenz von Tramadol und seinen Metaboliten aus einer Küvette. Anregungswellenlänge $\lambda = 270\text{nm}$; 50mM Boraxpuffer, $\text{pH}=9.6$. Normierung auf $10\mu\text{g}/\text{ml}$ und Verwendung eines optischen Filters ($266\text{nm}-0^\circ$ -Spiegel).

Ein Vergleich der beiden Abbildungen zeigt, daß der pH-Wert nur Einfluß auf die Fluoreszenzstärke und nicht auf den spektralen Verlauf der Emissionen nimmt.

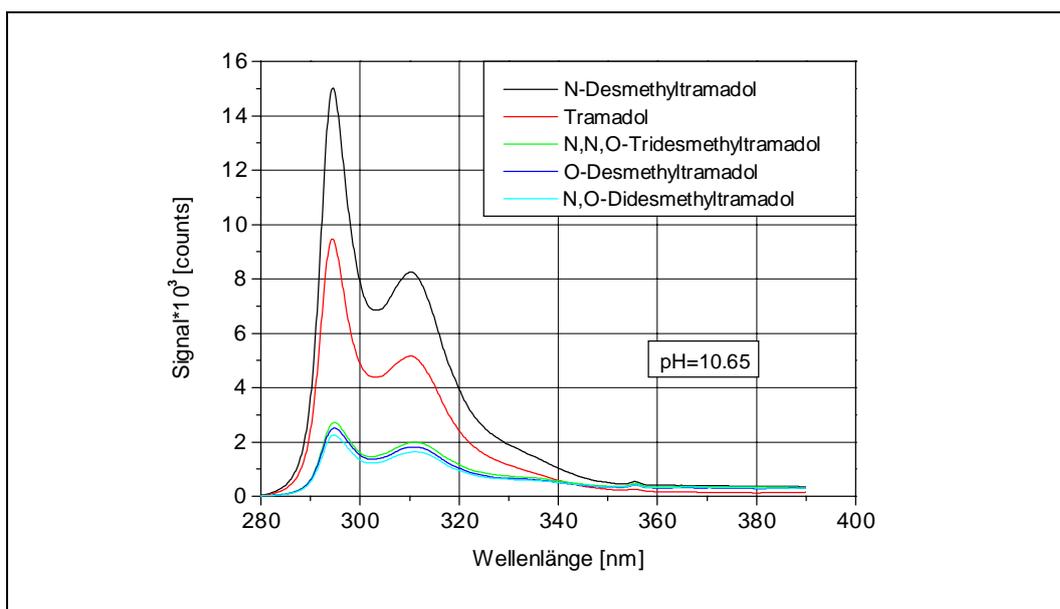


Abbildung 7.20: Fluoreszenz von Tramadol und seinen Metaboliten aus einer Küvette. Anregungswellenlänge $\lambda = 270\text{nm}$; 50mM Boraxpuffer, $\text{pH}=10.65$. Normierung auf $10\mu\text{g/ml}$ und Verwendung eines optischen Filters ($266\text{nm}-0^\circ$ -Spiegel).

In beiden Fällen gilt:

Die Fluoreszenzstärke ist für N-Desmethyltramadol am größten und Tramadol zeigt die zweitstärkste Fluoreszenz. Die Metabolite O-Des-, N,O-Dides- und N,N,O-Tridesmethyltramadol besitzen die geringste Fluoreszenz und unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Fluoreszenzstärken.

Ein Vergleich der beiden Meßreihen zeigt bei N-Des-Tramadol und Tramadol eine Verringerung der Fluoreszenzintensitäten um ein Drittel beim Übergang von $\text{pH}=9.6$ auf $\text{pH}=10.65$. Die Fluoreszenz der phenolischen Metabolite wird um die Hälfte verringert, wenn der pH-Wert entsprechend geändert wird. Diese Messung ist in Übereinstimmung mit der Theorie für pH-Wert abhängige Fluoreszenz bei Phenolen. Die Fluoreszenzstärke nimmt bei Steigerung des pH-Wertes über den pK_S -Wert ab und kann bei pH-Werten größer 12 zu einer völligen Fluoreszenzlöschung führen.

Dementsprechend sollten Fluoreszenzmessungen bei geringen pH-Werten durchgeführt werden. Die Parameter einer Trennung in der CZE können jedoch hohe pH-Werte erfordern, so daß die Ergebnisse für Fluoreszenzstärken bei Variation des pH-Wertes und einem LIF-Nachweis nicht isoliert betrachtet werden dürfen.

Die Abbildungen 7.21 und 7.22 enthalten die jeweils auf die Emissionsmaxima normierten Spektren aus den Abbildungen 7.19 und 7.20.

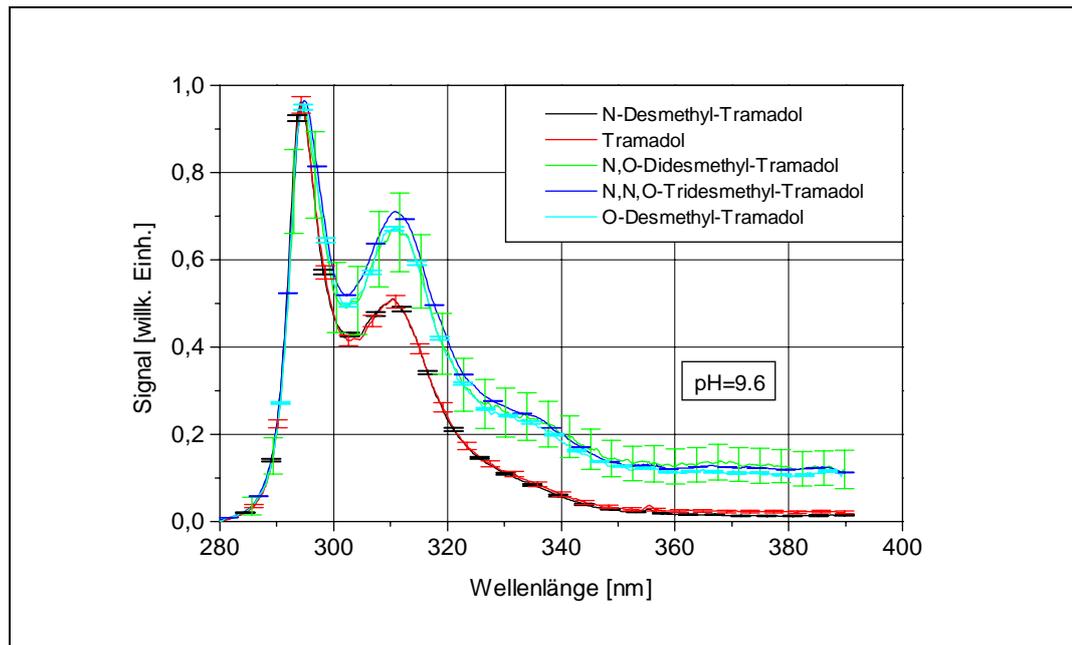


Abbildung 7.21: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von Tramadol und seinen Metaboliten aus einer Küvette. Anregungswellenlänge $\lambda = 270\text{nm}$; 50mM Boraxpuffer, $\text{pH}=9.6$. Verwendung eines optischen Filters ($266\text{nm}-0^\circ$ -Spiegel).

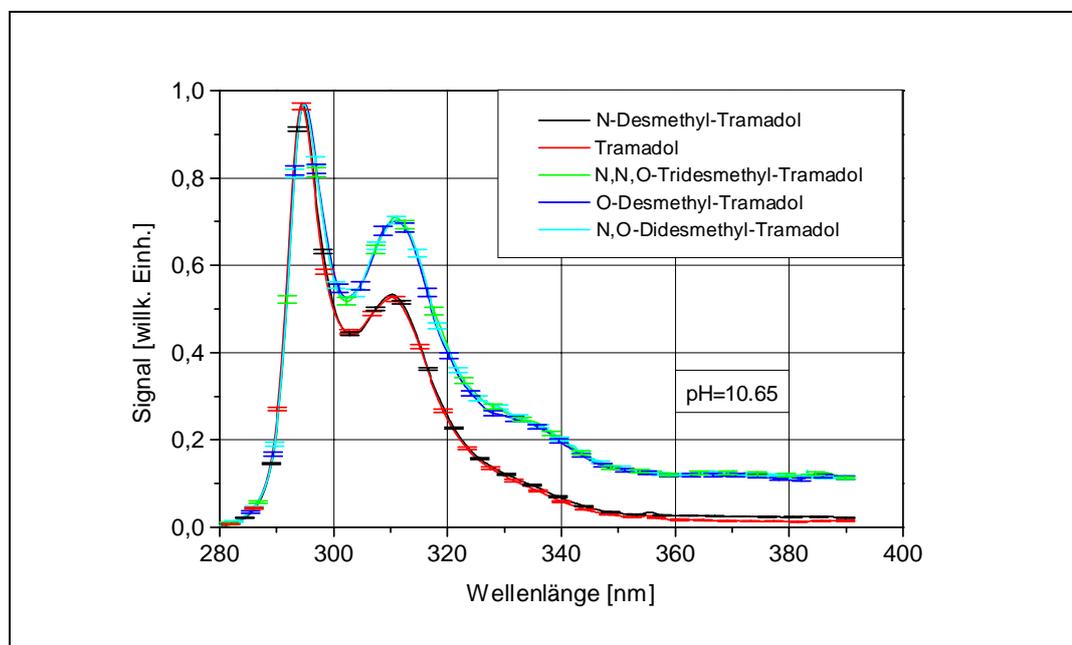


Abbildung 7.22: Intensitätsnormierte Fluoreszenzspektren von Tramadol und seinen Metaboliten aus einer Küvette. Anregungswellenlänge $\lambda = 270\text{nm}$; 50mM Boraxpuffer, $\text{pH}=10.65$. Verwendung eines optischen Filters ($266\text{nm}-0^\circ$ -Spiegel).

Die auf die Intensitätsmaxima normierten Spektren zeigen bei beiden pH-Werten ähnliche Emissionen für diese Substanzen. Im Rahmen der Fehlergrenzen sind Tramadol und N-Desmethyltramadol nicht zu unterscheiden. Das gemeinsame Fluoreszenzmaximum liegt bei 294nm bzw. bei 310nm.

Die Metaboliten O-Des-, N,O-Dides- und N,N,O-Tridesmethyltramadol zeigen ebenfalls im Rahmen der Fehlergrenzen eine identische Emission. Die Fluoreszenzmaxima liegen bei 294nm bzw. bei 310nm.

Diese beiden Gruppen unterscheiden sich durch die Intensität des Fluoreszenzmaximums bei 310nm, welches für Tramadol und N-Desmethyltramadol geringer als bei den anderen Metaboliten ist.

Somit wird durch die Verwendung dieses Filters eine Unterscheidung dieser Substanzen verhindert. Für weitere Messungen wurde deshalb der Kantenfilter verwendet (vgl. Kapitel 5.1), der eine Identifizierung von Tramadol und N-Desmethyltramadol bzw. den anderen Metaboliten O-Desmethyl-, N,O-Didesmethyl und N,N,O-Desmethyltramadol anhand der verschiedenen Fluoreszenzmaxima erlaubt.

7.4 Ausbleichen

Das Fluoreszenzsignal kann verstärkt werden, wenn bei einer Erhöhung der anregenden Strahlungsleistung das Fluoreszenzsignal nicht in Sättigung ist. Häufig führt jedoch eine Erhöhung der UV-Leistung zu einer Verminderung des Fluoreszenzsignals, wie es bei diesen Messungen in der Kapillare beobachtet worden ist. In diesen Fällen bewirkt die Absorption von UV-Licht eine Änderung der chemischen Struktur. Diese kann durch den Aufbruch von stabilen Bindungen oder die Anregung von chemischen Reaktionen hervorgerufen werden. Dabei sind Ein-Photon- und Mehr-Photonen-Prozesse zu unterscheiden.

Bei Ein-Photon-Prozessen reicht die Energie eines Photons ($270\text{nm} \hat{=} 4.59\text{eV}$) für die entsprechende Änderung aus. Bei Mehr-Photonen-Prozessen sind mindestens zwei Photonen für solch einen Einfluß notwendig, die in Gebieten hoher Leistungsdichte zur Verfügung gestellt werden. Die hohe Leistungsdichte kann durch eine starke Fokussierung und/oder gepulste Strahlung hervorgerufen werden. Beide Bedingungen sind bei den Fluoreszenzmessungen in der Kapillare erfüllt.

Bei der Erstellung der AE-Spektren in einer Küvette wurde auf eine Fokussierung der Laserstrahlung verzichtet. Somit ist nur der Einfluß der gepulsten Strahlung maßgeblich, da die Laserstrahlung mit einer Blende auf einen Durchmesser von 3mm beschränkt wurde (0.2mJ/Puls). Das entspricht einer Leistungsdichte von $70\mu\text{J}/\text{cm}^2$. Dabei sind Mehr-Photonen-Prozesse sehr unwahrscheinlich, und eine Veränderung in der Intensität oder der Struktur der Fluoreszenz konnte bei keiner der Proben nachgewiesen werden, wie Fluoreszenzvergleiche vor und nach der Messung belegen.

Anders sind die Verhältnisse bei Messungen in der Kapillare mit einem apparativen Aufbau, wie er in Abbildung 4.12 skizziert ist. Die Laserstrahlung wurde in das Innere der Kapillare fokussiert, und der Fokus erreichte einen Durchmesser von weniger als $100\mu\text{m}$. Bei einer Strahlhöhe von 3mm ergibt sich eine Leistungsdichte von $6700\text{W}/\text{m}^2$, welche ca. 950 mal größer als die der nicht fokussierten Strahlung ist.

Nachfolgend werden Meßreihen für unterschiedliche Laserleistungen an Tramadol und seinen Metaboliten sowie an ausgewählten Arzneistoffen vorgestellt, die den Prozeß des Ausbleichens dokumentieren:

Die Kapillare wurde mit einer Substanz geflutet und mit dem Beginn der UV-Bestrahlung mit 212nm bei 10Hz die Fluoreszenz in einer Folge von zehn Bildern aufgezeichnet. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spiegel auf das Spektrometer abgebildet und anschließend spektral und räumlich zerlegt von der CCD-Kamera detektiert. Bei jedem Bild wurde die Fluoreszenz von zehn Laserpulsen summiert, und eine Mittelung über das gesamte Fluoreszenzsignal ergibt die Werte der Datenpunkte.

In der Abbildung 7.23 sind die Meßreihen für Tramadol und seine Metabolite dargestellt (alle Stoffe waren in 50mM Boraxpuffer pH=10.65 gelöst). Auf der Horizontalen sind die Anzahl der Bilder im Abstand von 1.2 Sekunden und auf der Vertikalen das mittlere Pixelsignal [counts/Pixel] aufgetragen.

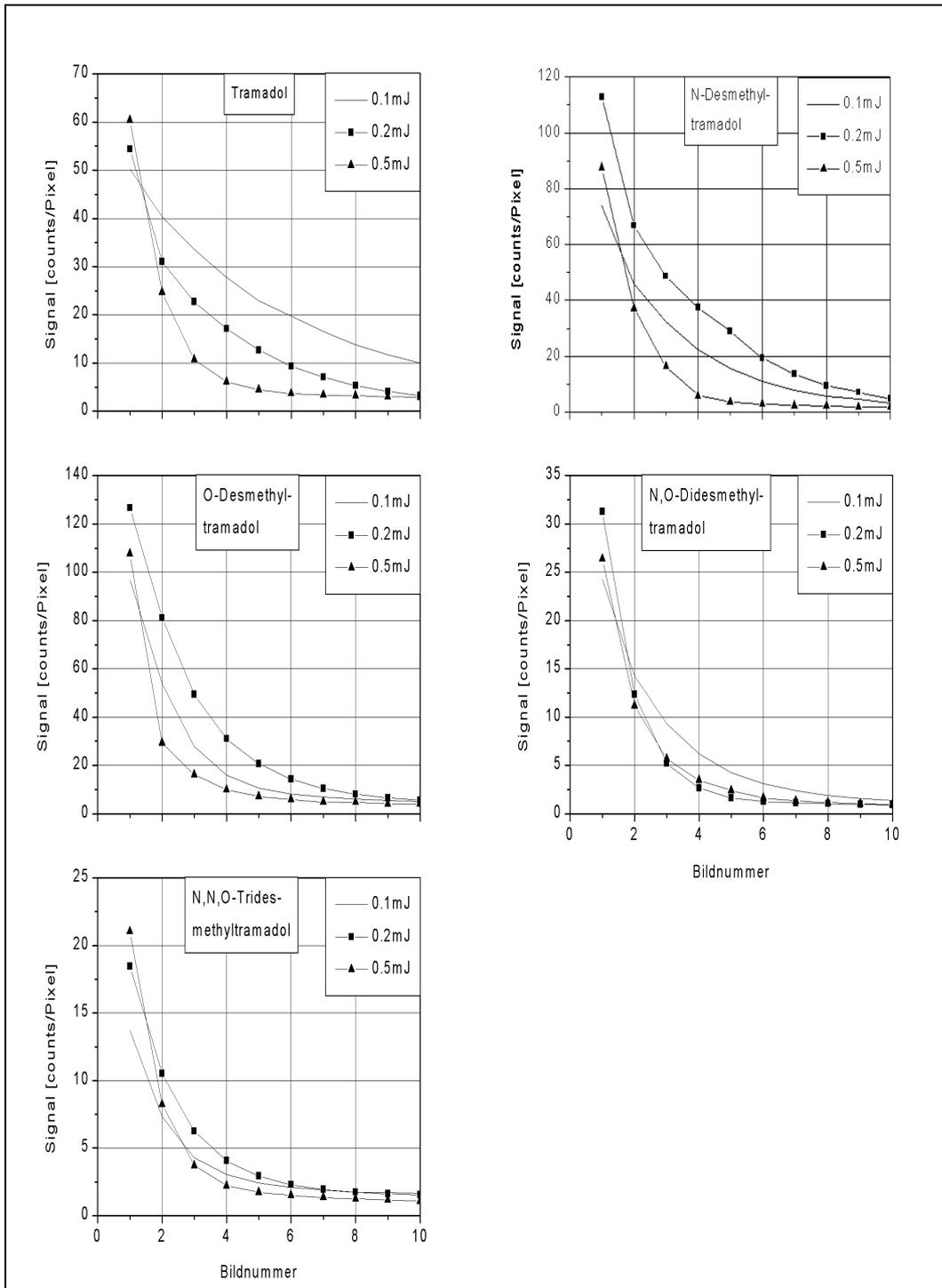


Abbildung 7.23: Ausbleichen von Tramadol und Metaboliten in der Kapillare bei verschiedenen Laserleistungen.

In der Abbildung 7.24 sind die Fluoreszenzsignale für die Arzneistoffe Propranolol, Verapamil, Metoprolol, Fenoterol und Salbutamol aufgetragen. Diese Stoffe waren in 50mM Phosphatpuffer pH=4.6 gelöst.

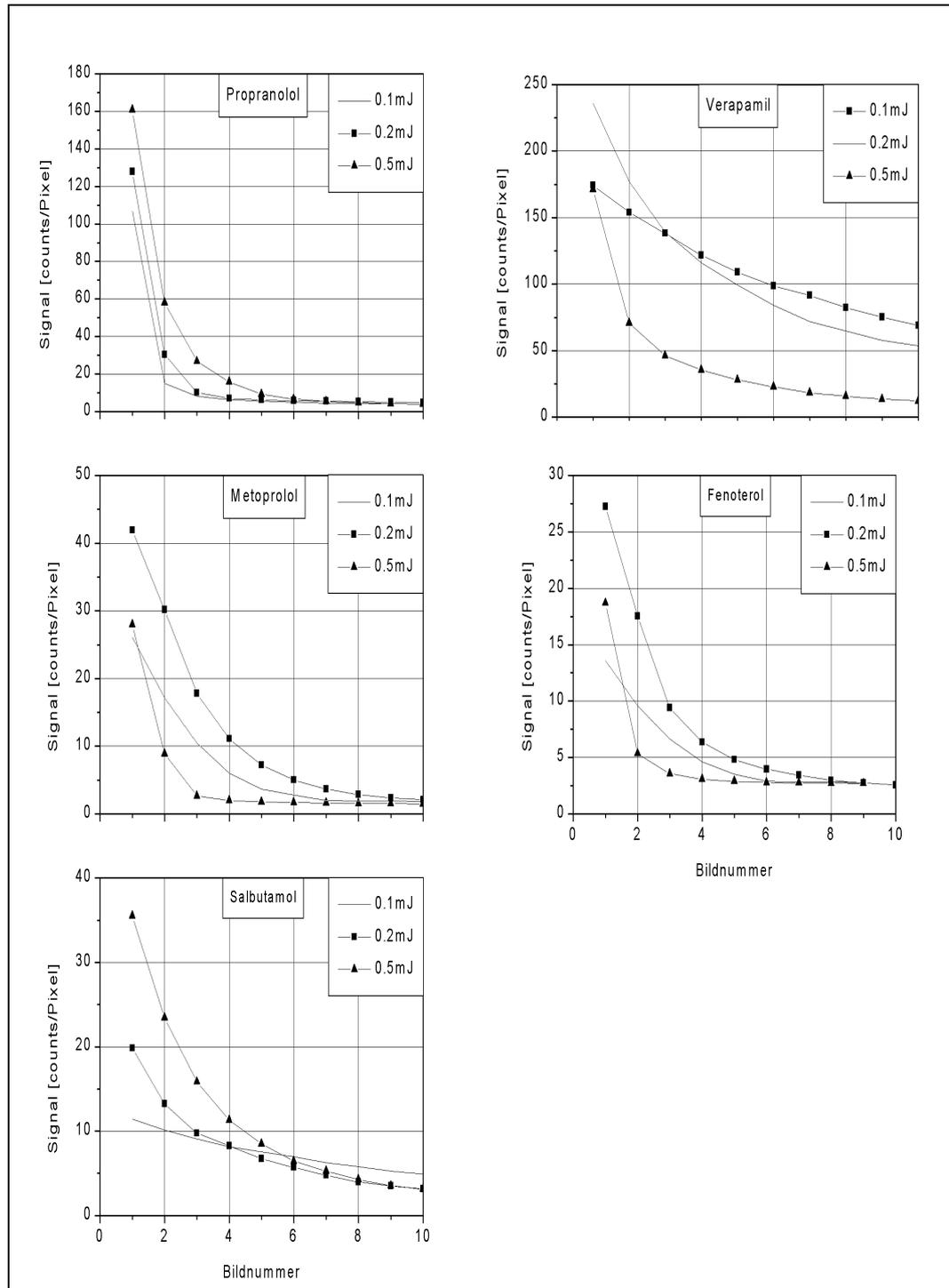


Abbildung 7.24: Ausbleichen von ausgewählten Arzneistoffen in der Kapillare bei verschiedenen Laserleistungen.

Die Summation über 10 Laserpulse entspricht dem Modus der Datenaufnahme während der CZE-Messungen, bei denen die Proben aufgrund ihrer Migration durch das Detektionsvolumen für maximal drei Sekunden nachgewiesen werden können.

Die Daten zeigen ein hohes Maß an Ausbleichen: Das Fluoreszenzsignal einer Meßreihe ist unabhängig von der Laserleistung bei keiner der Substanzen in zwei aufeinanderfolgenden Bildern gleich groß und nimmt ab. Die Erhöhung der Laserleistung beschleunigt die Signalverminderung und führt nicht zu einem proportionalen Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Bei der kleinsten hier verwendeten Laserleistung von 0.1mJ/Puls ist das Fluoreszenzsignal nach 10 Sekunden bei vielen Substanzen erloschen, und es wird lediglich der Untergrund mit ca. 5 counts/Pixel gemessen. Eine Ausnahme davon ist bei Salbutamol mit 7 counts/Pixel, bei Tramadol mit 10 counts/Pixel und bei Verapamil mit 70 counts/Pixel zu beobachten. Die Signalverminderung zwischen dem ersten und zweiten Datenpunkt kann bis zu 60% betragen (vgl. Propranolol in Abbildung 7.24).

Eine Verdopplung der Laserleistung auf 0.2mJ/Puls führt bei allen Substanzen in den Abbildungen 7.23 und 7.24 zu einem Anwachsen des Fluoreszenzsignals zu Beginn der Meßreihe und kann nur bei Fenoterol mit einer entsprechenden Verdopplung des Signals beobachtet werden. Bei Salbutamol und Metoprolol steigt die Signalarhöhe um ca. 70%, und bei den anderen Substanzen ist eine Signalarhöhung um höchstens 40% zu verzeichnen.

Bei dieser Laserleistung ist das Fluoreszenzsignal nach 10 Sekunden mit Ausnahme von Verapamil bei allen Substanzen erloschen. Das Signal von Verapamil beträgt nach diesem Zeitintervall noch 55 counts/Pixel.

Bei allen Substanzen ist der Prozeß des Ausbleichens beschleunigt, so daß das Signal in zwei aufeinanderfolgenden Bildern gegenüber den Meßreihen mit 0.1mJ/Puls schneller abnimmt.

Eine weitere Erhöhung der Laserleistung auf 0.5mJ/Puls zeigt bei keiner Substanz eine proportionale Verstärkung des Fluoreszenzsignals zu Beginn der Meßreihe und lediglich bei vier Substanzen ein Anwachsen des Signals gegenüber den Daten, die bei 0.2mJ/Puls gemessen worden sind. Eine Signalsteigerung ist bei Salbutamol um 75%, bei Tramadol um 10%, bei N,N,O-Tridesmethyltramadol um 20% und bei Propranolol um 23% zu beobachten.

Bei den anderen Substanzen ist das Fluoreszenzsignal bei 0.5mJ/Puls geringer als das bei 0.2mJ/Puls. Ein Rückgang des Signals auf die Werte der Daten, die mit 0.1 mJ/Puls gewonnen worden sind, ergibt sich bei Synephrin und bei Verapamil.

Dieses Verhalten ist mit dem schnellen Ausbleichungsprozeß und der Summation des Fluoreszenzsignals über 10 Laserpulse für einen Datenpunkt zu erklären:

Eine Erhöhung der Laserleistung hat eine entsprechende proportionale Steigerung des Fluoreszenzsignals nach dem ersten Laserpuls zur Folge, wenn keine Signalsättigung vorherrscht. Nach der Bestrahlung der Probe mit dieser Leistung ist ein Teil der Substanz ausgebleicht und steht einer neuen LIF nicht zur Verfügung. Eine Summation des Fluoreszenzsignals über 10 Laserpulse kann somit ein geringeres Signal ergeben, wenn die Signalerhöhung in Folge der gestiegenen Laserleistung durch das vermehrte Ausbleichen aufgewogen wird. Die Signalmindering in zwei aufeinanderfolgenden Bildern ist bei der Bestrahlung mit 0.5mJ/Puls bei allen Substanzen am größten und nimmt bei Verringerung der Laserleistung ab.

Diese Messungen zeigen die uneinheitlichen Verhältnisse bezüglich der Fluoreszenzstärke bei Variation der anregenden Laserleistung. Eine Signalskalierung mit der Laserleistung ist nur bedingt möglich und im Einzelfall auf ihre Zulässigkeit zu überprüfen. Aufgrund der beobachteten Signalmindering bei vielen Substanzen nach einer Anregung mit 0.5 mJ/Puls wurde für die folgenden Meßreihen in der CZE die Laserleistung auf 0.2mJ/Puls festgelegt.

Kapitel 8

Kapillarezonenelektrophorese

Die Anwendung der CZE und Möglichkeiten einer UV-LIF-Detektion werden in diesem Kapitel an mehreren Messungen vorgestellt.

Im ersten Teil werden Ergebnisse von Messungen an der Substanz Daunorubicin dargestellt, die die Verwendung einer spektral nicht aufgelösten UV-LIF-Detektion ermöglicht.

Im zweiten Teil werden typische Kamerabilder vorgestellt, die eine Migration einer Probe durch das abgebildete Kapillarvolumen zeigen.

Anschließend wird im dritten Teil skizziert, wie die typische Darstellungsart der Meßergebnisse bei der CE im Form von Elektropherogrammen erstellt wird.

Im vierten Teil werden dann spektral aufgelöste Messungen an dem Arzneistoff Tramadol und seinen Metaboliten vorgestellt, wobei die Parameter für die erfolgreiche Trennung eines Substanzgemisches im Vordergrund stehen.

Der Zusammenhang zwischen der aufgegebenen Konzentration und dem Fluoreszenzsignal am Beispiel von Tramadol wird im fünften Teil gezeigt. Ergebnisse dieser Untersuchungen haben Einfluß auf die Bestimmung der Nachweisgrenzen in Abschnitt 9.

Der sechste Teil dieses Kapitels verdeutlicht den Einfluß des Puffers und der Kapillare in Form von Untergrundfluoreszenzen auf die Fluoreszenzmessungen.

Die angegebenen Pufferarten, -konzentrationen und pH-Werte ergeben sich aus den CZE-Bedingungen.

8.1 Spektral nicht aufgelöste Messungen

Als Beispiel einer spektral nicht aufgelösten Kapillarelektrophorese dient die folgende Messung an Daunorubicin, welche mit dem in Abbildung 4.1 skizzierten Aufbau durchgeführt worden ist.

Daunorubicin ist ein Molekül mit vier kondensierten Benzolringen und zeigt im UV- und im sichtbaren Spektralbereich eine Absorption (vgl. Abbildung 6.5). Die Anregung erzeugt unabhängig von der Wellenlänge 252nm oder 488nm

eine Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich mit gleicher Struktur, wie sie in Abbildung 7.14 dargestellt ist. Das hat den Vorteil, daß die Fluoreszenz mit einem Maximum bei 560nm nach einer Anregung hinreichend weit von der UV-Wellenlänge entfernt ist und bei einer spektral integralen Detektion nicht durch die Verwendung optischer Filter vermindert wird, die die Anregungswellenlänge unterdrücken. Bei der Anregung mit 252nm kann das Streu- und Rayleighlicht durch das Abbildungsobjektiv, welches kein UV-Licht dieser Wellenlänge transmittiert, hinreichend reduziert werden. Ein Kantenfilter OG530 unmittelbar vor dem Bildverstärker unterdrückt andere Wellenlängen, die über das Objektiv abgebildet werden.

Die Abbildung 8.1 zeigt eine mit H_2O gefüllte Kapillare bei der Bestrahlung mit der Wellenlänge 488nm (aus dem ersten OPO-Lasersystem, 0.8mJ/Puls) und 20-facher Vergrößerung. Das Bild entspricht einem Längsschnitt entlang der Kapillare, die horizontal im Bild liegt. Der Innenbereich i der Kapillare mit 50 μ m Durchmesser, sowie der obere und untere Rand mit dem Durchmesser a können unterschieden werden.

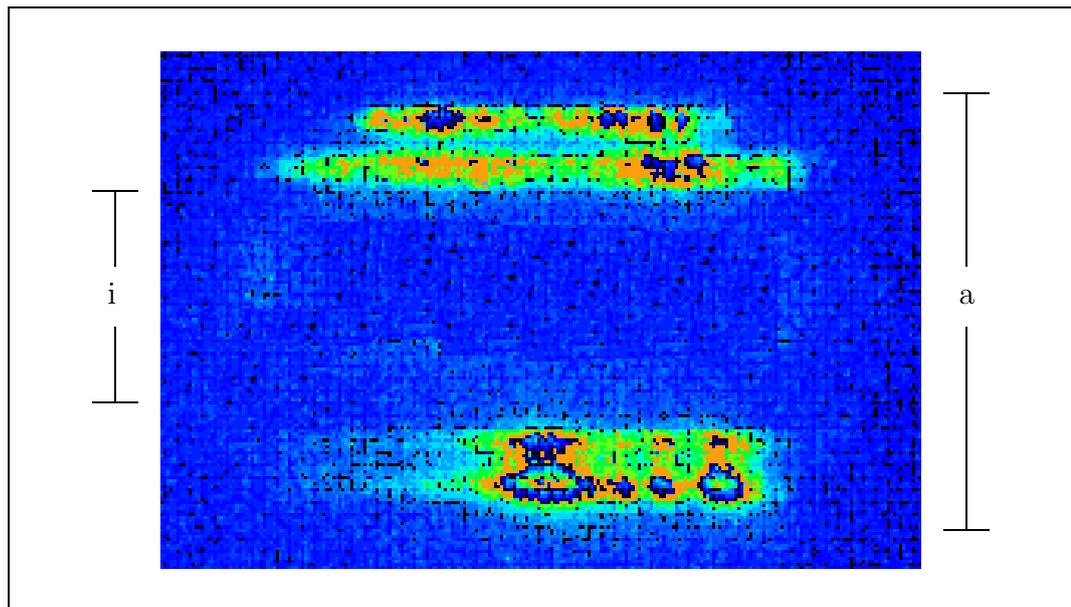


Abbildung 8.1: *Streu- und Rayleighlicht (488nm, 0.8mJ/Puls, Kantenfilter OG530) als Längsschnitt mit räumlicher Auflösung durch eine Kapillare mit Innenbereich i und Außenbereich a .*

In dem Bild wurde keine Fluoreszenz der Kapillare detektiert, sondern Streulicht, welches durch den verwendeten Kantenfilter OG530 nicht vollständig unterdrückt worden ist (Die Verwendung eines Spektrometers bestätigte diese Beobachtung, bei der keine Fluoreszenz detektiert werden konnte). Die Größe

des dargestellten Bereiches ist nicht durch die Abbildungsoptik begrenzt, sondern durch die Abmessungen des Laserstrahls, der hier einen Durchmesser von ca. $170\mu\text{m}$ besitzt.

Die unterschiedlichen Intensitäten am Rand der Kapillare sind auf Inhomogenitäten des Laserstrahlprofil und möglicherweise auch auf Verunreinigungen des Quarzes zurückzuführen.

Die Abbildung 8.2 zeigt die Detektion des Fluoreszenzsignals von Daunorubicin (1ng/ml in $50\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer) nach einer Anregung mit 252nm des ersten OPO-Lasersystems bei der Elektrophorese als Folge von fünf Bildern, die im Abstand von $1,2$ Sekunden aufgenommen worden sind.

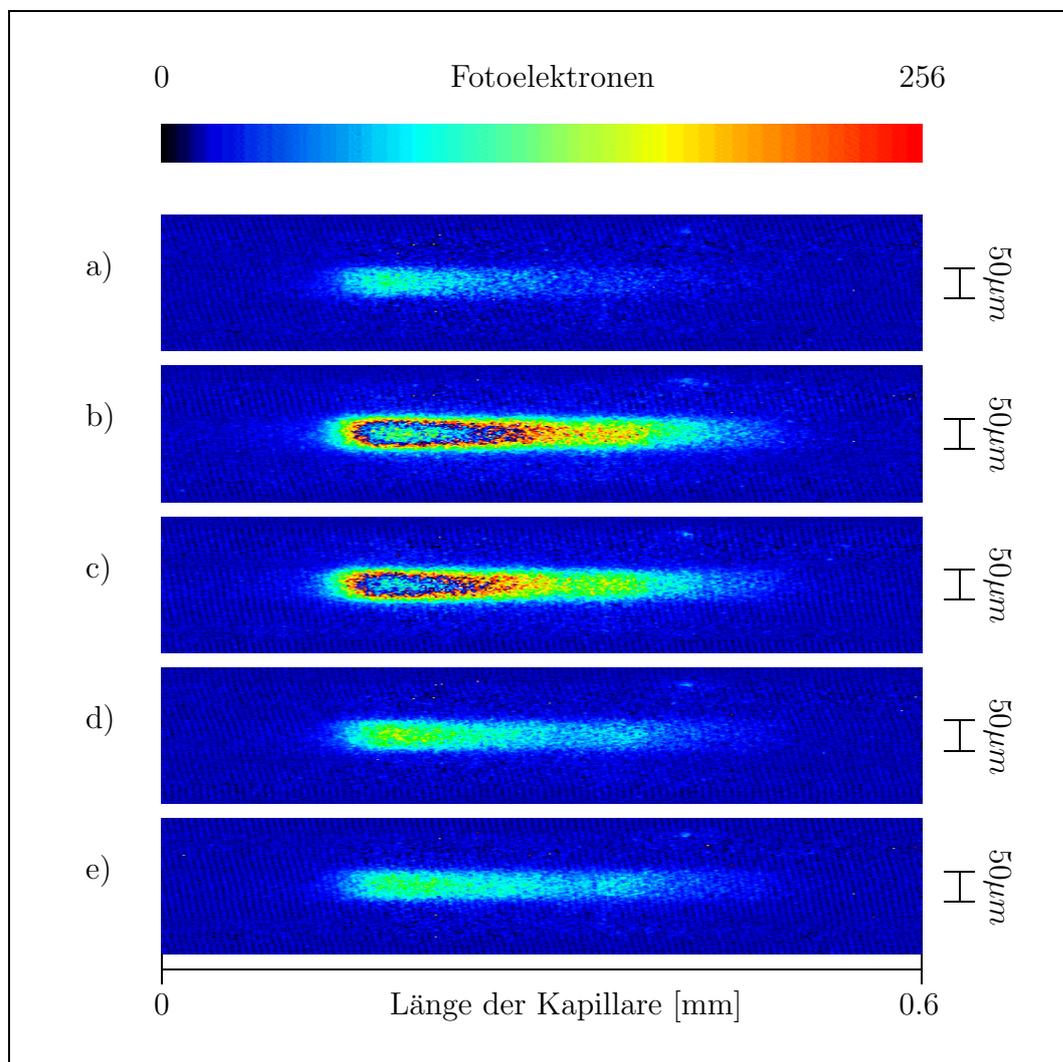


Abbildung 8.2: *Elektrophorese einer spektral nicht aufgelösten LIF-Detektion mit $\lambda_{ex} = 252\text{nm}$ an Daunorubicin. Die Bilder a)-e) zeigen die Fluoreszenzsignale im Abstand von $1,2$ Sekunden. Der Durchmesser i beträgt $50\mu\text{m}$.*

Die Parameter der Messung waren: $U=10\text{kV}$, $L=53\text{cm}$, $l=43\text{cm}$, Höhendifferenz 30cm , $50\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer $\text{pH}=9.0$ mit Acetonitril im Verhältnis $7/3$, 0.1mJ/Puls , Quarzkapillare, Innendurchmesser $50\mu\text{m}$, Aufgabe 3s.

Die Bilder in Abbildung 8.2 zeigen einen Querschnitt längs der Kapillare. Das inhomogene Laserstrahlprofil ist für eine räumlich inhomogene Fluoreszenz von Daunorubicin verantwortlich, die als Signal in der Mitte der Kapillare zu erkennen ist und die Ausdehnung des Laserstrahlprofils widerspiegelt. Die Ränder der Kapillare sind hier im Gegensatz zur Abbildung 8.1 nicht zu sehen, da zum einen die Laserleistung um den Faktor acht geringer ist und das verwendete Abbildungsobjektiv die Laserstrahlung der UV-Wellenlänge 252nm nicht transmittiert, welche als Rayleigh- und Streulicht von der Kapillare zu detektieren wäre.

Unter diesen Bedingungen kann ein Signal nach neun Minuten und 30 Sekunden für den Zeitraum von sechs Sekunden detektiert werden. Das entspricht einer Migrationsgeschwindigkeit von 0.75mm/s .

Das Fluoreszenzsignal kann mit einem Signal/Rausch-Verhältnis (S/R) von $15/1$ bestimmt werden. Die Nachweisgrenze¹ für Daunorubicin ist mit diesem experimentellen Aufbau um den Faktor 5 tiefer als vergleichbare Messungen mit einem Ar^+ -Laser bei der Wellenlänge 488nm [135].

Eine Bewegung des Signals in der Horizontalen ist nicht zu beobachten, da das Daunorubicin mit ca. 10mm in der Kapillare eine größere Ausdehnung als das inhomogene Laserstrahlprofil hat. Das inhomogene Strahlprofil wurde mit einer sphärischen Linse auf die Kapillare abgebildet und erreichte dort eine Ausdehnung von ca. $170\mu\text{m}$. Ein geringerer Durchmesser konnte aufgrund der möglichen Zerstörung der Kapillare durch die hohen Laserleistungen nicht gewählt werden. Die Migrationsgeschwindigkeit der Probe ist zu groß, um sie bei einer Integrationszeit von 1s auf dem Bereich von $170\mu\text{m}$ räumlich auflösen zu können. Die Probe wird während ihrer Bewegung durch das im Verhältnis zur Gesamtlänge der Probe kleine Fenster zur Fluoreszenz angeregt und als Folge von ortsfesten Signalen detektiert.

¹Die Nachweisgrenze wird in dieser Arbeit immer mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von $3/1$ angegeben: $\text{S/R}=3/1$.

8.2 Spektral aufgelöste Messungen

Die Ausführungen in diesem Abschnitt beschreiben die ICCD-Kamerabilder, die während einer Messung mit spektraler Auflösung aufgenommen werden. Der apparative Aufbau entspricht dem in Abbildung 4.12. Durch die Ausleuchtung eines 3mm langen Bereiches der Kapillare und einer flächigen Bildaufnahme, die in einer Dimension die räumliche Information enthält, kann eine Probe mit der Ausdehnung kleiner als 3mm in seiner Bewegung durch den abgebildeten Bereich verfolgt und das Fluoreszenzsignal der gesamten Probe detektiert werden. Eine solche Bildfolge ist in Abbildung 8.3 am Beispiel von Daunorubicin dargestellt:

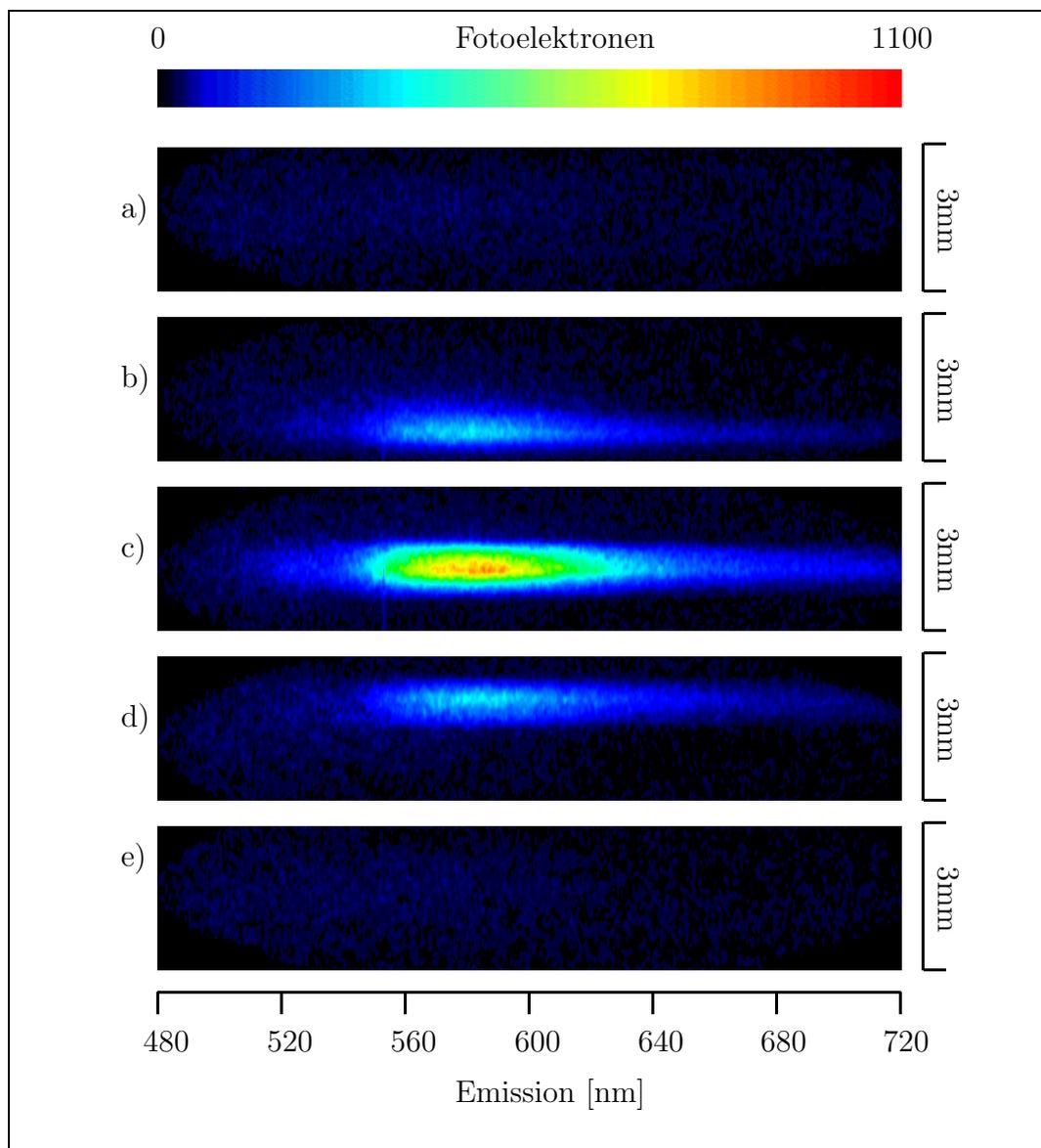


Abbildung 8.3: Kamerabildfolge a)-e) mit spektraler und räumlicher Auflösung und zeitlichem Abstand von 1,2s am Beispiel von Daunorubicin.

Die Bilder zeigen von a) bis e) die Detektion von drei Fluoreszenzsignalen einer Probe, die im Abstand von 1.2 Sekunden aufgezeichnet wurden.

Die räumliche Auflösung beträgt 3mm über die gesamte Vertikale eines Bildes, und die spektrale Bereich in der Horizontalen ist durch das eingesetzte Spektrometergitter gegeben.

Im Bild a) ist das Untergrundbild und in den Ecken die vom Bildverstärker nicht ausgeleuchteten, dunklen Flächen des CCD-Chips zu erkennen.

Im Bild b) tritt an der unteren Bildbegrenzung eine Probe in den Sichtbereich der Kamera, der mit dem ausgeleuchteten Bereich der Kapillare übereinstimmt. Im Bild c) ist die Probe weitergewandert und wird in der Mitte des Bildes detektiert.

Das Bild d) zeigt den Austritt der Probe aus dem Sichtbereich der Kamera, der in diesem Fall durch den oberen Bildrand gegeben ist.

Nach dem Austritt aus dem Sichtbereich der Kamera wird in Bild e) wieder ein Hintergrundbild ohne Fluoreszenzsignal detektiert.

Die räumliche Ausdehnung der Probe entlang der Kapillare entspricht nicht der im Bild c) aufgezeichneten. Aus der Verwendung einer 10Hz-Wiederholfrequenz und der Kameraöffnungszeit von einer Sekunde ergibt sich die Detektion zu verschiedenen Zeitpunkten in einem Bild. Somit kann aus den Bildern in Abbildung 8.3 für die größte räumliche Ausdehnung der Probe der Wert 0.5mm angegeben werden. Dieser Wert stimmt mit den typischen Werten einer Probeninjektion überein.

Die Kapillare ist in dieser Bildfolge nicht zu erkennen, da bei diesen Messungen ein Spektrometer verwendet wurde. Somit steht nur eine Dimension (in Abbildung 8.3 die Senkrechte) für eine räumliche Darstellung zur Verfügung. Die Kapillare wäre als senkrechte Linie zu erkennen, die durch das Streu- und Rayleighlicht bei der Anregungswellenlänge (240nm) zu detektieren ist. Das strichförmige Laserstrahlprofil leuchtet genau den in Abbildung 8.3 angegebenen Bereich von 3mm vollständig aus. Der für den Nachweis der Fluoreszenz von Daunorubicin notwendige Spektralbereich (480nm bis 720nm) kann die Anregungswellenlänge jedoch nicht berücksichtigen und blendet diese aus dem Sichtbereich aus.

8.3 Erstellung eines Elektropherogramms

Die Meßdaten werden in der CE in Form von Elektropherogrammen präsentiert, und geben die Stärke des Meßsignals als Funktion der Migrationszeit an. In dieser Arbeit wird die Fluoreszenz mit einer CCD-Kamera detektiert und das Kamerabild ausgewertet.

Für die Erstellung eines Elektropherogramms wird in dem Kamerabild ein spektraler und räumlicher Bereich für die Detektion der Signale bestimmt und für die gesamte Bildfolge beibehalten. Verdeutlicht werden diese Ausführungen in Abbildung 8.4. Bei der Auswertung der Bildfolgen zu der Trennung von Tramadol und den Metaboliten war keine Variation des spektralen Bereiches erforderlich, da die Fluoreszenzen die gleiche spektrale Verteilung aufweisen.

Von diesem Bereich wird die Summe oder der Mittelwert der ausgelesenen Pixelinhalte [counts] bzw. [counts/Pixel] berechnet und als Datenpunkt im Elektropherogramm niedergelegt.

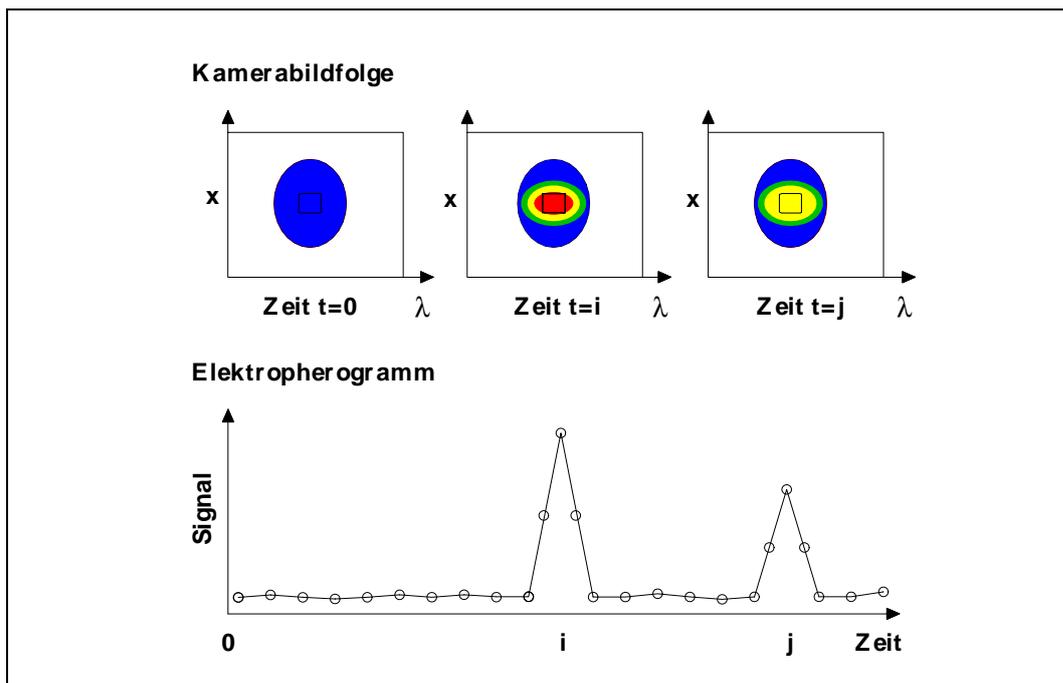


Abbildung 8.4: Schematische Darstellung zur Erstellung eines Elektropherogramms aus einer Folge von Kamerabildern.

Dieser Bereich muß nicht das gesamte Signal umfassen. Er wird so gewählt, daß das größte Signal/Rausch-Verhältnis erreicht wird. Das Rauschen bestimmt sich dabei aus der Standardabweichung der ersten Datenpunkte, bei denen noch kein Signal detektiert wurde.

8.4 Einfluß des pH-Wertes auf die Trennung

Das Ziel bei der Variation des Puffers und seines pH-Wertes ist die Bestimmung einer Kombination, die eine Trennung eines bestimmten Substanzgemisches ermöglicht².

Das Gemisch bestand aus fünf Komponenten, die in Methanol gelöst waren:

- Tramadol, 9.4µg/ml
- N-Destramadol, 13.1µg/ml
- O-Des-Tramadol, 9.5µg/ml
- N,O-Dides-Tramadol, 12.2µg/ml
- N,N,O-TriDes-Tramadol, 10.4µg/ml

Der pH-Wert eines Puffers kann nicht beliebig gewählt werden, da sonst die ihm eigene Wirkung als pH-Puffer nicht ermöglicht wird. Für eine Variation des pH-Wertes für pH > 8 wurde deshalb ein 50mM Boraxpuffer verwendet.

Die Darstellung einer Messung erfolgt in Form von Elektropherogrammen, in denen auf der Horizontalen die Zeit in Minuten nach Anlegen der Spannung und in der Vertikalen das Signal angegeben werden, welches in den Messungen zu diesem Kapitel das räumlich und spektral integrierte Fluoreszenzsignal in willkürlichen Einheiten bezeichnet.

Die maßgeblichen Parameter dieser Messungen sind: Gesamtlänge der Kapillare L=74cm, Länge zum Detektor l=43cm, Spannung U=25kV, Injektion (in den Aufgabeblock): 20µl, Injektionszeit: 15 Sekunden, Höhendifferenz Δh=10cm, Anregungswellenlänge 270nm, Innendurchmesser der Quarzkapillare: 50µm.

In der Abbildung 8.5 sind die Elektropherogramme für die pH-Werte 9.2, 10.0 und 10.65 dargestellt.

Bei pH=9.2 sind nur vier Signale zu detektieren, obwohl in dem Gemisch fünf Substanzen gelöst waren. Eine Ausdehnung der Meßzeit über sechs Minuten hinaus zeigte kein weiteres Signal. Es findet noch keine vollständige Trennung statt³.

In der mittleren Abbildung wird das Elektropherogramm für pH=10.0 gezeigt.

²Die Auswahl der Puffer und ihrer pH-Werte wurde von Herrn Apotheker B. Kurth, Pharmazeutische Chemie, Universität Münster vorgenommen.

³Das gleiche Ergebnis einer unvollständigen Trennung ergab sich bei einem 50mM Na₂HPO₄-Puffer pH=4.6. Diese pH-Werte können diese Substanzen mit ihren geringen Unterschieden der m/e-Verhältnisse nicht trennen, vgl. Anhang A

Auch bei diesem pH-Wert sind im wesentlichen nur vier Signale zu detektieren; jedoch zeigt sich beim dritten Signal eine Doppelspitze, die vermuten läßt, daß sich dahinter zwei Substanzen verbergen.

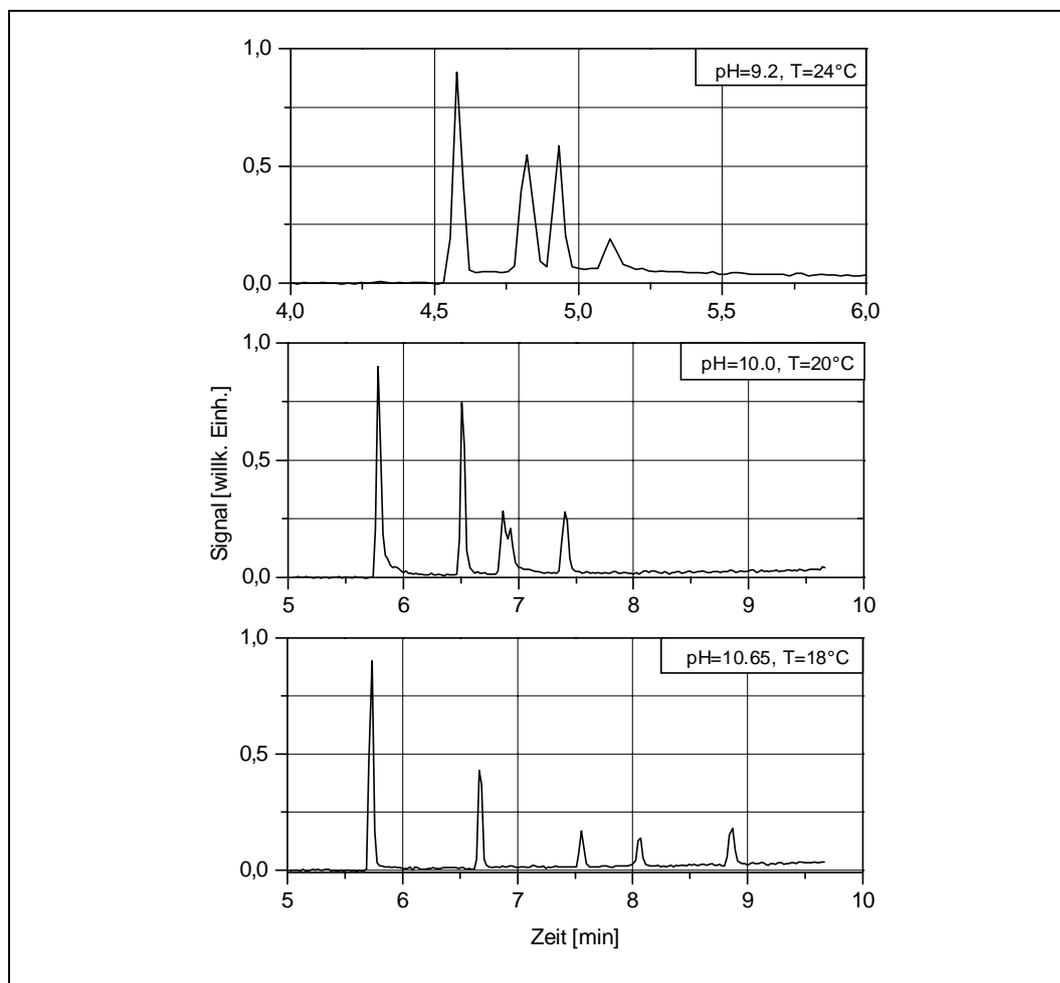


Abbildung 8.5: Der Einfluß des pH-Wertes und der Temperatur auf die Trennung eines Gemisches aus Tramadol und seinen Metaboliten, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$.

Die Erhöhung des pH-Wertes auf pH=10.65 zeigt nun die gewünschte Trennung. Es werden fünf Signale nachgewiesen, die deutlich voneinander getrennt sind (das Signal geht nach einem Maximum bis auf die Grundlinie zurück). Die vollständige Trennung kann schon bei pH=10.4 beobachtet werden, jedoch treten das dritte und vierte Signal kurz hintereinander auf. Kleine Temperaturschwankungen können diese Trennung verhindern, so daß mit pH=10.65 gearbeitet wird, bei dem die Signale hinreichend voneinander getrennt sind.

Da eine Identifizierung der Substanzen auf der Grundlage einer spektralen Fluoreszenzanalyse nicht möglich ist (vgl. Abbildung 7.4), werden die Substanzen durch die Anreicherung der Probe mit einer der darin enthaltenen Substanzen und der resultierenden Signalvergrößerung bei der UV-LIF-Detektion nachgewiesen. Mit diesem Verfahren ergibt sich bei diesem Puffer und diesem pH-Wert die Reihenfolge: N-Des-Tramadol, Tramadol, N,O-Dides-, N,N,O-Trides- und O-Desmethyltramadol.

Bei einer Verringerung des pH-Wertes kann die zeitliche Reihenfolge der Metabolite mit phenolischem Charakter in der CZE verändert werden, da diese Moleküle einer unterschiedlichen Dissoziation bzgl. des pH-Wertes unterliegen (vgl. Anhang A).

Die Temperatur- und pH-Wert-Änderung haben folgenden Einfluß auf die Migrationszeiten:

Die Messungen in Abbildung 8.5 zeigen bei allen Substanzen eine Zunahme der Migrationszeit. Sie ist hauptsächlich durch die angegebene Temperatursenkung von 24°C auf 18°C und die damit einhergehende Mobilitätsminderung zurückzuführen. Die Temperaturabhängigkeit der Mobilität ist in Gleichung 3.2 dargestellt. Vergleichbare Elektropherogramme bei gleicher Temperatur stehen nicht zur Verfügung.

Eine Steigerung des pH-Wertes führt zu zwei entgegengesetzten Effekten:

Zum einen wird die EOF-Geschwindigkeit erhöht und, die Migrationszeiten aller Teilchen werden verkürzt.

Zum anderen werden die Bedingungen für den Ladungsaustausch der Teilchen N-Des-, N,O-Dides- und N,N,O-Tridesmethyltramadol mit phenolischem Charakter und dem Puffer verändert, die im Anhang A erläutert sind. Mit einer Erhöhung des pH-Wertes wird der Anteil der OH-Gruppen am Benzolring zunehmend durch O^{-} -Teilchen ersetzt. Ein Überschuß an negativer Ladung führt im elektrischen Feld zu einer Bewegung in Richtung der Anode und dem EOF entgegen.

Die Überlagerung der beiden geänderten Geschwindigkeiten führt dazu, daß die Teilchen mit phenolischem Charakter bei einer Erhöhung des pH-Wertes eine Abnahme der Geschwindigkeit aufweisen und erst nach dem EOF die Kathode erreichen⁴, der die neutralen Teilchen transportiert und bei den UV-LIF-Messungen zu dieser Arbeit, im Gegensatz zu UV-Absorptionsmessungen, nicht sichtbar war.

⁴Tramadol und N-Desmethyltramadol sind immer positiv geladen und vor dem Signal des EOF nachzuweisen, der neutrale Teilchen transportiert.

8.5 Konzentrationsabhängigkeit des Signals

Die Bestimmung der Nachweisgrenzen kann durch eine Extrapolation erfolgen, wenn ein linearer Zusammenhang zwischen der aufgegebenen Konzentration und der Signalstärke existiert, der nicht durch Sättigungseffekte, Selbstabsorption oder Stackingeffekte⁵ der Elektrophorese gestört wird. Unter diesen Voraussetzungen kann die Nachweisgrenze durch eine Extrapolation einer gemessenen Signalstärke in Bereiche abnehmender Konzentration ermittelt werden.

Eine Überprüfung dieser Abhängigkeit wird am Beispiel von Tramadol bei der Anregungswellenlänge 212nm über einen großen Konzentrationsbereich in Abbildung 8.6 vorgestellt.

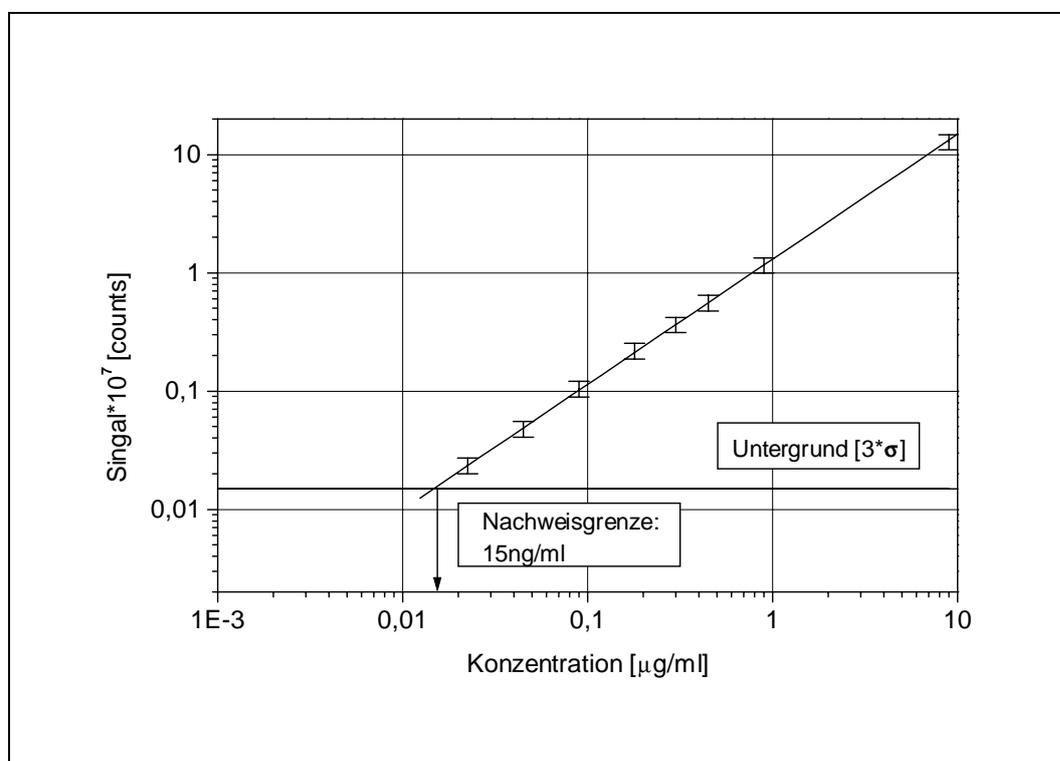


Abbildung 8.6: Die Konzentrationsabhängigkeit des UV-LIF-Signals von Tramadol-HCl im Bereich 9 µg/ml bis 22 ng/ml bei der Anregungswellenlänge 212 nm.

Für diese Meßreihe wurde die Konzentration des Tramadol-HCl mit den Werten 22.5 ng/ml, 45 ng/ml, 90 ng/ml, 180 ng/ml, 300 ng/ml, 450 ng/ml, 900 ng/ml

⁵Stacking-Effekt: Konzentration der Probe in der Kapillare durch pH-Wert- und/oder Konzentrationsdifferenzen zwischen der aufgegebenen Probe und dem Puffer, vgl. [107], [108] und [105].

und $9\mu\text{g}/\text{ml}$ (in dieser Reihenfolge aufsteigender Konzentrationen) gegen das integrale Fluoreszenzsignal aufgetragen. Dabei ergibt sich jeder Datenpunkt aus der Mittelung von sechs Fluoreszenzsignalen, die aus je einer CZE-Messung mit dem selbsterstelltem Aufbau (vgl. Abbildung 4.11) und dem Farbstofflaser ermittelt worden sind.

Die Parameter für diese Messungen sind : $U=15\text{kV}$, $L=35\text{cm}$, $l=30\text{cm}$, 50mM KH_2PO_4 -Puffer, $\text{pH}=3.0$ mit Acetonitril im Verhältnis 7/3, Quarzkapillare mit Innendurchmesser $50\mu\text{m}$, $0.2\text{mJ}/\text{Puls}$, Kamerakühlung -7°C .

Zusätzlich zu den Fluoreszenzsignalen ist in Abbildung 8.6 der Signaluntergrund als Horizontale eingetragen, der als dreifacher Wert der Standardabweichung⁶ 3σ angegeben ist. Die Standardabweichung σ bestimmt sich aus einer Folge von 50 Kamerabildern, die während der Elektrophorese nur das Signal des Puffers in der Kapillare detektieren. Dabei wird für jedes aufgezeichnete Kamerabild die Signalsumme in einem Rechteck bestimmt, in dem später das Fluoreszenzsignal detektiert wird. Von diesen 50 Werten wird die Standardabweichung σ bestimmt und für alle nachfolgenden Messungen beibehalten (Diese Standardabweichung kann sich zwischen zwei Messungen um ca. 0.1% ändern und wird somit als konstant betrachtet).

Bei einer gegebenen Konzentration wurden sechs CZE-Messungen durchgeführt. Die Schwankungen dieser sechs Signalwerte ergeben die Fehlerbalken in der Größe 11% bis 15%.

Innerhalb dieser Fehlerbalken kann ein linearer Zusammenhang zwischen der aufgegebenen Konzentration und dem detektierten Signal festgestellt werden. Die abgebildete Ausgleichsgerade weist eine Steigung von $m=1.0$ auf. Der vermutete lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalstärke wird somit bestätigt.

Die Extrapolation der Ausgleichsgeraden für die Bestimmung der Nachweisgrenze ist gerechtfertigt und ergibt für die Messung in Abbildung 8.6 mit einem Signal-Rausch-Verhältnis 3/1 die Nachweisgrenze von $15\text{ng}/\text{ml}$ Tramadol-HCl.

Im Vergleich mit Nachweisgrenzen, die bei UV-Absorptionsmessungen ermittelt werden und im μg -Bereich liegen, ergibt sich mit der UV-LIF-Detektion eine um zwei Größenordnungen geringere Nachweisgrenze.

⁶Bei klinischen Anwendungen wird das Konfidenzintervall auf 99.7% (3σ) festgesetzt.

8.6 Adsorption

Nach einer Signalauswertung für die CZE kann bei vielen Substanzen beobachtet werden, daß das Signal nach einem Maximum nicht auf das vorherige Untergrundsignal zurückgeht. Statt dessen entsteht ein neues Untergrundsignal, das einen höheren Mittelwert und eine größere Standardabweichung aufweist. Das Elektropherogramm in Abbildung 8.7 verdeutlicht diese Beobachtung.

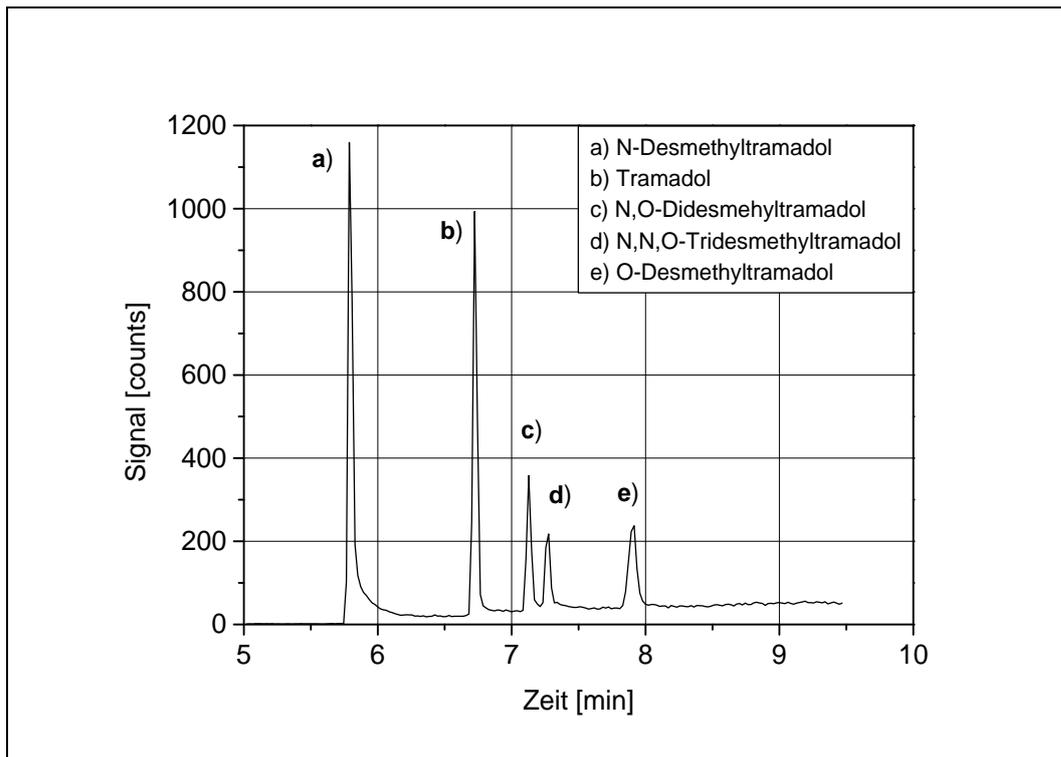


Abbildung 8.7: *Elektropherogramm zur Demonstration des Untergrundanstieges nach einem Fluoreszenzsignal am Beispiel von Tramadol und Metaboliten.*

Nach jedem Fluoreszenzsignal in Abbildung 8.7 steigt der Untergrund an und ist nach fünf Signalen bei acht Minuten 40 mal größer als zu Beginn der Messung. Gleichzeitig ist die Standardabweichung auf den Datenpunkten bis 5,5 Minuten von 0,6 counts auf 3,8 counts nach 8 Minuten angestiegen. Hierbei handelt es sich um Adsorptionseffekte der Substanzen auf der Kapillaroberfläche, die konzentrationsabhängig sind. Bei der Senkung der in die Kapillare aufgegebenen Konzentration nimmt die Höhe dieses Untergrundes nach dem Signal ebenfalls ab.

Im folgenden wird der mögliche Einfluß der hohen Laserleistung auf diesen Prozeß untersucht.

Dazu wurde eine CZE-Messung mit Propranolol gestartet, das auch zu solch einer „Schweifbildungneigt, und vor dem Zeitpunkt des Fluoreszenzsignals der Laser ausgeblendet. Somit kann das Laserlicht keinen Einfluß auf die Probe und deren Verhalten nehmen.

Nachdem das Signal den ausgeleuchteten Bereich der Kapillare verlassen hatte, wurde das Laserlicht wieder auf die Kapillare gelenkt und das Untergrundsignal detektiert. Das Elektropherogramm einer solchen Messung ist in Abbildung 8.8 wiedergegeben.

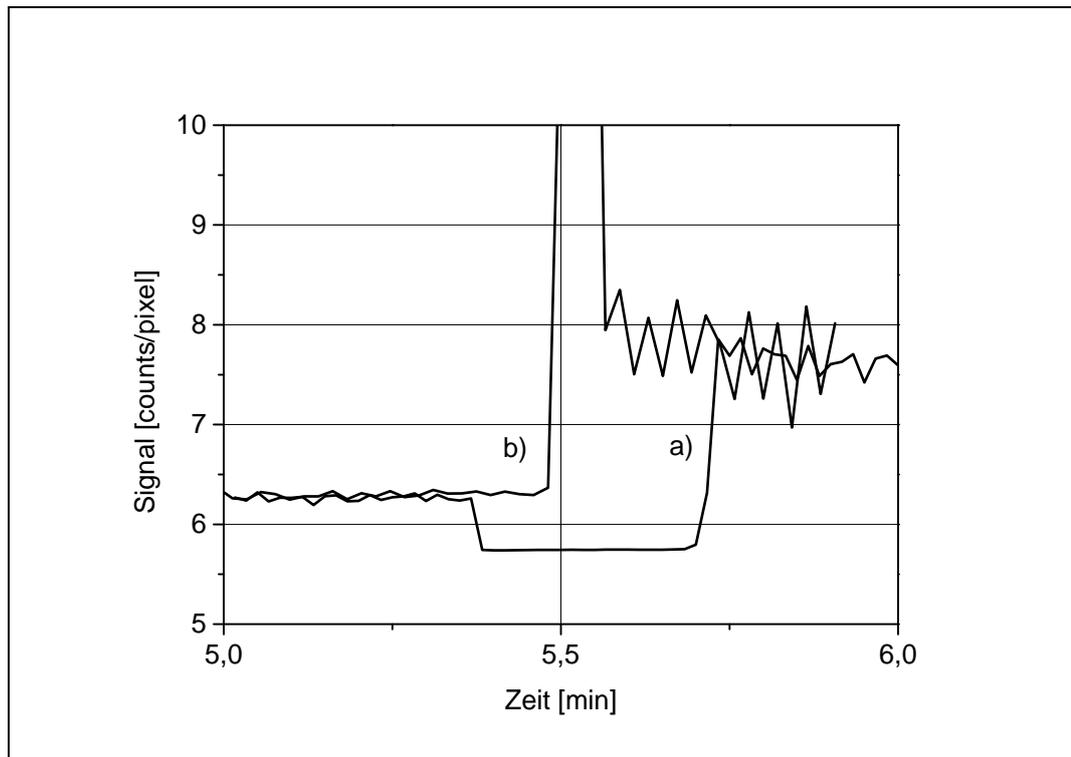


Abbildung 8.8: *Adsorption nach Migration einer Probe am Beispiel von Propranolol -HCl in 50mM KH_2PO_4 -Puffer, $pH=4.6$. a) Signal mit unterbrochener Bestrahlung, b) Signal mit ununterbrochener Bestrahlung .*

Das Elektropherogramm a) zeigt das Absinken des Signals, nachdem der Laser zwei Sekunden vor 5.4 Minuten ausgeblendet wurde. Im Zeitraum zwischen 5.4 Minuten und 5.7 Minuten ist die Probe durch den zur Belichtung verwendeten Bereich der Kapillare migriert und nicht vom Laserlicht beeinflusst worden. Es wurde das konstante Hintergrundbild gemessen. Nach 5.7 Minuten wurde die Kapillare wieder mit dem Laser belichtet und ein höheres Untergrundsignal als zu Beginn der Messung detektiert.

Nicht nur das mittlere Untergrundsignal, sondern auch die Standardabweichung ist vor und nach der Probenmigration unterschiedlich. Nach der Migration der Probe ist die Standardabweichung viermal größer als vor der Probe.

Zum Vergleich mit einer bestrahlten Probe im Detektionsvolumen kann das Elektropherogramm b) in Abbildung 8.8 herangezogen werden. Die Signale vor und nach der Migration der Probe durch das abgebildete Kapillarovolumen sind in beiden Elektropherogrammen gleich groß und weisen gleiche Schwankungen auf. Damit ergibt sich, daß das Laserlicht keinen Einfluß auf die Adsorption der Substanzen nimmt.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang das relativ konstante Niveau des angestiegenen Untergrundes, der nicht allein durch Substanzreste der Proben hervorgerufen werden kann: Die Meßreihen zum Ausbleichen des Signals zeigen eine Minderung um mindestens 50% nach vier Sekunden Bestrahlung mit dem Laser. In den Abbildung 8.7 und 8.8 hingegen ist der Untergrund im Zeitraum acht bis neun Minuten bzw. 20 Sekunden kaum verändert. Somit kann das erhöhte Fluoreszenzsignal nicht auf Probenreste zurückgeführt werden, die bei einer (auch nur kurzzeitigen) Bestrahlung ein stark vermindertes Fluoreszenzsignal erzeugen würden.

Die Ursache für diesen Untergrundanstieg konnte nicht ermittelt werden und ist in diesem Ausmaß nicht bekannt [133].

8.7 Signaluntergrund

Die Verwendung von UV-Licht ermöglicht eine LIF-Detektion vieler Substanzen, die im sichtbaren Spektralbereich keine Absorption aufweisen. Neben den nachzuweisenden Substanzen zeigen jedoch auch andere Stoffe im UV-Bereich eine Absorption, die zu einer Fluoreszenz führt und andere Fluoreszenzsignale erzeugen kann [136]. Damit verbunden ist die Erhöhung des Hintergrundrauschens, auf dem das Fluoreszenzsignal detektiert wird. Die Nachweisgrenze wird negativ beeinflusst und das Signal/Rausch-Verhältnis bei gleichbleibender Signalfluoreszenz verkleinert.

Im Falle der CZE mit UV-LIF-Detektion bilden die Quarzkapillare und der Puffer einen solchen Fluoreszenzuntergrund, der in den folgenden Abschnitten dargestellt und diskutiert wird.

Der Untergrund kann neben einer Fluoreszenz des Puffers und/oder der Kapillare auch durch ein Ramansignal des Puffers beeinflusst werden, wenn dieses mit der Fluoreszenz spektral überlappt.

8.7.1 Puffer

In der CZE werden bei dieser Art des UV-LIF-Nachweises immer Messungen an Flüssigkeiten vorgenommen, die in Form des Puffers die Kapillare füllen. Damit verbunden ist eine Fluoreszenz des Puffers, die als Signaluntergrund Einfluß auf die Nachweisgrenze nimmt. Die Fluoreszenzen sind von der Anregungswellenlänge λ_{ex} abhängig und bei 212nm größer als bei 270nm.

Die Abbildung 8.9 zeigt die Fluoreszenzen des Phosphatpuffers (durch — gekennzeichnet) und des Boraxpuffers (durch • gekennzeichnet) bei $\lambda_{ex}=212\text{nm}$ und die Abbildung 8.10 die Fluoreszenzen bei $\lambda_{ex}=270\text{nm}$ jeweils in spektraler Auflösung. Die Spektren sind im Binning-Modus $4 \cdot 16$ aufgezeichnet und über 50 Einzelbilder gemittelt worden.

Ein deutlicher Einfluß auf das Untergrundsignal zeigt sich bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$. Die Fluoreszenzen des Phosphat- und Boraxpuffers sind ähnlich und zeigen eine breite spektrale Verteilung mit einem Maximum bei 290nm. Bei Wellenlängen kleiner als 280nm mindert der verwendete Kantenfilter OG280 das Signal. Von 290nm an nimmt das Signal zu größeren Wellenlängen monoton ab und ist bei 370nm mit noch ca. 12 Fotoelektronen/Pixel zu detektieren. Nach Abzug dieses gemittelten Untergrundbildes weisen Einzelbilder für Phosphat- und Boraxpuffer im Bereich 300nm bis 340nm typischerweise eine Standardabweichung von 3.5 Fotoelektronen/Pixel bis 4.6 Fotoelektronen/Pixel auf.

Bei einer Anregung mit 270nm ist das Spektrum bei beiden Puffern durch das Ramansignal des Wassers bei 296nm dominiert. Der Fluoreszenzmittelwert steigt nach einem Minimum von 9 Fotoelektronen/Pixel zwischen 320nm und 340nm zu größeren Wellenlängen an und erreicht bei 390nm 20 Fotoelektronen/Pixel.

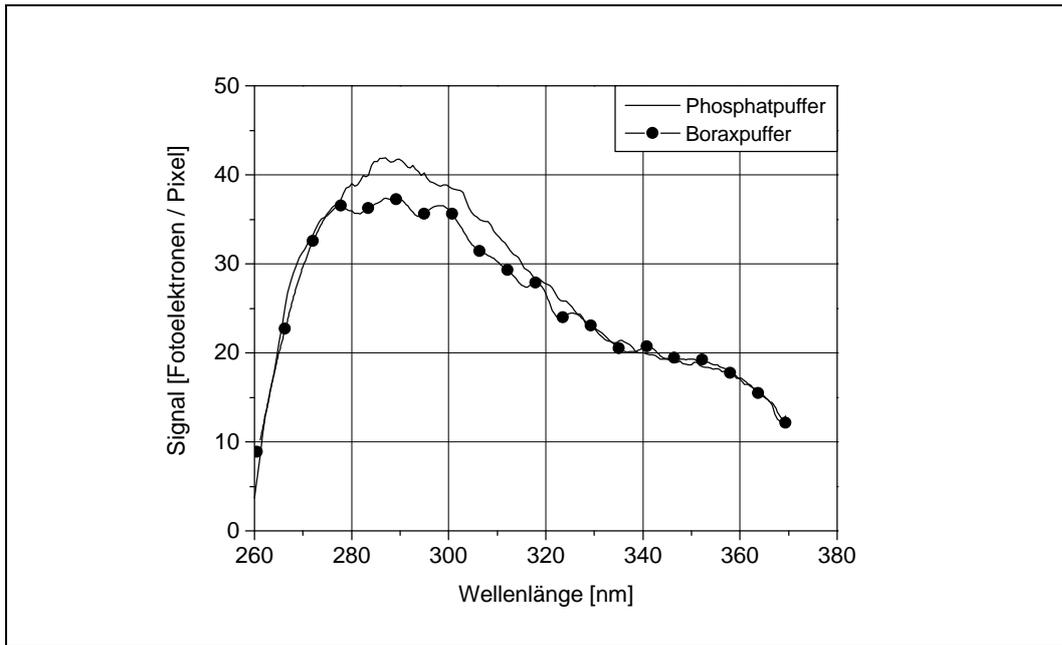


Abbildung 8.9: Fluoreszenzen der Phosphat- und Boraxpuffer bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ über 50 Bilder gemittelt, Kantenfilter WG280, Binning-Modus $4 \cdot 16$.

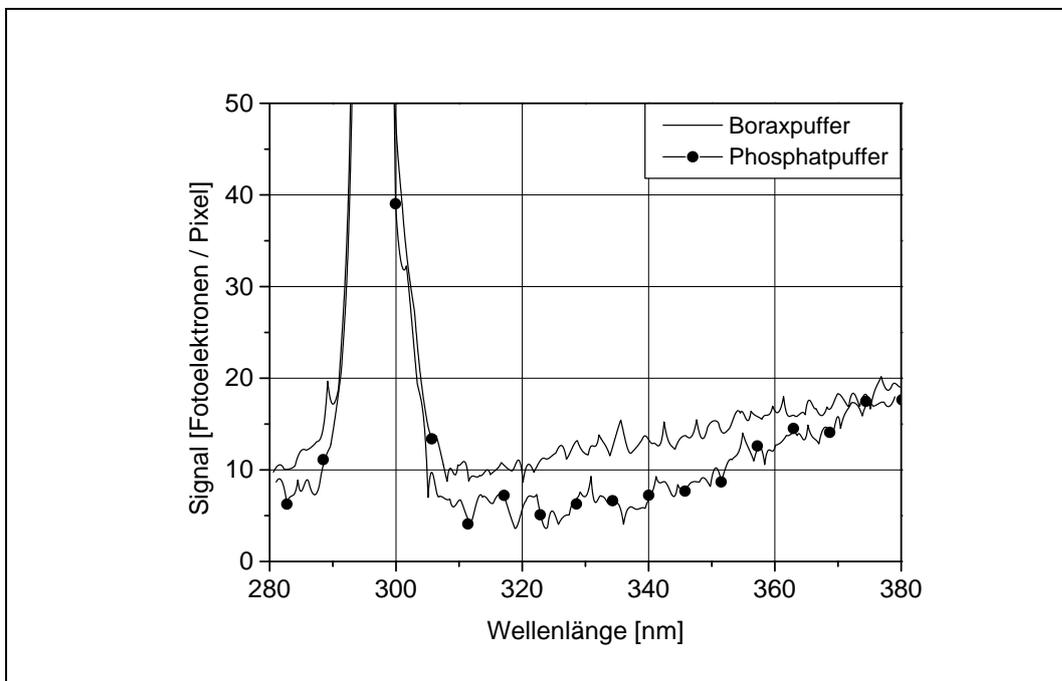


Abbildung 8.10: Fluoreszenzen der Phosphat- und Boraxpuffer bei $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ über 50 Bilder gemittelt, Kantenfilter WG280, Binning-Modus $4 \cdot 16$.

Eine weitere Struktur ist nicht vorhanden. Der verwendete Kantenfilter OG280 hat keinen Einfluß auf die spektrale Verteilung bei Wellenlängen größer als 300nm. Einzelbilder beider Puffer weisen nach dem Abzug dieser gemittelten Untergrundbilder im Bereich 320nm bis 340nm über 200 Pixel typischerweise eine Standardabweichung zwischen 1.2 Fotoelektronen/Pixel bis 3.9 Fotoelektronen/Pixel auf.

Wenn der Puffer älter als drei Tage ist, konnte oftmals eine Schlierenbildung beobachtet werden, die zu einer Erhöhung des Untergrundrauschens führt und die Kapillare verschließen kann. Auch in neuen Pufferlösungen können Verunreinigungen enthalten sein, die zu einer Verstopfung der Kapillare führen. Eine Filtrierung des Puffers mit einem Filter, der die Porengröße $0,45\mu\text{m}$ besitzt, konnte das Verstopfen der Kapillare verhindern und das Rauschen verringern, wie in Abbildung 8.11 gezeigt ist.

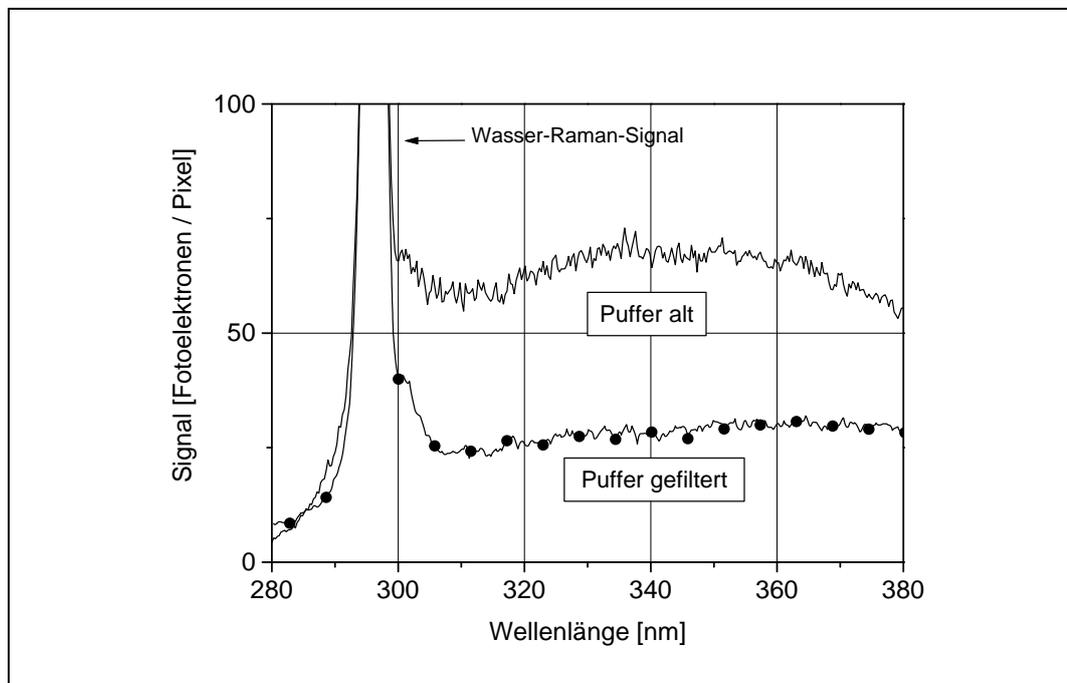


Abbildung 8.11: *Signaluntergrund von gefiltertem und ungefiltertem Puffer (Küvette), $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$, Binning-Modus $4 \cdot 16$.*

Den Profilen liegen Einzelbilder (Binning-Modus $4 \cdot 16$) zugrunde, die bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ mit Hilfe einer Küvette erstellt worden sind. Diese wurde mit einem drei Tage alten, ungefilterten Phosphatpuffer und einem gefilterten Phosphatpuffer gefüllt. Die Profile dieser Einzelbilder wurden über einen Bereich von jeweils 25 Zeilen gemittelt.

Die Struktur beider Spektren wird durch die Art des Puffers nicht verändert und weiterhin durch das Wasser-Raman-Signal dominiert. Der ungefilterte Puffer erzeugt jedoch einen höheren Signaluntergrund als der gefilterte und weist zudem eine doppelt so hohe Standardabweichung des Rauschens auf.

Für die CZE-Messungen wurde deshalb nur neu hergestellter und gefilterter Puffer verwendet.

8.7.2 Kapillare

Die Qualität des Quarzmaterials, aus denen die Kapillaren gezogen werden, wird nicht durch verschiedene Reinheitsstufen ausgewiesen, sondern nur unter der Bezeichnung „fused-silica“ angeboten. Im Quarzmaterial können Verunreinigungen enthalten sein, die zu einer Fluoreszenz führen. Dabei werden das Untergrundsignal und das Rauschen erhöht, womit das Signal/Rausch-Verhältnis verringert wird.

Die Fluoreszenz einer Quarzkapillare konnte nur bei der Anregungswellenlänge von 212nm und nicht bei der Wellenlänge 270nm beobachtet werden. Die Fluoreszenz ist nicht auf Reste der Polyamidbeschichtung zurückzuführen, welche sorgfältig und unter einem Mikroskop kontrolliert entfernt wurden.

Vielmehr sind Fluoreszenzen durch Verunreinigungen des Quarzes verursacht. Der sich ergebende Fluoreszenzuntergrund ist in Abbildung 8.12 am Beispiel von drei Spektren aus Einzelbildern dargestellt, die die Fluoreszenz jeweils einer mit Wasser gefüllten Kapillare zeigen.

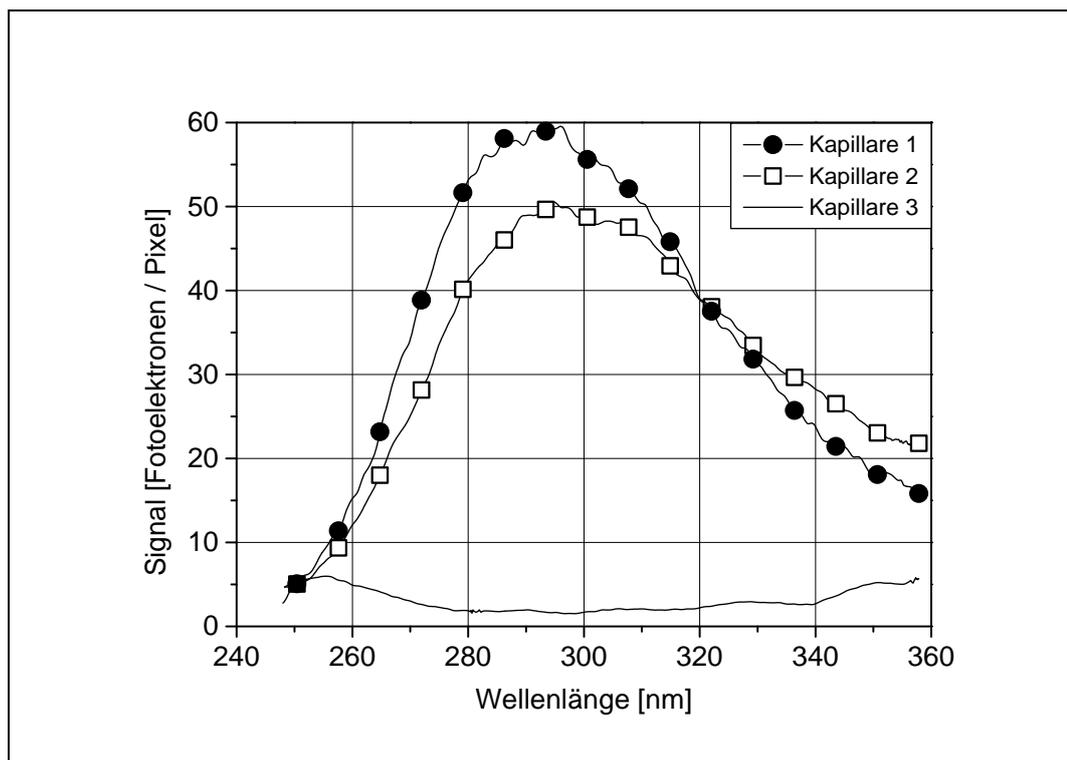


Abbildung 8.12: Fluoreszenzen durch verunreinigte Quarzkapillaren im Vergleich zu einer Quarzkapillare mit geringerem Fluoreszenzuntergrund, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$, Kapillaren mit H_2O befüllt, Binning-Modus $1 \cdot 1$, keine Verwendung optischer Filter.

Eine Verringerung dieses Untergrundes ist für die Senkung der Nachweisgrenze von Substanzen notwendig, deren Fluoreszenz in diesem Spektralbereich detektiert wird. Die Abbildungen 7.2 und 7.8 zeigen, daß alle hier vermessenen Substanzen in diesem Wellenlängenbereich fluoreszieren.

Für die Fluoreszenzmessungen wurden die Kapillaren mit destilliertem Wasser gefüllt, so daß die Puffer keinen Fluoreszenzbeitrag leisten konnten, und optische Filter wurden nicht verwendet (Binning-Modus $1 \cdot 1$). Bei einer Anregung mit 212nm (0.1mJ/Puls) kann der Quarz eine breitbandige Fluoreszenz mit einem Maximum zwischen 300nm und 320nm aufweisen, vgl. die mit \square und \bullet gekennzeichneten Spektren. Die Struktur des Fluoreszenzspektrums kann sich bei verschiedenen Quarzproben unterscheiden.

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 8.12 der geringe Fluoreszenzuntergrund einer Quarzkapillare (-) eingetragen. Die Intensität ist im Bereich 300nm bis 320nm um den Faktor 10 geringer als die der verunreinigten Kapillaren.

Im Gegensatz zu der Pufferfluoreszenz kann diese Fluoreszenz und die damit verbundene Erhöhung der Standardabweichung durch den Austausch der Quarzkapillare vermieden werden. Eine Verunreinigung des Quarzes ist weder Hersteller- oder Chargenspezifisch, da solche Fluoreszenzuntergründe bei Kapillaren verschiedener Hersteller und innerhalb derselben Lieferung gemessen werden konnten. Diese Verunreinigungen sind jedoch selten und wurden bei drei Kapillaren aus ca. 80 Kapillaren festgestellt.

Kapitel 9

Nachweisgrenzen in der CZE mit UV-LIF

Für pharmakologische und klinische Anwendungen ist die Nachweisgrenze der Substanzen von großer Bedeutung. In den folgenden Kapiteln werden die Nachweisgrenzen der Substanzen vorgestellt, die in dieser Arbeit untersucht worden sind. Dabei erfolgt eine grobe Unterteilung bezüglich der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212$ und $\lambda_{ex} = 270$ nm, die sich folgendermaßen begründet: Zum einen zeigt die Auswertung der AE-Spektren für Tramadol und seine Metaboliten die maximale Fluoreszenzausbeute bei $\lambda_{ex} = 270$ nm. Zum anderen bestand das Ziel, unaufbereitete Urinproben auch bei Anregungswellenlängen zu untersuchen, die häufig in Absorptionsmessungen verwendet werden und dem tiefen UV-Bereich bei 214nm entsprechen.

Die Nachweisgrenze bestimmt sich aus dem Signal/Rausch-Verhältnis in einem Elektropherogramm, das aus einer Folge von Kamerabildern bestimmt worden ist. Jedes dieser Bilder wurde um ein Hintergrundbild korrigiert, welches als gemitteltetes Hintergrundbild von jedem Bild der Folge subtrahiert werden kann, nachdem eine Korrektur hinsichtlich der Temperaturschwankungen des CCD-Chips ausgeführt wurde¹. Dazu wurde in einem Kamerabild ein nicht vom Bildverstärker erfaßter Bereich gewählt, der Mittelwert der darin enthaltenen Pixelinhalte gebildet und mit dem entsprechenden Wert im Dunkelbild verglichen. Anschließend wurde durch die Addition oder Subtraktion einer Konstanten das Hintergrundbild angepaßt.

Die Standardabweichung σ der Datenpunkte in dem Elektropherogramm zu Beginn der Messung bis zum ersten Signal wurde als Maß für das Rauschen verwendet und diente für die Festlegung eines geeigneten Konfidenzintervalls, welches bei diesen Messungen $3 \cdot \sigma$ betrug.

¹Die Temperatur des CCD-Chips konnte von den Peltierelementen nicht immer konstant gehalten werden.

Aufgrund unterschiedlicher, ausgewerteter spektraler Bereiche, die durch die Lage des Fluoreszenzmaximums bestimmt werden, und verschiedene Kapillaren sind diese Standardabweichungen i.a. von Substanz zu Substanz und Messung zu Messung verschieden.

Unter Berücksichtigung der Linearität des Signals wird die Stoffkonzentration berechnet, welche der Bedingung

$$S = 3 \cdot \sigma \quad (9.1)$$

genügt: Das Signal S soll dem dreifachen Wert der Standardabweichung σ des Untergrundrauschens entsprechen. Für die (normalverteilten) Datenpunkte des Rauschens bedeutet dieses, daß nur drei von 1000 Datenpunkten außerhalb des Bereiches $\pm 3\sigma$ liegen. Das entspricht einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 99.7%.

Die Linearität des Fluoreszenzsignals wurde bei jeder aufgegebenen Probe (bzw. dem Gemisch bei Tramadol und den Metaboliten) durch vier Messungen überprüft, die jeweils einer Verdünnung um den Faktor 5, 10, 20 und 40 entsprachen. Für die Berechnung der Nachweisgrenze wurde das Fluoreszenzsignal verwendet, welches dem der unverdünnten Konzentration entsprach.

Nach der Präsentation der Nachweisgrenzen für Tramadol, die Metabolite und die anderen Arzneistoffe bei der UV-LIF-Detektion mit den Anregungswellenlängen $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ und $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ schließt sich eine Diskussion der Meßgenauigkeit an.

9.1 Anregungswellenlänge 212nm

In diesem Kapitel werden zuerst die Nachweisgrenzen für Tramadol und seine Metaboliten und im Anschluß daran die Nachweisgrenzen für andere Arzneistoffe dargestellt.

Ausgangspunkt für die Bestimmung der Nachweisgrenzen für Tramadol und seine Metaboliten waren Elektropherogramme, von denen eins in Abbildung 9.1 exemplarisch dargestellt und auf der Grundlage eines spektral integrierten Fluoreszenzsignals erstellt worden ist.

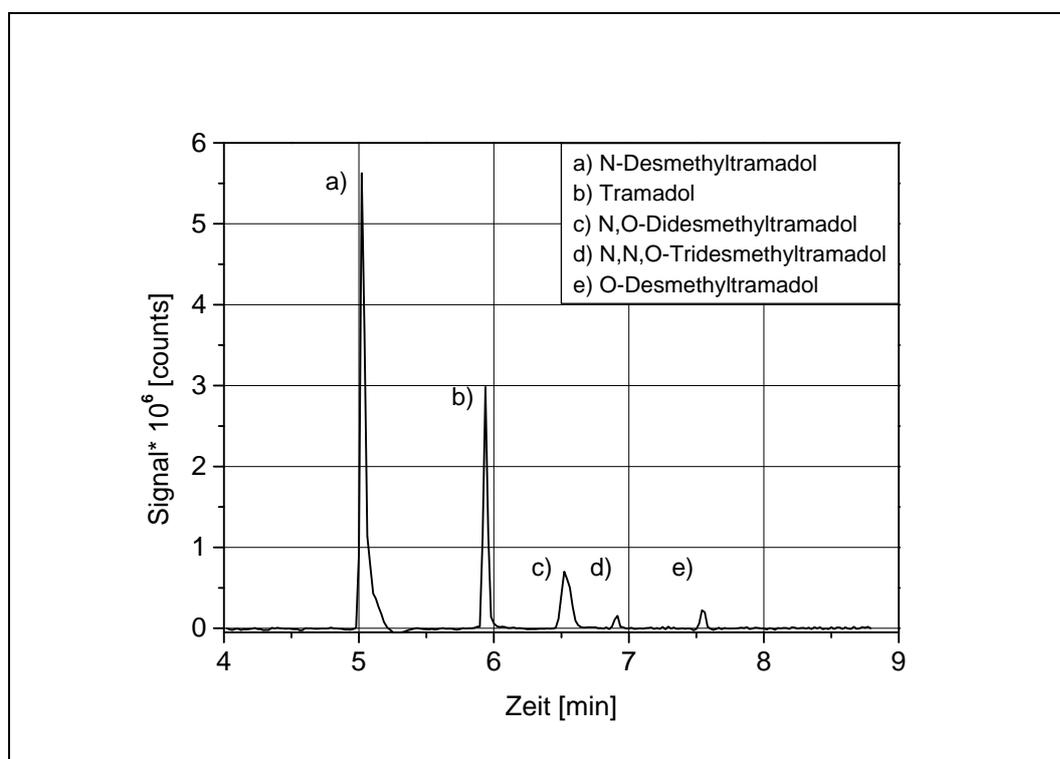


Abbildung 9.1: *Elektropherogramm von Tramadol und seiner Metabolite zur Bestimmung der Nachweisgrenzen, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$, 50mM Boraxpuffer pH=10.65.*

Die Messungen wurden unter folgenden Parametern durchgeführt: $U=25\text{kV}$, $L=73\text{cm}$, $l=43\text{cm}$, 50mM Boraxpuffer pH=10.65, Quarzkapillare mit Innendurchmesser $50\mu\text{m}$, Anregungswellenlänge 212nm, 0.2mJ/Puls, Aufgabe 15s, $20\mu\text{l}$, Höhendifferenz 15cm, Binning-Faktor $b=4 \cdot 8$. Das Lösungsmittel der Substanzen ist mit dem Puffer identisch.

Die Nachweisgrenzen werden aus den Elektropherogrammen eines durch CZE getrennten Gemisches bekannter Konzentration bestimmt und nicht aus Meßreihen zu isolierten Substanzen. Die Tabelle 9.1 faßt diese Nachweisgrenzen mit den aufgegebenen Konzentrationen zusammen. Sie liegen im ng/ml-Bereich und reichen von 13ng/ml bis 363ng/ml.

Substanz	aufgegebene Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Nachweisgrenze UV-LIF [ng/ml]
Tramadol-HCl	9.5	13
N-Desmethyltramadol-HCl	13.7	24
O-Desmethyltramadol-HCl	9.5	102
N,O-Didesmethyltramadol-HCl	12.3	363
N,N,O -Tridesmethyltramadol-HCl	10.1	322

Tabelle 9.1: *Aufgegebene Konzentrationen und Nachweisgrenzen für Tramadol und seine Metaboliten mit UV-LIF und der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$.*

Die Nachweisgrenze kann für die Substanz Tramadol-HCl mit 13ng/ml ermittelt werden. Eine fast doppelt so große Konzentration ergibt sich für N-Desmethyltramadol-HCl mit 24ng/ml.

Bei den anderen Metaboliten ist die Nachweisgrenze deutlich größer. Sie liegt bei O-Desmethyltramadol-HCl um den Faktor 7.8 höher als bei Tramadol-HCl. Die Nachweisgrenzen der Metaboliten N,N,O-Tridesmethyltramadol-HCl und N,O-Didesmethyltramadol-HCl sind bei den Konzentrationen 322ng/ml und 363ng/ml um den Faktor 24.8 bzw. 28 höher als bei Tramadol-HCl.

In die Bestimmung der Nachweisgrenze gehen das Rauschen R und das Signal S ein: $S/R=3$. Bei der Ermittlung der Nachweisgrenzen aus einem Elektropherogramm, in dem fünf Substanzen nachgewiesen werden, ist der Wert des Rauschens für alle Substanzen gleich (dieser wird aus der Schwankung der ersten Datenpunkte des Elektropherogramms ermittelt). Somit sind Unterschiede in den Nachweisgrenzen auf individuelle Fluoreszenzstärken zurückzuführen. Diese beruhen nicht allein auf Differenzen in den Absorptionsquerschnitten, die für Tramadol und N-Desmethyltramadol bzw. die anderen Metaboliten im Rahmen der Fehlergrenzen gleich sind. Zu berücksichtigen sind die Wechselwirkungen der unterschiedlichen Molekülstrukturen mit ihren Umgebungen, aus denen sich offensichtlich Einflüsse auf die Fluoreszenzstärke ergeben.

Eine Bedeutung erlangen diese Werte erst im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Messungen. Dazu können die Nachweisgrenzen einer UV-Absorptionsmessung bei 214nm dienen, die in Tabelle 9.2 angegeben sind [133]:

Substanz	Nachweisgrenze [ng/ml] UV-Absorption
Tramadol-HCl	3000
N-Desmethyltramadol-HCl	2700
O-Desmethyltramadol-HCl	2640
N,O-Didesmethyltramadol-HCl	3600
N,N,O-Tridesmethyltramadol-HCl	4200

Tabelle 9.2: *Nachweisgrenzen für Tramadol und Metabolite mit UV-Absorption bei 214nm [133].*

Die Messungen sind mit folgenden Parametern bestimmt worden:
 $U=25\text{kV}$, $L=57\text{cm}$, $l=50\text{cm}$, Quarzkapillare, Innendurchmesser $50\mu\text{m}$, Aufgabe 15s, 0.5psi, 50mM Boraxpuffer $\text{pH}=10.6$. Das Lösungsmittel ist mit dem Puffer identisch.

Die Nachweisgrenzen liegen bei einer UV-Absorption im μg -Bereich. Die geringste Nachweisgrenze ergibt sich bei O-Desmethyltramadol mit $2.64\mu\text{g/ml}$, die wenig geringer als die von $2.7\mu\text{g/ml}$ bei N-Desmethyltramadol ist. Die Nachweisgrenzen der Stoffe Tramadol und N,O-Didestramadol sind mit $3\mu\text{g/ml}$ und $3.6\mu\text{g/ml}$ geringer als die von N,N,O-Tridesmethyltramadol mit $4.2\mu\text{g/ml}$.

Im Vergleich zu den Nachweisgrenzen der UV-LIF-Detektion in Tabelle 9.1 fällt auf, daß die Werte der UV-Absorption untereinander weniger schwanken und sich zwischen der kleinsten und größten Konzentration nur um den Faktor 1.6 unterscheiden. Bei den Werten der UV-LIF-Detektion beträgt dieser Faktor 28 und ist Ausdruck des Einflusses, den die Molekülstruktur bei gleicher Umgebung auf die Fluoreszenz nehmen kann.

Somit sind die Nachweisgrenzen bei der UV-Absorption größer als bei der UV-LIF-Detektion. Die Abbildung 9.2 enthält eine Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen (logarithmische Skala) für UV-Absorption und UV-LIF-Detektion, sowie die Faktoren A/L , um die die Nachweisgrenzen der UV-Absorption (A) die der UV-LIF-Detektion (L) unterschreiten.

Die Nachweisgrenzen der LIF-Detektion sind für Tramadol und N-Desmethyltramadol um zwei Größenordnungen geringer als bei einer UV-Absorption. Die Nachweisgrenzen der UV-Absorption für die Metabolite O-Des-, N,O-Dides- und N,N,O-Tridesmethyltramadol werden um eine Größenordnung durch die UV-LIF-Detektion unterschritten.

Damit sind Nachweisgrenzen erzielt worden, die einen Nachweis dieser Stoffe in unaufbereiteten Urinproben ohne Anreicherung möglich werden lassen.

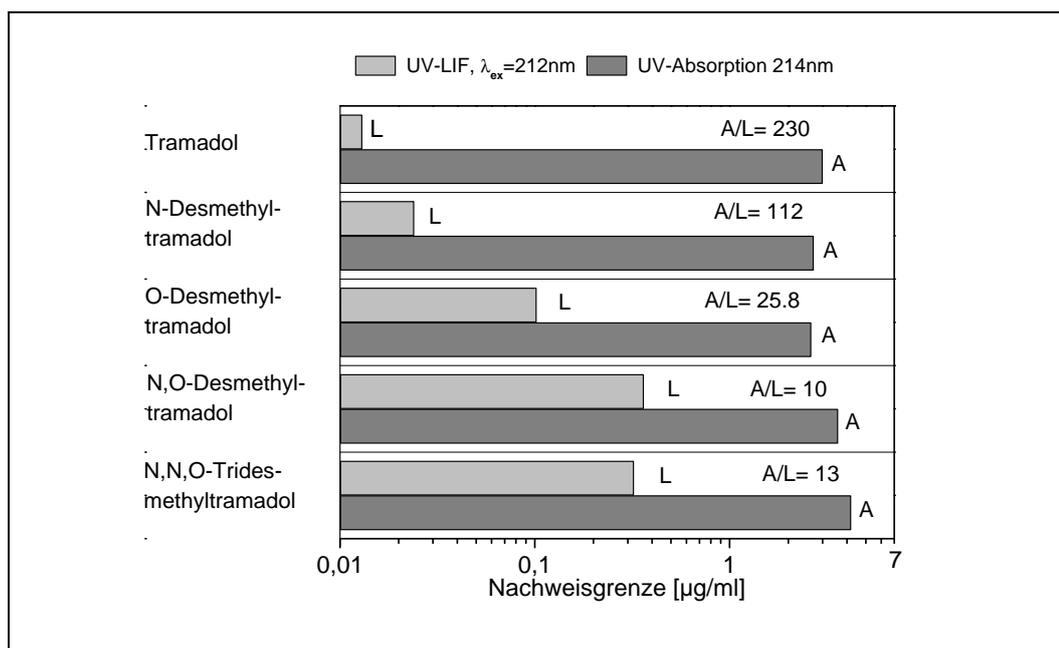


Abbildung 9.2: Die Nachweisgrenzen für UV-LIF-Detektion (L) und UV-Absorption bei 214nm (A), sowie die Verhältnisse A/L.

Die Nachweisgrenzen einer UV-LIF-Detektion mit $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ sind auch für andere Arzneistoffe bestimmt worden, wobei die Bedingung $S/R=3$ ebenfalls berücksichtigt wurde. Für diese Ergebnisse bildeten Elektropherogramme die Grundlage, bei denen jeweils nur eine Substanz angegeben wurde. Diese einzelnen Elektropherogramme sind in Abbildung 9.3 zusammengefaßt dargestellt.

Die Parameter dieser Messungen unterscheiden sich von denen der UV-LIF-Messung an Tramadol und seinen Metaboliten durch den 50mM Phosphatpuffer pH=4.6 anstelle des Boraxpuffers.

Die aufgegebenen Konzentrationen und die Nachweisgrenzen bei einer UV-LIF-Detektion sind für diese Arzneistoffe in Tabelle 9.3 angegeben. Die Nachweisgrenzen liegen im ng/ml-Bereich und unterscheiden sich für die unterschiedlichen Substanzen.

Die geringste Nachweisgrenze ist bei Verapamil-HCl mit 8ng/ml zu verzeichnen. Die Nachweisgrenzen der anderen Arzneistoffe sind höher und liegen bei Fenoterol-HBr mit 170ng/ml um den Faktor 21 höher und bei Norefensin-Hydrogenmaleat mit 109ng/ml um den Faktor 15.5 höher als bei Verapamil-HCl. Die Nachweisgrenze von Synephrin-HCl liegt mit 31ng/ml um den Faktor 4.4 höher als bei Verapamil-HCl.

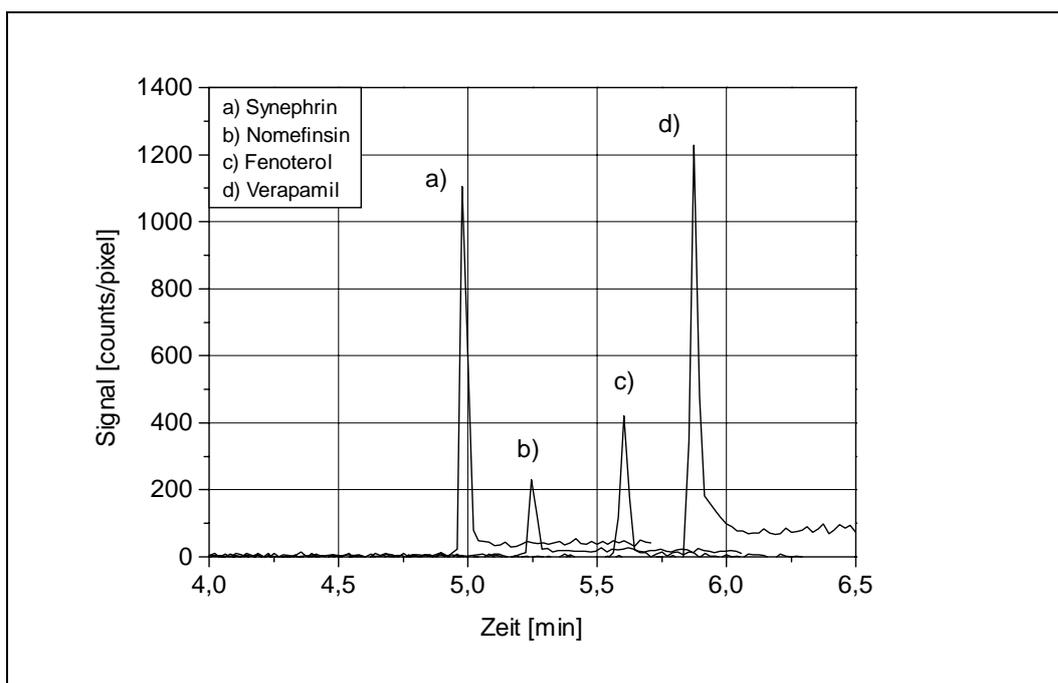


Abbildung 9.3: *Elektropherogramme für a) Synephrin, b) Norefensin, c) Fenoterol und d) Verapamil zur Bestimmung der Nachweisgrenzen, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$, 50mM Phosphatpuffer $\text{pH}=4.6$.*

Auch bei diesen Substanzen ergeben sich die Unterschiede in den Nachweisgrenzen nicht durch entsprechende Abweichungen in den Werten des Rauschens oder in den Absorptionsquerschnitten. Diese differieren z.B. für Fenoterol und Propranolol um den Faktor 2, während sich die Nachweisgrenzen um den Faktor 20 unterscheiden. Bei gleichen Molekülumgebungen (identische Puffer) sind die Molekülstrukturen für die Fluoreszenz von Bedeutung:

Propranolol besitzt im Gegensatz zu Fenoterol zwei kondensierte Benzolringe, und Fenoterol besitzt zwei voneinander getrennte Benzolringe, die kein gemeinsames π -Elektronensystem aufbauen können.

Substanz	aufgegebene Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Nachweisgrenze [ng/ml]UV-LIF
Synephrin-HCl	3.94	31
Norefensin-Hydrogenmaleat	4.8	109
Fenoterol-HBr	10	170
Verapamil-HCl	1.2	8

Tabelle 9.3: *Aufgegebene Konzentrationen und Nachweisgrenzen ausgewählter Arzneistoffe mit UV-LIF-Detektion bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$, Binning Modus $4 \cdot 8$.*

Auch diese Nachweisgrenzen müssen mit denen anderer Messungen verglichen werden. Dazu sind Daten für Norefensin-Hydrogenmaleat und Synephrin-HCl einer Absorptionsmessung bei 214nm [133] in Tabelle 9.4 angegeben. Absorptionsmessungen für Fenoterol-HBr und Verapamil-HCl wurden nicht durchgeführt. Für die Nachweisgrenzen dieser Substanzen stehen daher keine Werte zur Verfügung.

Substanz	Nachweisgrenze [ng/ml] UV-Absorption
Synephrin-HCl	4920
Norefensin-Hydrogenmaleat	5960
Fenoterol-HBr	k.A.
Verapamil-HCl	k.A.

Tabelle 9.4: *Nachweisgrenzen von Synephrin und Norefensin bei UV-Absorption mit 214nm (k.A.: keine Angabe).*

Die Parameter dieser Absorptionsmessungen sind mit denen für die Messung der Nachweisgrenzen bei Tramadol und den Metaboliten auf Seite 123 identisch. Ein Vergleich der Daten für Norefensin-Hydrogenmaleat und Synephrin-HCl aus den Tabellen 9.3 und 9.4 zeigt eine niedrigere Nachweisgrenze bei der UV-LIF-Detektion.

Die Nachweisgrenze kann bei Norefensin-Hydrogenmaleat um den Faktor 54 und bei Synephrin-HCl um den Faktor 158 gesenkt werden. Die Abbildung 9.4 faßt diese Ergebnisse zusammen, wobei auch das Verhältnis A/L angegeben ist, mit dem die UV-LIF-Detektion (L) die Nachweisgrenzen der UV-Absorption (A) unterschreiten:

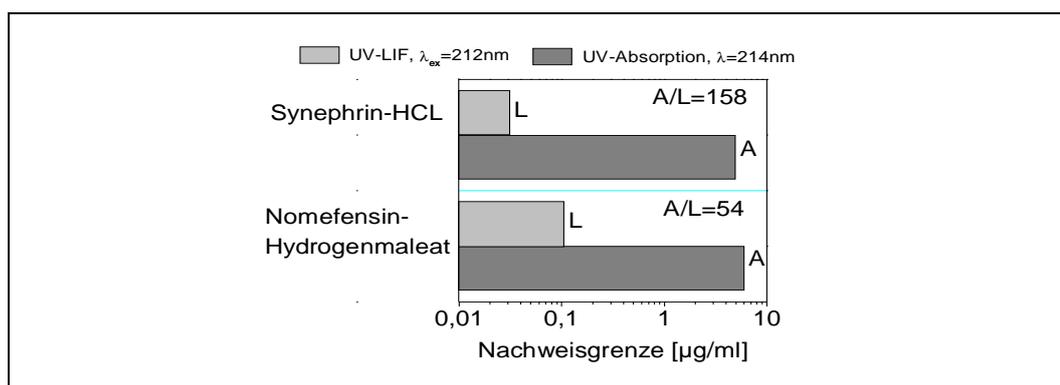


Abbildung 9.4: *Die Nachweisgrenzen für UV-LIF-Detektion (L) und UV-Absorption bei 214nm (A), sowie das Verhältnis A/L.*

In der Tabelle 9.5 sind die aufgegebenen Konzentrationen und nachweisbaren Teilchenmengen aufgelistet.

Substanz	aufgegebene Teilchen $\cdot 10^{10}$	Nachweisgrenze Teilchen $\cdot 10^8$
Tramadol-HCl	8.73	1.19
N-Desmethyltramadol-HCl	9.25	1.62
O-Desmethyltramadol-HCl	13.29	14.29
N,O-Didesmethyltramadol-HCl	12.56	48.31
N,N,O-Tridesmethyltramadol-HCl	10.81	34.87
Synephrin-HCl	5.35	4.2
Nomofensin-Hydrogenmaleat	3.75	8.5
Fenoterol-HBr	7.21	12.26
Verapamil-HCl	6.62	3.89

Tabelle 9.5: Aufgegebene und minimal nachweisbare Teilchenmengen bei UV-LIF mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212nm$.

Die bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212nm$ ermittelten Nachweisgrenzen entsprechen Teilchenmengen im Bereich 10^9 bis 10^8 . Die Zahl der in dem detektierten Volumen enthaltenen Teilchen kann bestimmt werden, indem die Größe des detektierten Volumens mit Hilfe der Gleichung 4.1 ermittelt und die Konzentrationsangabe in Verbindung mit den im Anhang B enthaltenen Molekulargewichte und der Avogadro-Konstanten in absolute Teilchenzahlen überführt wird.

9.2 Anregungswellenlänge 270nm

In diesem Kapitel werden die Nachweisgrenzen einer UV-LIF-Detektion bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ für Tramadol, seine Metabolite und ausgewählte Arzneistoffe vorgestellt und mit den Ergebnissen der UV-LIF-Messungen bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ aus dem Kapitel 9.1, sowie UV-Absorptionsmessungen bei 214nm verglichen.

Die Nachweisgrenzen für Tramadol und seine Metaboliten wurden aus den Elektropherogrammen einer Gemischtrennung ermittelt, von denen eins in Abbildung 9.5 exemplarisch dargestellt ist. Das summierte Signal umfaßt aufgrund der spektralen Überlagerung mit dem Wasser-Raman-Signal nicht die gesamte Fluoreszenz. Die Parameter dieser Messungen stimmen mit denen bei $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ auf Seite 121 überein.

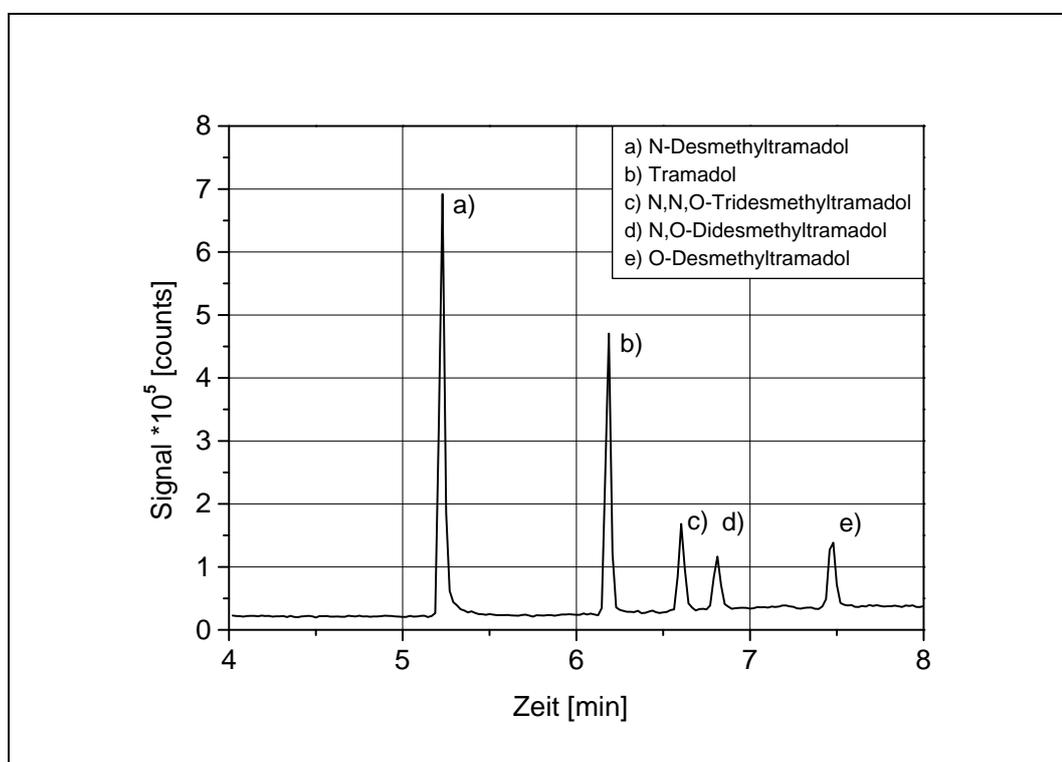


Abbildung 9.5: *Elektropherogramm von Tramadol und seiner Metabolite zur Bestimmung der Nachweisgrenzen, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$, 50mM Boraxpuffer $pH=10.65$.*

Die absoluten Signalthöhen sind bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ für alle gezeigten Substanzen kleiner als bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$.

Die Nachweisgrenzen sind auch hier unter der Bedingung $S/R = 3$ ermittelt worden. Zusammen mit den Werten der aufgegebenen Konzentrationen sind die Nachweisgrenzen in der Tabelle 9.6 zusammengefaßt.

Substanz	aufgegebene Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Nachweisgrenze [ng/ml] UV-LIF
Tramadol	9.5	16
N-Desmethyltramadol	13.7	20
O-Desmethyltramadol	9.5	57
N,O-Didesmethyltramadol	12.3	63
N,N,O-Tridesmethyltramadol	10	32

Tabelle 9.6: Nachweisgrenzen für Tramadol und seine Metaboliten, UV-LIF-Detektion mit $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$.

Die Nachweisgrenzen liegen für alle Substanzen im ng/ml -Bereich und können mit denen aus Tabelle 9.1 (UV-LIF, $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$) unmittelbar verglichen werden, da bei diesen Messungen von allen Parametern nur die Anregungswellenlänge verändert wurde.

Eine Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen der UV-LIF-Detektion mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ (L) mit den Werten der Nachweisgrenzen der UV-Absorption (A) bei 214nm ist für Tramadol und die Metabolite in Abbildung 9.6 mit den Verhältnissen A/L angegeben.

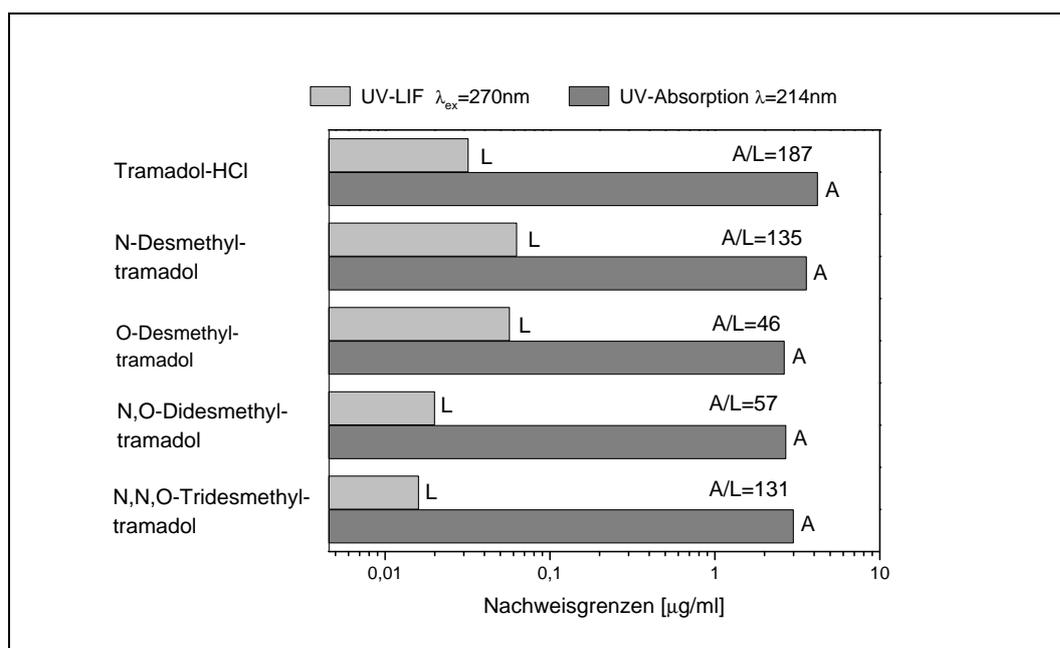


Abbildung 9.6: Vergleich der Nachweisgrenzen ausgewählter Arzneistoffe bei UV-LIF und UV-Absorption.

Die Nachweisgrenzen für Tramadol und N-Desmethyltramadol unterscheiden sich mit den Werten 16ng/ml und 20ng/ml nur wenig von den Werten 13ng/ml und 24ng/ml bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$.

Größere Unterschiede sind bei den anderen Metaboliten zu verzeichnen, denn die Anregung mit der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ führt zu einer Senkung der Nachweisgrenzen. Für O-Desmethyltramadol kann die Nachweisgrenze von 102ng/ml um die Hälfte auf 57ng/ml reduziert werden.

Bei dem Metaboliten N,O-Didesmethyltramadol kann die Nachweisgrenze von 463ng/ml um den Faktor 7.3 auf 63ng/ml verringert werden und bei N,N,O-Tridesmethyltramadol ist eine Senkung der Nachweisgrenze von 332ng/ml auf 32ng/ml um eine Größenordnung erreicht worden.

Auffällig ist die im Vergleich zu den Werten bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 212\text{nm}$ geringere Spannweite der Nachweisgrenzen. Die Konzentrationen der geringsten und höchsten Nachweisgrenze von 16ng/ml bzw. 63ng/ml unterscheiden sich um den Faktor 4, der sieben mal geringer ist als bei den Werten mit der Anregungswellenlänge $\lambda = 212\text{nm}$.

Verantwortlich für die Reduzierung der Nachweisgrenzen beim Wechsel der Anregungswellenlänge ist zum einen die Senkung der Standardabweichung, mit der das Rauschen $3 \cdot \sigma$ bestimmt wird, vgl. auch Kapitel 8.7.1. Die Standardabweichung des Untergrundsignals (σ) ist bei der Anregungswellenlänge 270nm ca. um den Faktor drei geringer als bei der Anregung mit der Wellenlänge 212nm und geht direkt in die Ermittlung der Nachweisgrenze ein.

Unter Berücksichtigung dieses Effektes muß vermutet werden, daß die Fluoreszenzstärken von Tramadol und N-Desmethyltramadol nach einer Anregung mit 270nm geringer als bei 212nm sind, da die Nachweisgrenzen nicht um den Faktor drei gesunken, sondern im wesentlichen gleich geblieben sind.

Demgegenüber stehen die deutlich gesunkenen Nachweisgrenzen der anderen Metabolite. Neben einer Senkung des Wertes für die Standardabweichung muß für N,O-Didesmethyltramadol und N,N,O-Tridesmethyltramadol eine Steigerung der Fluoreszenzstärke vorliegen. Diese Zunahme wiederum ist nicht aus dem Absorptionsspektrum abzuleiten. Die Absorptionsquerschnitte sind bei 270nm ca viermal geringer als bei 212nm.

Die Nachweisgrenzen anderer Arzneistoffe sind aus Elektropherogrammen zu den einzelnen Substanzen bestimmt worden, wie sie in Abbildung 9.7 mit der Angabe eines gemittelten Fluoreszenzsignals zusammengefaßt sind². Bei die-

²Eine Änderung der zeitlichen Reihenfolge zu der in Abbildung 9.3 ist durch Tempera-

sen Signalen ist ebenfalls nur der Bereich des Fluoreszenzsignals berücksichtigt worden, der spektral nicht mit dem Wasser-Raman-Signal überlappt.

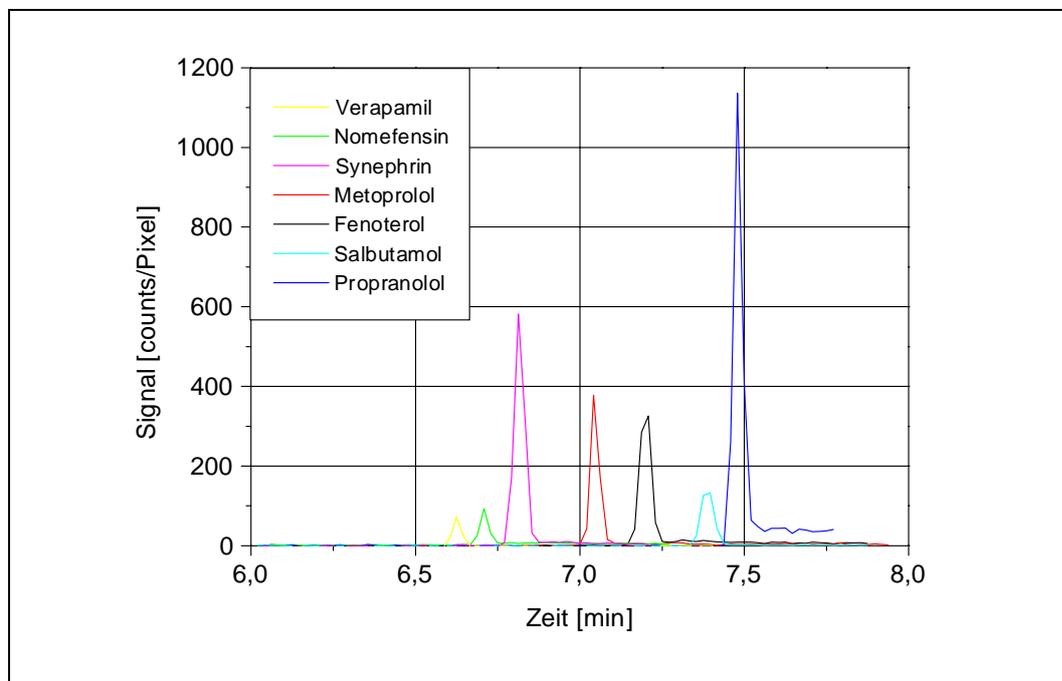


Abbildung 9.7: *Elektropherogramme: ausgewählte Arzneistoffe, $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$, 50mM Phosphatpuffer $\text{pH}=4.6$.*

Die Parameter der Meßreihen für die Arzneistoffe in Abbildung 9.7 unterscheiden sich von denen zu Tramadol und den Metaboliten nur in der Wahl eines Phosphatpuffers an Stelle eines Boraxpuffers. In der Tabelle 9.7 sind die Nachweisgrenzen der UV-LIF-Detektion mit $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ und die aufgegebenen Konzentrationen ausgewählter Arzneistoffe aufgelistet. Die Nachweisgrenzen liegen für alle Substanzen im ng/ml-Bereich.

Die geringste Nachweisgrenze wird bei Propranolol mit 9.6ng/ml gemessen. Sie hat sich von 8ng/ml bei der Anregungswellenlänge 212nm um den Faktor 1.2 erhöht, während die Nachweisgrenzen der anderen Arzneistoffe in Tabelle 9.7 vermindert worden sind und im Bereich zwischen 19ng/ml und 66ng/ml liegen.

Die Nachweisgrenze von Fenoterol kann von 170ng/ml um den Faktor 2.5 auf 66ng/ml gesenkt werden. Eine Senkung der Grenze um den Faktor 1.7 ist bei Norefensin von 109ng/ml auf 63ng/ml und um den Faktor 1.6 von 31ng/ml

turunterschiede begründet.

auf 19.5ng/ml bei Synephrin erreicht worden. Die Nachweisgrenze von Metoprolol liegt bei 24ng/ml und die von Salbutamol bei 23ng/ml.

Somit zeigt sich innerhalb der UV-LIF-Messungen eine Abhängigkeit der Nachweisgrenze von der Anregungswellenlänge. Neben der Zunahme des absoluten Fluoreszenzsignals ist bei den Änderungen der Nachweisgrenzen, die sich für fast alle in Tabelle 9.7 aufgeführten Substanzen gegenüber der Anregung mit der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ verringert haben, die Reduzierung des Untergrundrauschens $3 \cdot \sigma$ maßgeblich beteiligt.

Substanz	aufgegebene Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Nachweisgrenze [ng/ml] UV-LIF
Verapamil	1.2	34
Fenoterol	10	66
Nomefensin	4.8	63
Salbutamol	4.6	23
Metoprolol	3.6	24
Propranolol	4.8	9.6
Synephrin	3.9	19

Tabelle 9.7: *Nachweisgrenzen für ausgewählte Arzneistoffe, UV-LIF-Detektion bei $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$.*

Da die Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ auf die Substanzen Tramadol und die Metabolite abgestimmt ist, deren Fluoreszenzmaxima bei dieser Anregungswellenlänge liegen, kann eine weitere Senkung der Nachweisgrenze bei Anpassung der Anregungswellenlänge an die zu untersuchende Substanz im Einzelfall erzielt werden, wenn das absolute Fluoreszenzmaximum außerhalb des hier untersuchten Bereiches der Anregungswellenlängen liegt.

Weiterhin können die Nachweisgrenzen der UV-LIF-Messungen und $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ mit den Ergebnisse der UV-Absorptionsmessungen in der Tabelle 9.8 [133] verglichen werden, die teilweise auch auf Seite 125 dargestellt ist. Für die Arzneistoffe Verapamil und Fenoterol stehen keine Vergleichsmessungen zur Verfügung.

Die Nachweisgrenzen bei den UV-Absorptionsmessungen liegen für alle Substanzen im unteren $\mu\text{g}/\text{ml}$ -Bereich und somit deutlich höher als die der UV-LIF-Messungen, die in der Größenordnung ng/ml liegen.

Der größte Unterschied zwischen den Nachweisgrenzen ist bei Synephrin vorhanden. Die Konzentration von $4.93\mu\text{g}/\text{ml}$ bei UV-Absorption kann mit der LIF-Detektion bei $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ um den Faktor 259 gesenkt werden.

Eine Gegenüberstellung der mit UV-LIF-Detektion (L) und UV-Absorption (A) gewonnenen Nachweisgrenzen sind in Abbildung 9.8 dargestellt. Dort sind

Substanz	Nachweisgrenze [ng/m] UV-Absorption
Nomefensin-Hydrogenmaleat	5960
Salbutamol-Sulfat	5790
Metoprolol-Tartrat	4580
Propranolol-HCl	1220
Synephrin-HCl	4930

Tabelle 9.8: Nachweisgrenzen für ausgewählte Arzneistoffe mit UV-Absorption bei 214nm [133].

ebenfalls die Verhältnisse A/L eingetragen, welche die Senkung der Nachweisgrenzen durch die UV-LIF-Detektion angeben.

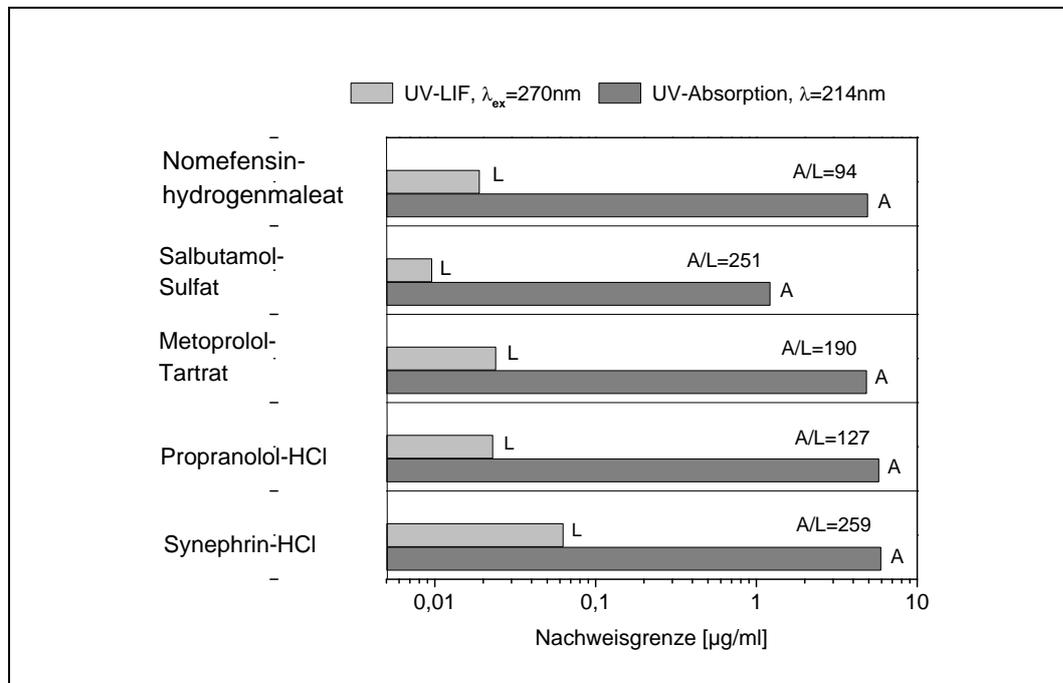


Abbildung 9.8: Vergleich der Nachweisgrenzen ausgewählter Arzneistoffe bei UV-LIF und UV-Absorption.

Die den Konzentrationen und Nachweisgrenzen entsprechenden Teilchenzahlen sind für Tramadol, seine Metabolite und ausgewählte Arzneistoffe in Tabelle 9.9 aufgeführt:

Die nachweisbaren Teilchenmengen liegen bei der UV-LIF-Detektion mit der Anregungswellenlänge 270nm unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls $3 \cdot \sigma$ bei $\approx 10^8$ Teilchen.

Substanz	aufgegebene Teilchen[*10 ¹⁰]	Nachweisgrenze Teilchen [*10 ⁸]
Tramadol	8.7	1.47
N-Desmethyltramadol	9.2	1.3
O-Desmethyltramadol	13.3	8
N,O-Didesmethyltramadol	12.5	6.4
N,N,O-Tridesmethyltramadol	10.8	3.5
Verapamil	6.6	14.4
Fenoterol	7.2	2.7
Nomefensin	3.7	4.9
Salbutamol	11.1	5.5
Metoprolol	3.7	1.9
Propranolol	11.7	1.7
Synephrin	5.4	2.1

Tabelle 9.9: *Aufgegebene und minimal nachweisbare Teilchenmengen bei UV-LIF-Detektion mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$.*

Ein Vergleich der Ergebnisse aus diesem und dem Kapitel 9.1 zeigt bei der Anregungswellenlänge 270nm für fast alle in dieser Arbeit vermessenen Substanzen eine Verringerung der Nachweisgrenze. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bei vielen Substanzen im Gegensatz zu der Anregungswellenlänge 212nm nicht das gesamte detektierbare Fluoreszenzsignal aufgrund der spektralen Überlagerung des Wasser-Raman-Signals genutzt werden konnte. Häufig wird damit die Auswertung des Fluoreszenzmaximums unterbunden und dennoch eine geringere Nachweisgrenze erzielt.

Dabei zeigt sich der entscheidende Einfluß der Standardabweichung σ des Untergrundsignals auf die Nachweisgrenze, die mit der Beziehung $S = 3 \cdot \sigma$ bestimmt wird. Bei diesen Messungen ist das Untergrundrauschen bei verschiedenen Messungen nicht konstant gewesen. Es wird durch die Wahl der Anregungswellenlänge und den für die Auswertung verwendeten spektralen Bereich bestimmt. Zusätzlich ergeben sich Unterschiede zwischen den Fluoreszenzen der Kapillaren und der Puffer.

Somit sind viele Parameter an den konkret ermittelten Werten des Untergrundrauschens beteiligt, die nicht konstant gehalten werden können und einer sorgfältigen Kontrolle unterliegen müssen, um eine Senkung der Nachweisgrenzen um mehr als zwei Größenordnungen gegenüber den Werten einer UV-Absorption zu ermöglichen.

Zusätzlich kann diesen Messungen entnommen werden, daß die Kenntnis des Absorptionsspektrums allein keine Aussagen über die Stärke der Fluoreszenz erlaubt, wie die Beispiele z.B. an den Metaboliten gezeigt haben, die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen an Daunorubicin aus Kapitel 8.1 sind.

9.3 Diskussion der Meßfehler

Die CZE-Messungen mit dem modifizierten Grom-Gerät sind nicht mit einem beliebig kleinen Fehler ermittelt worden. Statt dessen ergeben sich bei den in Kapitel 9.1 und 9.2 gezeigten Elektropherogrammen absolute Signalfehler von 15% bis 18%, die unabhängig von der untersuchten Substanz sind und innerhalb einer Meßreihe oder an verschiedenen Tagen beobachtet wurden.

Es stellte sich heraus, daß der größte Fehler bei diesen Messungen in der Probenaufgabe lag, die neben einer Variation der absoluten Signalstärken auch einen Einfluß auf die Detektionszeiten ausübte. Die nachfolgenden Ausführungen sollen die Größenordnung der verschiedenen Fehler aufzeigen, die im konkreten Fall genau zu bestimmten sind.

Als Fehlerquellen sind bei diesen Messungen grundsätzlich:

- der „shot noise“,
- das Ausbleichen,
- das Untergrundrauschen,
- die Probeninjektionszeit,
- die aufgegebene Probenmenge,
- die Laserintensitätsschwankungen und
- die nicht kontinuierliche Signaldetektion

zu nennen, deren Beiträge im Folgenden dargestellt werden.

Von diesen Fehlerquellen können die Laserintensitätsschwankungen, das „shot noise“, das Ausbleichen, die Probeninjektionszeit und das Untergrundrauschen unabhängig voneinander bestimmt werden. Der verbleibende Fehler durch Schwankungen in der Probenaufgabe, die die Menge der in die Kapillare injizierten Probe mit fester Konzentration bezeichnet, kann dann mit Hilfe der Gaußschen Fehlerfortpflanzung bestimmt werden.

Die Laserintensitätsschwankungen sind in Kapitel 5.4 untersucht worden. Die sich ergebenden Fehler für das im Kamerabild detektierte Fluoreszenz- oder Wasser-Raman-Signal (mit und ohne Normierung auf das Diodensignal) weisen eine Standardabweichung von ca. 3% auf, unabhängig von der untersuchten Substanz oder dem Zeitpunkt.

Das Fluoreszenzsignal S der verschiedenen Substanzen kann bei der verwendeten Konzentrationen durch Mittelwerte zwischen $S = 200$ und $S = 4000$ Photoelektronen angegeben werden³.

³Das Untergrundrauschen des Kamerabildes und das Ausleserauschen werden in dieser Darstellung vernachlässigt.

Bei einem „shot noise“ von \sqrt{S} (siehe Seite 4.4) liegt der relative Fehler des Mittelwertes mit $F = 1/\sqrt{S}$ zwischen 1.5% und 7%. Er kann durch Mittelung über N ausgelesene Pixel des Kamerabildes zusätzlich gesenkt werden und ergibt sich zu $F = 1/\sqrt{N \cdot S}$. Somit liegt der Fehler der Signalmittelwerte in der Größenordnung von 0.5% – 2.2%. Als unabhängige Fehlerquellen tragen die Laserintensitätsschwankungen und der „shot noise“ mit höchstens 3.7% zu dem Gesamtfehler bei.

Als weitere Quelle der Signalschwankungen ist das Ausbleichen der Substanzen zu untersuchen.

Während der 0.2s bis 0.3s, die für das Auslesen des CCD-Kamerachips benötigt werden, verliert die Fluoreszenz durch die ungehinderte Laserbestrahlung (zwei bis drei Laserpulse) an Intensität. Dieser Einfluß zeigt sich besonders, wenn die Probe das Detektionsfenster erreicht hat und zu diesem Zeitpunkt die Kamera ausgelesen wird.

Diese Fehlerquelle kann mit Hilfe der Elektropherogramme zu den Gemischtrennungen von Tramadol und den Metaboliten untersucht und ihr maximaler Einfluß abgeschätzt werden.

Innerhalb verschiedener Elektropherogramme sollten die Signalverhältnisse der fünf Substanzen konstant sein. Beobachtet wird statt dessen eine Variationen dieser Verhältnisse. Diese Schwankungen sind nicht durch unterschiedliche Konzentrationen herbeigeführt worden, da stets dasselbe Gemisch verwendet wurde. Mit der Wahl des Signals von N-Desmethyltramadol als Referenzwert können die Signalverhältnisse der anderen vier Signale zu diesem gebildet werden, um einen Einfluß auf das absolute Signal der Substanzen in verschiedenen Elektropherogrammen durch Schwankungen der in die Kapillare injizierten Menge auszuschließen.

Für die Anregungswellenlänge 270nm betragen diese Verhältnisse 1/0.67 für Tramadol, 1/0.22 für N,N,O-Trides-, 1/0.14 für N,O-Dides- und 1/0.18 für O-Desmethyltramadol, vgl. Abbildung 9.5. Bei der Auswertung von 15 Elektropherogrammen zeigt sich beim Signalverhältnis des kleinsten Signals (N,O-Didesmethyltramadol) der größte Fehler mit 9%. In diesem Fehler sind der „shot noise“ und die Laserintensitätsschwankungen bekannt. Aus der Gaußschen Fehlerfortpflanzung ergibt sich der maximale Fehler a des Ausbleichens:

$$\begin{aligned}\sqrt{(2.2\%)^2 + (3\%)^2 + (a\%)^2} &= 9\% \\ \implies a &= 8.2\%\end{aligned}$$

Bei Tramadol ist dieser relative Fehler am kleinsten und bestimmt sich analog zu 3.5%.

Durch eine Normierung des Signals auf einen Referenzwert, der als Interner Standard bezeichnet und der zu untersuchenden Probe in gleichbleibender Konzentration zugemischt wird, können die durch Unregelmäßigkeiten in der Probenaufgabe hervorgerufenen Signalschwankungen eliminiert und die Fehler in diesem Fall um ca. die Hälfte gesenkt werden.

Bei einem Vergleich der Elektropherogramme ohne eine Normierung auf die Konzentration einer der Substanzen, wie sie im Fall von Tramadol und den Metaboliten vorgenommen werden kann, zeigt sich auch bei den anderen Arzneistoffen ein Fehler in der Signalstärke zwischen 15% und 18%. Nachdem die Größen der anderen Fehlerquellen abgeschätzt sind, bleibt der durch die Ungenauigkeit der Injektionszeit bedingte Probenaufgabefehler zu beschreiben und zu bestimmen.

Bei der Probenaufgabe wurde stets dasselbe Konzentrationsgemisch verwendet, so daß Variationen in der Konzentration als Fehlerquelle auszuschließen sind. Einen Einfluß auf das Signal kann die aufgegebene Menge haben, wenn diese so gering ist, daß die Länge der in die Kapillare injizierte Probe kleiner als das Detektionsfenster ist. In diesem Fall ist das Fluoreszenzsignal direkt proportional zu der Zahl der angeregten Teilchen. Wird die Probenlänge über die des Detektionsfensters hinaus erweitert, ist die Zahl der angeregten Teilchen nur von der Länge des Detektionsvolumens abhängig und somit konstant, wenn der Probenein- und Austritt aus dem Detektionsfenster unberücksichtigt bleiben. Mit Hilfe der Gleichung 4.1 kann die Höhe der injizierten Probe abgeschätzt werden, die ca. 1.5mm beträgt. Bei einem (großzügig) abgeschätzten Fehler von 1s bei der Injektionszeit von 15s ergibt sich ein Fehler von nur maximal 6%, der nicht in Verbindung mit den schon diskutierten Fehlern den beobachteten Fehler von maximal 18% bestimmen kann.

Der verbleibende Fehler wird auf zusätzliche Unregelmäßigkeiten bei der Probenaufgabe zurückgeführt und mit folgenden Ausführungen abgeschätzt:

Ausschlaggebend für diese Vermutung ist die Beobachtung, daß bei den CZE-Messungen neben den oben gezeigten und diskutierten Elektropherogrammen auch solche ermittelt worden sind, die kein Fluoreszenzsignal der Probe enthalten. Aus einer Menge von z.B. sechs Elektropherogrammen kann bei konstanter Umgebungstemperatur und gleicher Kapillare der Detektionszeitpunkt auf $\pm 5s$ nach einer Migrationszeit von bis zu acht Minuten genau bestimmt werden. Elektropherogramme ohne ein Signal wurden ca. eine Minute nach dem erwarteten Detektionszeitpunkt abgebrochen.

Im Gegensatz dazu sind teilweise Fluoreszenzsignale nachgewiesen worden, deren Detektionszeitpunkt bis zu einer Minute vor dem erwartetem Zeitpunkt lag.

Alle Elektropherogramme, die ein Fluoreszenzsignal außerhalb dieser zeitlichen Fehlergrenze von $\pm 5s$ enthalten, welches oftmals bis um den Faktor 10 vermindert war, sind in den obigen Statistiken nicht berücksichtigt worden.

Die nicht der injizierten Konzentration entsprechenden Fluoreszenzsignale zu einem nicht erwarteten Zeitpunkt zeigen keine zusätzliche Schweifbildung und stimmten nach der spektralen Analyse mit der aufgegebenen Substanz überein. Damit wird ausgeschlossen, daß z.B. durch Verunreinigung versehentlich an-

dere Substanzen in die Kapillare injiziert und nachgewiesen wurden. Das oftmals verminderte Fluoreszenzsignal deutet auf Fehler bei der Probeninjektion mit dem Aufgabeblock in Abbildung 4.2 hin. Vermutlich wird das Probenreservoir mit der Probe nicht gleichmäßig gefüllt, so daß entweder eine verdünnte Probe in die Kapillare injiziert wird und/oder Reste des Puffers an der Öffnung der Kapillare vor der Probe in diese gelangen und ein vermindertes Signal zur Folge haben. Variationen in der Geschwindigkeit, mit der das Reservoir gefüllt wurde, konnten die verschiedenen Detektionszeitpunkte und Fluoreszenzsignale nicht beeinflussen.

Dieser Fehler bei der Probeninjektion wird für die Entstehung des in der obigen Diskussion verbleibenden Fehlers verantwortlich gemacht.

Die beobachteten Fehler von bis zu 18% enthalten den obigen Ausführungen folgend, Ungenauigkeiten in der Laserintensität und der Aufgabezeit, das „shot noise“, das Ausbleichen in der Größenordnung von ca. 11%. Daraus ergibt sich der Fehler in der Probenaufgabe zu ca. 14%. Dieser ist größer als die Beiträge aller anderen Fehler und konnte nicht beseitigt werden.

Eine Minimierung dieses Fehlers kann durch die Verwendung einer automatischen Probenaufgabe erfolgen, die andere Geometrien der Injektion verwendet und eine höhere Reproduzierbarkeit als eine manuelle Bedienung bietet. Damit wird auch der Einfluß in der Ungenauigkeit der Injektionszeit verringert. Das Probenausbleichen während des Auslesens der Kamera kann mit zwei Maßnahmen reduziert oder verhindert werden. Zum einen kann ein Strahlblocker verwendet werden, der die Bestrahlung der Probe während dieses Zeitraumes verhindert. Zusätzlich kann eine Kamera mit kürzeren Auslesezeiten verwendet werden.

Zum anderen kann der Einfluß der hohen Leistungsdichten eines gepulsten Lasersystems durch eines mit kontinuierlicher Strahlung reduziert werden.

Die Laserintensitätsschwankungen sind grundsätzlich bei einem gepulsten System nicht zu vermeiden, können aber durch den Einsatz eines Lasers mit kontinuierlicher Strahlung gesenkt werden. Entsprechendes gilt für die räumlichen Intensitätsschwankungen des Laserprofils.

Der Fehler des „shot noise“ läßt sich bei der Detektion mit einer ICCD-Kamera nicht vermeiden. Seine relative Größe sinkt mit steigender Signalstärke, so daß eine Reduzierung dieses Fehlers nur durch noch effizientere Abbildungsoptiken erreicht werden kann.

Kapitel 10

Anwendungsbeispiel

Die bisher vorgestellten Ergebnisse bezogen sich auf Experimente mit Modellcharakter. Dabei wurde unter anderem ein Trennsystem für ein in Boraxpuffer gelöstes Gemisch aus Tramadol und seinen Metaboliten entwickelt, und die Nachweisgrenzen dieser Substanzen wurden bestimmt.

Die folgenden Messungen beziehen sich auf den Nachweis dieser Arzneistoffe in einer unaufbereiteten, körpereigenen Flüssigkeit: Urin.

Bei einer unaufbereiteten Probe entfallen die arbeits- und zeitintensiven Maßnahmen der Reinigung und Aufkonzentrierung, und somit werden mögliche Fehlerquellen bei der Extraktion der Substanzen und der Konzentrationsbestimmung ausgeschlossen.

Die verfolgten Fragestellungen bei diesen Messungen beziehen sich darauf, ob typische Konzentrationen dieser Arzneistoffe für einen UV-LIF-Nachweis groß genug sind, um die Arzneistoffe in dieser Matrix voneinander trennen zu können und ob andere im Urin vorhandene Stoffe, wie z.B. Tyrosin und Phenylalanin einen unerwünschten Fluoreszenzuntergrund erzeugen und das Rauschen erhöhen.

Es standen zwei unterschiedliche Urinproben zur Verfügung, die sich in ihrem Sammelintervall 2-4 und 6-8 Stunden nach der Einnahme von 100mg Tramadol-HCl unterschieden und deren Fluoreszenz nach der Anregung mit den Wellenlängen $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ bzw. $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ untersucht wurden.

Alle nachfolgenden CZE-Messungen wurden mit dem in Abbildung 4.12 skizzierten apparativen Aufbau des Gromsystems in Kombination mit einem Spektrometer und der Strahlung des Farbstofflasers erstellt. Für die Auswertung der Kamerabilder wurde der spektrale Bereich zwischen 300nm und 320nm bei der Anregungswellenlänge 270nm und der Bereich zwischen 280nm und 300nm bei der Anregungswellenlänge 212nm berücksichtigt.

Für die CZE-Messungen wurden Parameter verwendet, die für die Trennung des Gemisches von Tramadol und den Metaboliten geeignet sind und schon auf Seite 121 aufgeführt worden sind: $U=25\text{kV}$, $L=73\text{cm}$, $l=43\text{cm}$, 50mM Boraxpuffer $\text{pH}=10.65$, 0.2mJ/puls , Quarzkapillare, Innendurchmesser $50\mu\text{m}$, Aufgabe 15s , $20\mu\text{l}$, Höhendifferenz 15cm , Binning-Modus $4 \cdot 8$.

Die sichere Identifizierung aus der Vielzahl von Signalen erfolgte durch eine Anreicherung der Probe mit den entsprechenden Substanzen, die sich auf den Arzneistoff Tramadol und die vier Metaboliten O-Des-, N-Des-, N,O-Dides- und N,N,O-Tridesmethyltramadol beschränken. Im Elektropherogramm ist dabei das entsprechende Fluoreszenzsignal gegenüber dem der ursprünglichen und nicht angereicherten Probe vergrößert.

Alle folgenden Abbildungen sind bezüglich der spektralen Effizienz des Detektorsystems korrigiert, vgl. Seite 44.

10.1 Leerurin

Die im folgenden Kapitel untersuchten Urinproben enthalten den Arzneistoff Tramadol und einige Metaboliten. Eine grobe Interpretation der auftretenden Signale kann in einem Vergleich mit einer Leerurin-Probe erfolgen, die vor der Einnahme des Arzneistoffes gewonnen wurde. Diese Probe Leerurin stand nicht zur Verfügung. Um dennoch einen Vergleich herbeiführen zu können, wird unter der gerechtfertigten Annahme, daß sich Leerurin-Proben verschiedener Probanden ohne die Einnahme von Medikamenten und Nierenschäden nicht wesentlich voneinander unterscheiden, auf eine Leerurin-Probe des Autors zurückgegriffen. Ernährungsbedingte Differenzen und individuelle Merkmale können jedoch vorhanden sein.

Die Abbildung 10.1 zeigt das Elektropherogramm mit einem integrierten Fluoreszenzsignal, welches mit der UV-LIF-Detektion bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ gemessen wurde. Darunter ist die zugrundeliegende und spektral aufgelöste Kamerabildfolge dieser Leerurin-Probe dargestellt.

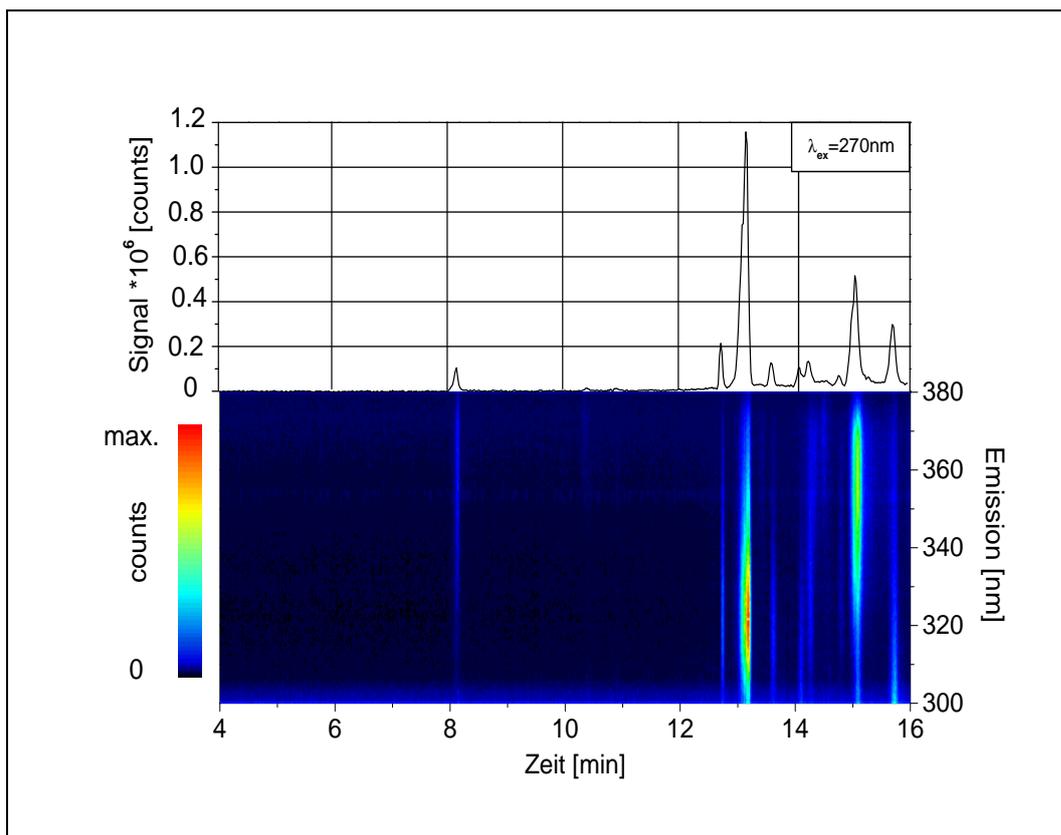


Abbildung 10.1: *Elektropherogramm und spektral aufgelöste Kameraprofile einer Leerurin-Probe mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$.*

Jede Spalte dieses Bildes entspricht einem Profil über mehrere Zeilen in einem Kamerabild, welches farblich codiert worden ist. Die Aneinanderreihung solcher Profile zu verschiedenen Zeitpunkten ergibt das in Abbildung 10.1 unten gezeigte Bild (vgl. die Ausführungen in Kapitel 7.1).

Das erste Signal kann bei ca. acht Minuten detektiert werden. Die spektrale Untersuchung dieses Signals zeigt keine Ähnlichkeit mit den Fluoreszenzmustern von Tramadol und seinen Metaboliten. Eine Identifizierung wurde nicht vorgenommen.

Erst nach 12 Minuten sind weitere Signale nachzuweisen, deren Identifizierung ebenfalls nicht verfolgt wurde.

Die vielen Inhaltstoffe einer unaufbereiteten Urinprobe vergrößern das Untergrundrauschen. Die Standardabweichung beträgt $\sigma = 3.8\%$ bis zur Detektion des ersten Signals bei acht Minuten. Danach nimmt die Standardabweichung durch die Detektion kleiner Signale im Intervall neun bis elf Minuten auf $\sigma = 6.1\%$ zu.

Im unteren Teil der Abbildung 10.1 wird das Anwachsen des Untergrundsignals durch eine zunehmende und spektral ausgedehnte Fluoreszenz im Laufe der Zeit deutlich.

10.2 Urinprobe: Sammelintervall 2-4 Stunden

Die folgenden Abbildungen zeigen je ein Elektropherogramm und die dazugehörige, spektral aufgelöste Folge von Profilen der Kamerabilder einer un-aufbereiteten Urinprobe, die im Intervall 2-4 Stunden gesammelt wurde. Die Anregungswellenlänge der UV-LIF-Detektion in Abbildung 10.2 war 270nm und in Abbildung 10.3 war die Wellenlänge 212nm.

Eine Vergrößerung der Signalskala um den Faktor vier ist für beide Darstellungen in den Abbildungen 10.4 bzw. 10.5 gezeigt.

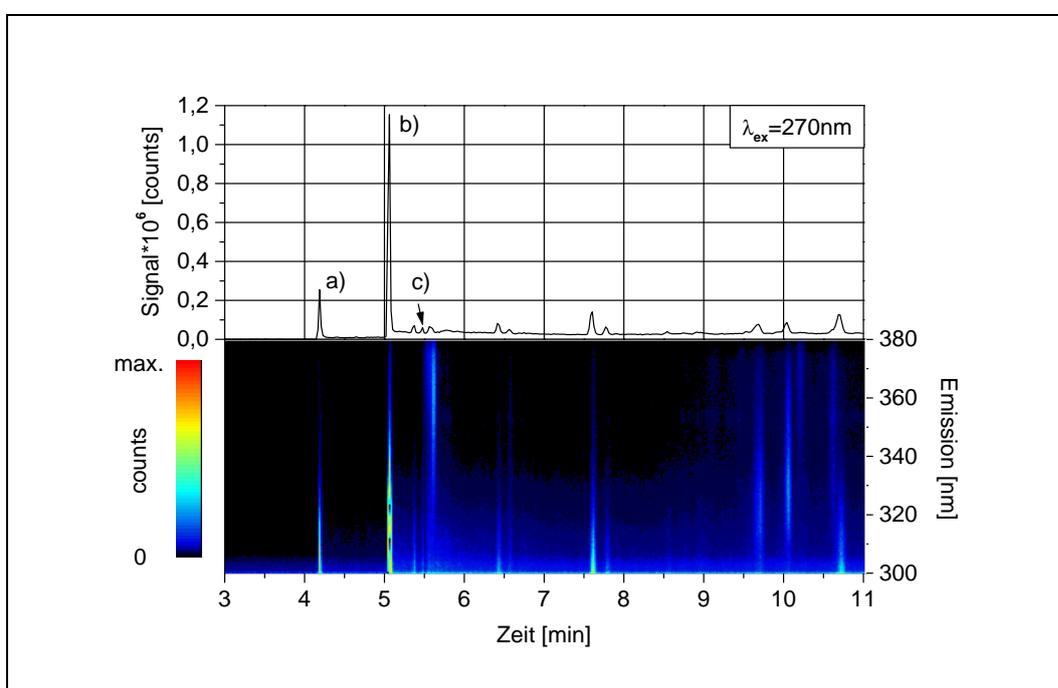


Abbildung 10.2: *Elektropherogramm: Urinprobe Overbeck 1994, 2-4h mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 270nm$. a) N-Desmethyltramadol, b) Tramadol, c) N,O-Didesmethyltramadol.*

Ein erster Vergleich der Elektropherogramme in den Abbildungen 10.2 und 10.3 mit dem der Leerurin-Probe in Abbildung 10.1 läßt vermuten, daß fast alle Signale im Zeitintervall bis 11 Minuten auf den Arzneistoff Tramadol und seine Metaboliten zurückzuführen sind und nicht durch andere Inhaltstoffe der Urinproben verursacht werden. Eine spektrale Analyse weist ebenfalls darauf hin, daß diese Signale auf die Substanzen Tramadol und die Metaboliten zurückzuführen sind.

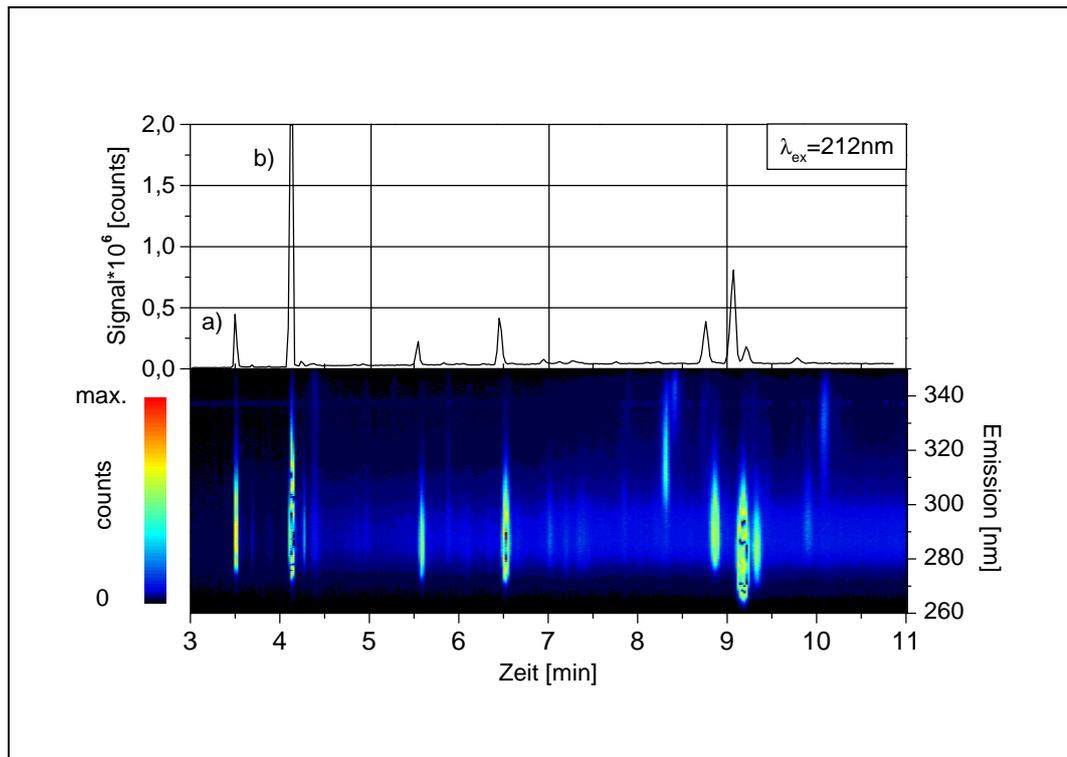


Abbildung 10.3: Elektropherogramm: Urinprobe Overbeck 1994, 2-4h mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$. a) *N*-Desmethyltramadol, b) Tramadol, c) *N,O*-Didesmethyltramadol.

Der Metabolit *N*-Desmethyltramadol (Kennzeichnung a)) kann in dieser Urinprobe nachgewiesen werden und ist bei beiden Anregungswellenlängen mit einer Konzentration von $6.3\mu\text{g}/\text{ml}$ zu detektieren. Der Ausgangsstoff Tramadol-HCl (Kennzeichnung b)) ist ebenfalls bei beiden Anregungswellenlängen zu detektieren und kann aus den Daten in Abbildung 10.2 mit einer Konzentration von mindestens $38\mu\text{g}/\text{ml}$ bestimmt werden. In den Abbildungen 10.3 und 10.2 ist die Konzentration so hoch gewesen, daß der Detektor in Sättigung geriet. Die Signalhöhe in Abbildung 10.3 entspricht somit nicht der tatsächlichen Konzentration.

Zusätzlich kann bei der Anregungswellenlänge 270nm der Metabolit *N,O*-Didesmethyltramadol (Kennzeichnung c)) ansatzweise nachgewiesen werden. Eine vollständige Trennung fand nicht statt. Dem Signal entspricht eine Konzentration von $2.1\mu\text{g}/\text{ml}$. Seine Fluoreszenz nimmt beim Übergang zu der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ ab und kann nicht detektiert werden (vgl. Abbildung 10.3).

Die Metabolite *O*-Desmethyltramadol und *N,N,O*-Tridesmethyltramadol sind in keiner der beiden Messungen nachzuweisen.

Die beiden Elektropherogramme in den Abbildungen 10.2 und 10.3 zeigen eine unterschiedliche Strukturierung nach dem Signal von Tramadol (Kennzeichnung b)), welche ein Hinweis auf die hohe Selektivität der UV-LIF-Detektion durch die Wahl der Anregungswellenlänge ist.

Bei der Anregungswellenlänge 212nm sind um den Zeitpunkt von neun Minuten ausgeprägte Signale detektiert worden, die bei der Anregungswellenlänge 270nm in vergleichbarer Intensität nicht vorhanden sind. Die Fluoreszenzen von N-Desmethyltramadol und Tramadol hingegen ändern ihre spektrale Position nicht und zeigen dieselbe Emissionsstruktur.

Die Anwendung der UV-LIF-Detektion bei den Anregungswellenlängen 270nm und 212nm ermöglicht den Nachweis des Arzneistoffs Tramadol und zwei seiner Metaboliten in einer unaufbereiteten Urinprobe. Die Substanzen können voneinander mit dem Boraxpuffer pH=10.65 aus dem Modellsystem getrennt werden und der Nachweis wird nicht durch interferierende Fluoreszenzen des Signaluntergrundes verhindert, wie sie bei der Aufgabe einer unaufbereiteten Urinprobe mit vielen Inhaltstoffen zu erwarten wären.

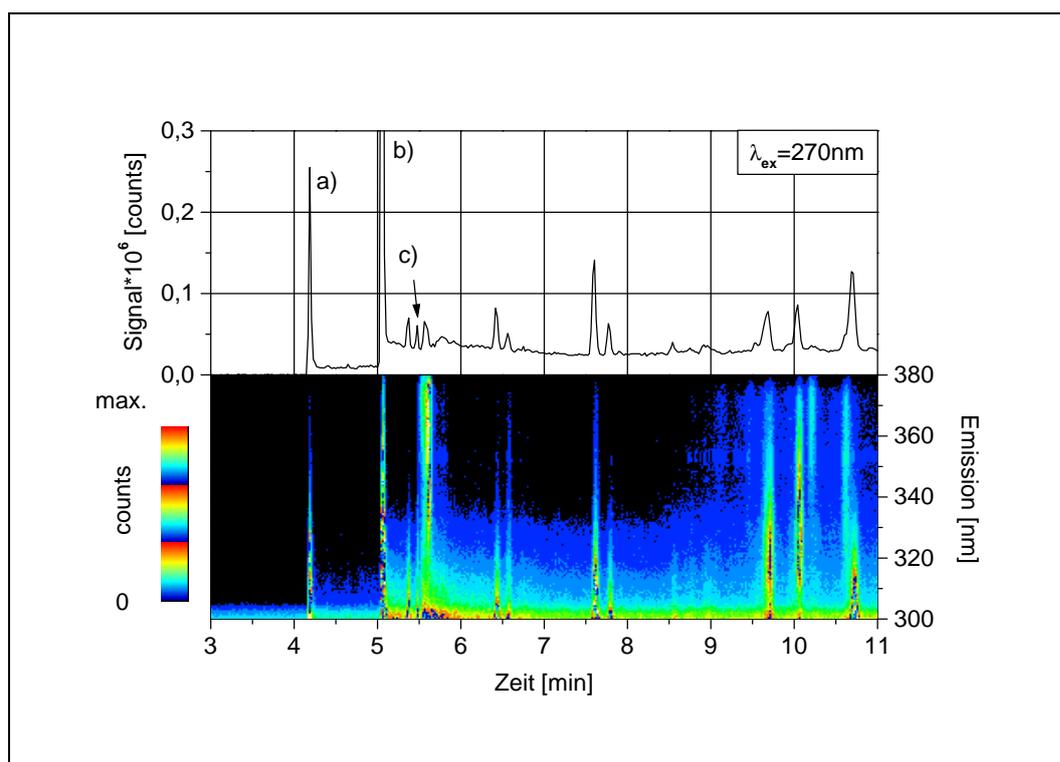


Abbildung 10.4: Elektropherogramm: Urinprobe Overbeck 1994, 2-4h mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$. a) N-Desmethyltramadol, b) Tramadol, c) N,O-Didesmethyltramadol.

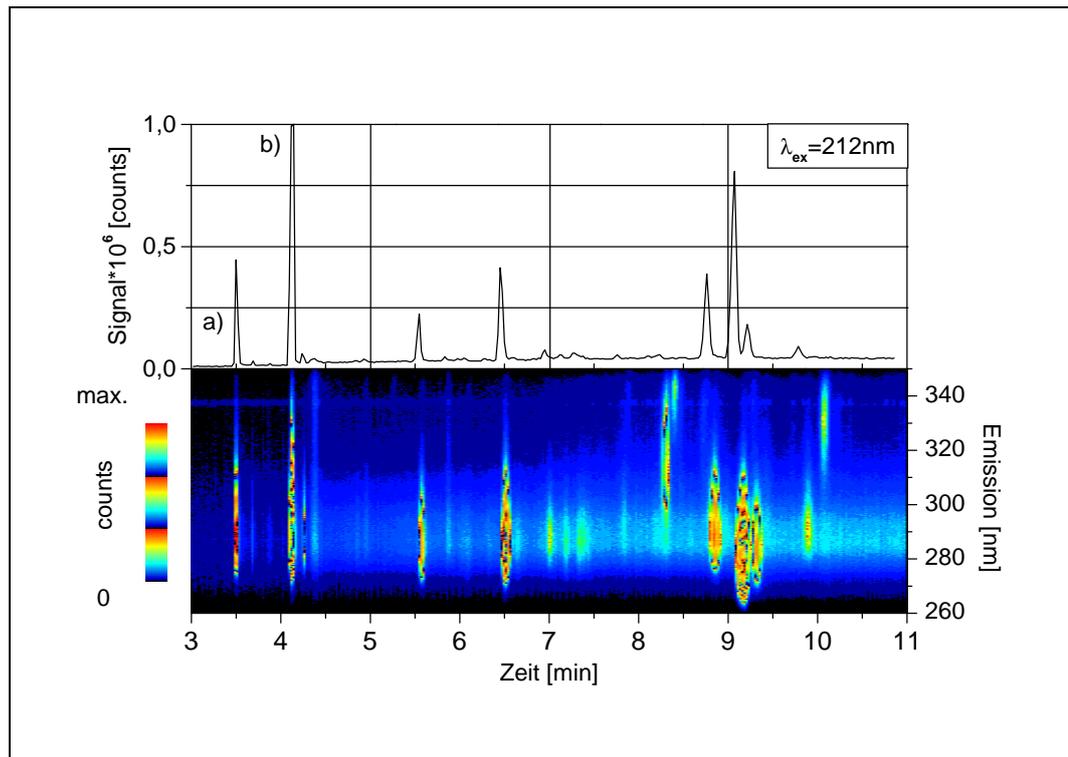


Abbildung 10.5: *Elektropherogramm: Urinprobe Overbeck 1994, 2-4h mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$. a) N-Desmethyltramadol, b) Tramadol, c) N,O-Didesmethyltramadol.*

Die Selektivität der UV-LIF-Detektion wird bei dem Vergleich der Abbildungen 10.4 und 10.5 deutlich. Besonders zu Zeitpunkten nach ca. 7min sind die beiden Elektropherogramme und die Profilfolgen nicht identisch. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Moleküle, die entweder mit zunehmender Masse zu späteren Zeitpunkten detektiert werden, und/oder um Moleküle, die eine dem EOF entgegengesetzte Bewegungsrichtung aufweisen. Sie reagieren im allgemeinen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten und verschiedenen Emissionsspektren auf die Änderung der Anregungswellenlänge.

10.3 Urinprobe: Sammelintervall 6-8 Stunden

Als weiteres Anwendungsbeispiel dient eine Urinprobe, die sich von der in Kapitel 10.2 nur durch das spätere Sammelintervall 6-8 Stunden unterscheidet.

Die Konzentration des Arzneistoffes variiert nach einmaliger Einnahme im Laufe der Zeit und die Metabolite werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Mengen gebildet. Deshalb sollten die Elektropherogramme für beide Sammelintervalle unterschiedlich sein.

Die Abbildungen 10.6 und 10.7 zeigen die Messungen für UV-LIF-Detektion mit der Anregungswellenlänge 270nm bzw. 212nm mit der jeweils entsprechenden Folge von Profilen aus den dazugehörigen Kamerabildern. Eine vergrößerte Darstellung der Signalskala ist in den Abbildungen 10.8 und 10.9 gezeigt.

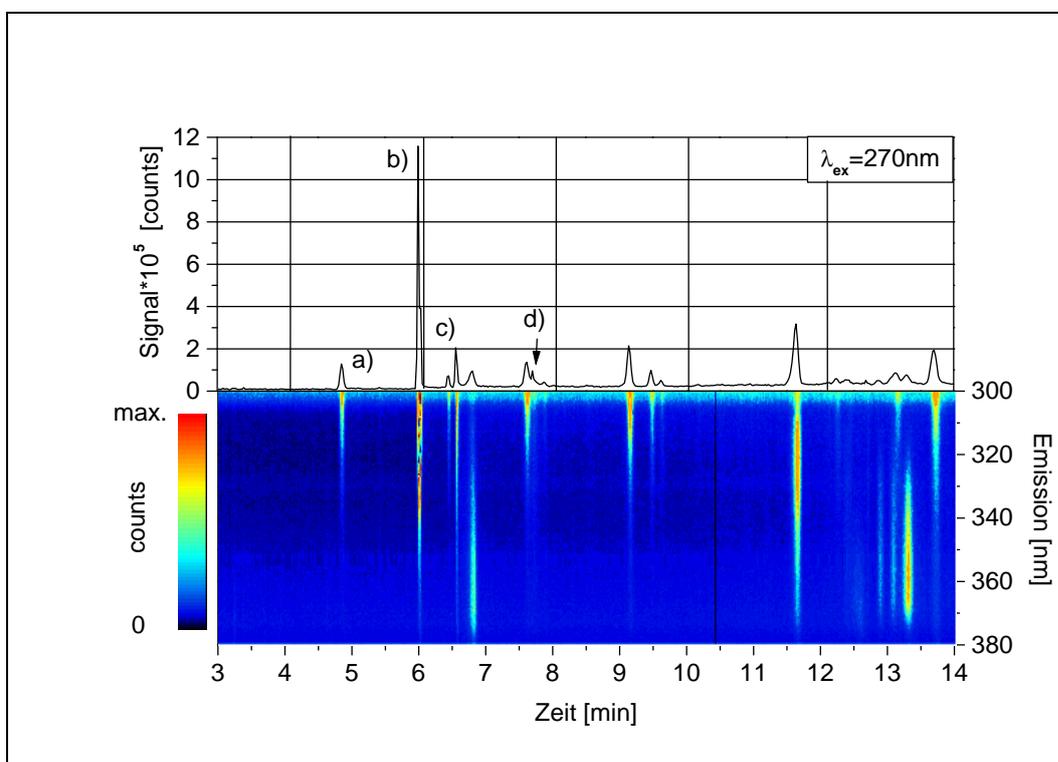


Abbildung 10.6: *Elektropherogramm mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$, Urinprobe Overbeck 1994, 6-8h. a) N-Desmethyltramadol, b) Tramadol, c) N,O-Didesmethyltramadol, d) O-Desmethyltramadol.*

In beiden Elektropherogrammen kann der Ausgangsstoff Tramadol (Kennzeichnung b)) und der Metabolit N-Desmethyltramadol (Kennzeichnung a))

werden. Die Konzentration des Tramadols hat im Vergleich zum Intervall 2-4 Stunden von ca. $38\mu\text{g}/\text{ml}$ auf $24\mu\text{g}/\text{ml}$ abgenommen.

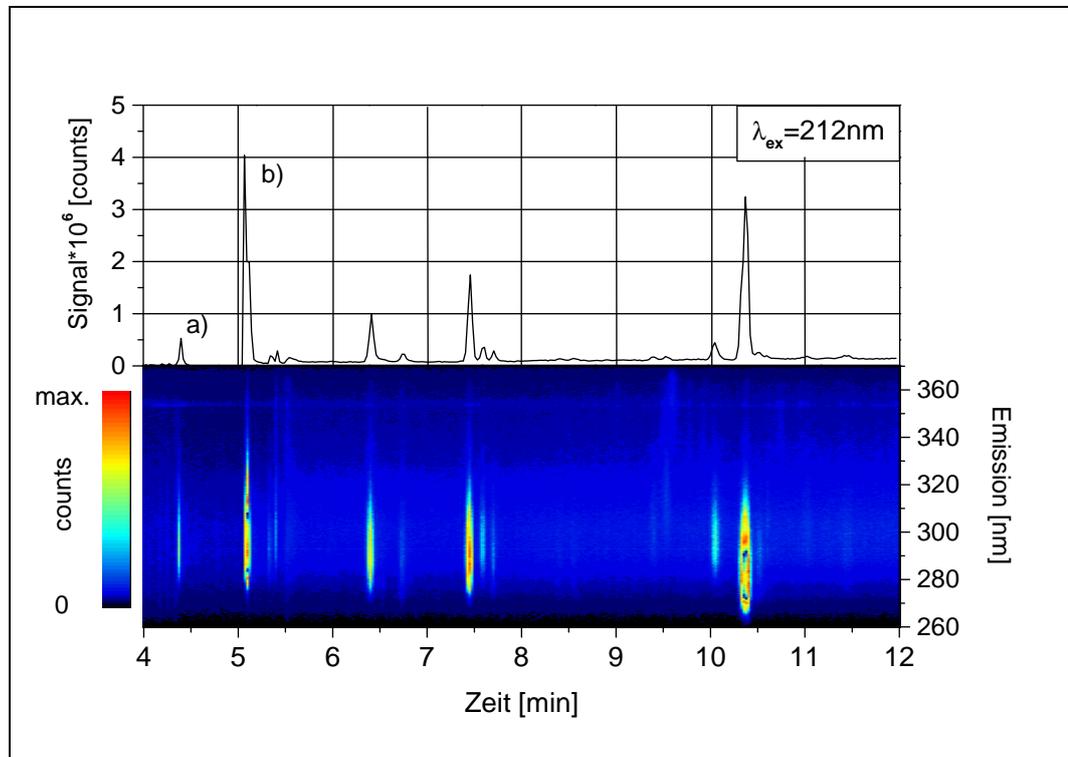


Abbildung 10.7: *Elektropherogramm mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$, Urinprobe Overbeck 1994, 6-8h. a) N-Desmethyltramadol, b) Tramadol.*

Das Signal des Metaboliten N-Desmethyltramadol kann einer Konzentration von $2.3\mu\text{g}/\text{ml}$ zugeordnet werden und hat sich somit im Vergleich zu dem Sammelintervall 2-4 Stunden mit der Konzentration $2.1\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht wesentlich geändert.

Der Metabolit N,O-Didesmethyltramadol (Kennzeichnung c)) ist bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ isoliert und mit einem stärkeren Signal als N-Desmethyltramadol nachzuweisen. Die Konzentration von N,O-Didesmethyltramadol wird mit $12\mu\text{g}/\text{ml}$ bestimmt.

Der Metabolit O-Desmethyltramadol ist in dieser Urinprobe nur als Schulter (Kennzeichnung d)) in einem Signal zu identifizieren. Eine vollständige Isolierung der Substanz findet nicht statt. Aufgrund der Signalminderung beim Übergang zu der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$ (vgl. Abbildungen 9.1 und 9.5) ist dieser Metabolit in Abbildung 10.7 nicht zu detektieren.

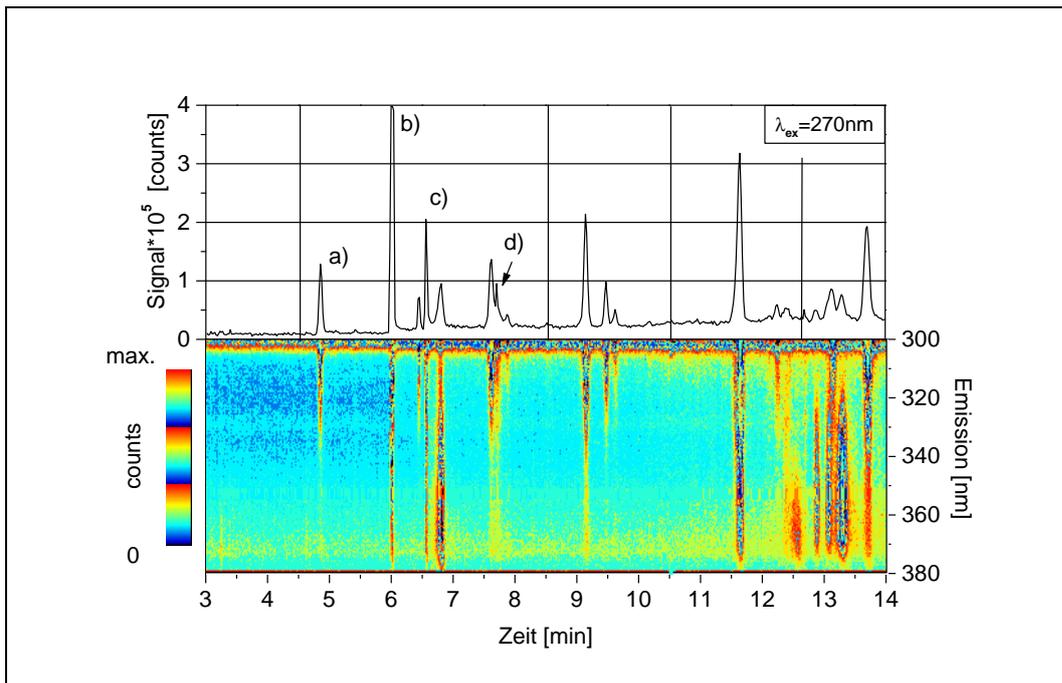


Abbildung 10.8: Elektropherogramm mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$, Urinprobe Overbeck 1994, 6-8h. a) *N*-Desmethyltramadol, b) Tramadol, c) *N,O*-Didesmethyltramadol, d) *O*-Desmethyltramadol.

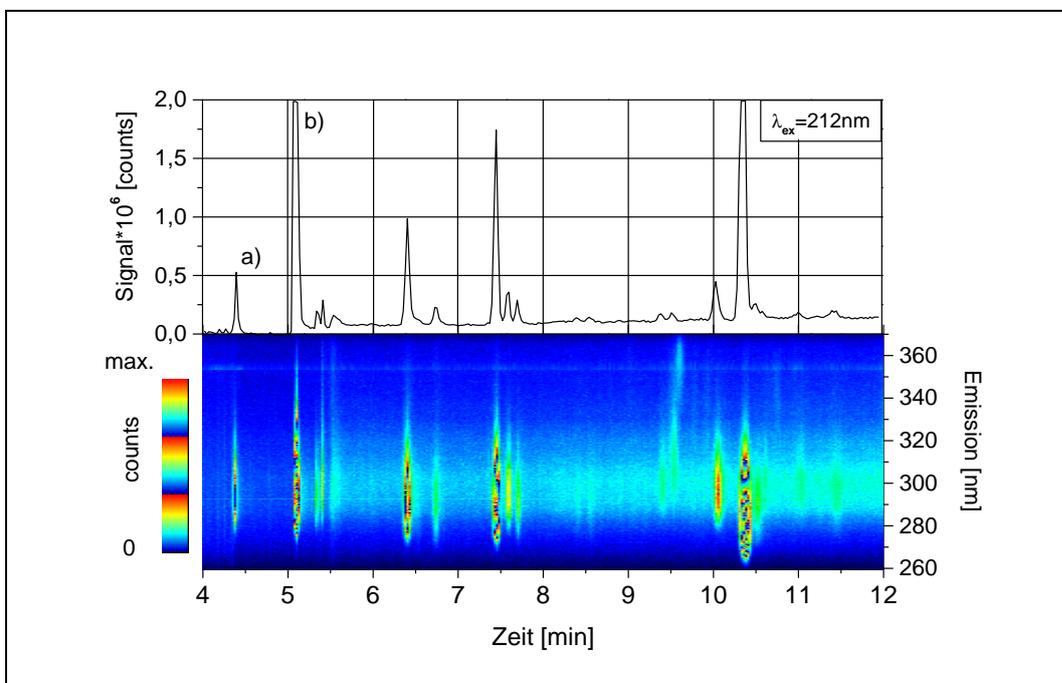


Abbildung 10.9: Elektropherogramm mit UV-LIF-Detektion und $\lambda_{ex} = 212\text{nm}$, Urinprobe Overbeck 1994, 6-8h. a) *N*-Desmethyltramadol, b) Tramadol.

Der Metabolit N,N,O-Tridesmethyltramadol kann in dieser Urinprobe bei keiner der beiden Anregungswellenlängen detektiert werden.

Abschließend ist festzustellen, daß der Arzneistoff Tramadol und der Metabolit N-Desmethyltramadol in beiden Urinproben und bei beiden Anregungswellenlängen nachzuweisen sind.

Die Metaboliten O-Des-, und N,O-Desmethyltramadol sind bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 270\text{nm}$ in der Urinprobe des Intervalls 6-8 Stunden zu identifizieren.

Der Metabolit N,N,O-Tridesmethyltramadol ist in keiner der Messungen nachzuweisen.

Die Ergebnisse zeigen die veränderten Konzentrationen der vermessenen Substanzen und dokumentieren damit bei den verschiedenen Sammelintervallen den dynamischen Prozeß der Arzneimittelaufnahme und deren Verarbeitung im menschlichen Körper. Mit Ausnahme des Ausgangsstoffes Tramadol können die anderen mit der UV-LIF-Detektion nachgewiesenen Metabolite N-Des-, N,O-Dides- und O-Desmethyltramadol mit der UV-Absorption nicht ermittelt werden.

10.4 UV-Absorption

Die Leistungsfähigkeit des UV-LIF-Verfahrens wird im Vergleich mit einer UV-Absorptionsmessung am Beispiel der Urinprobe Overbeck 1994, 6-8 Stunden dargestellt. Die Parameter der Messung sind $U=25\text{kV}$, $L=73\text{cm}$, $l=43\text{cm}$, 50mM Boraxpuffer $\text{pH}=10.65$, Absorptionswellenlänge 214nm , Quarzkapillare mit Innendurchmesser $50\mu\text{m}$, Aufgabe 15s , $20\mu\text{l}$, 0.5psi .

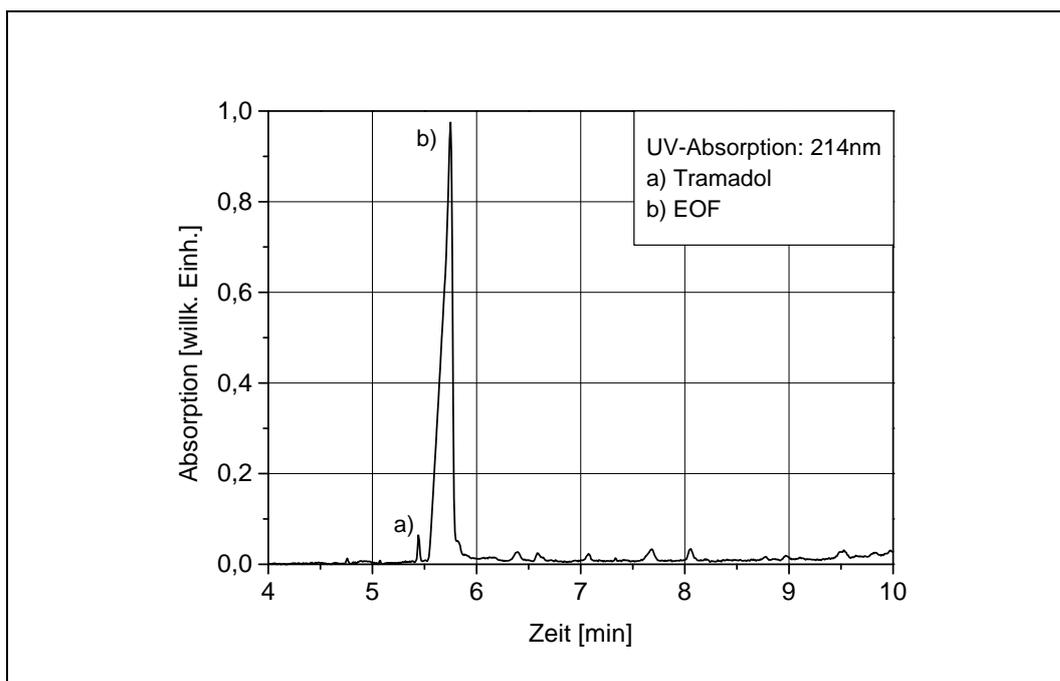


Abbildung 10.10: *Elektropherogramm mit UV-Absorption $\lambda=214\text{nm}$, Urinprobe Overbeck 1994, 6-8h. a) Tramadol, b) EOF.*

Das Elektropherogramm wird dominiert von dem Signal des EOF (Kennzeichnung b), mit dem alle elektrisch neutralen Teilchen transportiert werden.

Dieses Signal ist durch die Selektivität der UV-LIF-Detektion deutlich vermindert, so daß nicht der EOF, sondern die Substanz Tramadol für das stärkste Signal in den Elektropherogrammen der Abbildungen 10.2, 10.3, 10.6 und 10.7 verantwortlich ist (eine Identifizierung des EOF-Signals bei der UV-LIF-Detektion wurde nicht verfolgt).

Die Elektropherogramme der UV-LIF-Detektion sind struktureicher und zeigen differenziertere Signale als die UV-Absorption, bei der nur das Signal von Tramadol (Kennzeichnung a)) nachgewiesen werden konnte (siehe auch die Nachweisgrenzen der UV-Absorption für diese Substanzen in Tabelle 9.2 und die mit der UV-LIF-Detektion ermittelten Konzentrationen in den Urinproben).

Kapitel 11

Zusammenfassung und Ausblick

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand darin, eine LIF-CE-Kopplung mit dem Ziel aufzubauen, Wellenlängen im tiefen UV-Bereich verwenden zu können und die bestehenden Nachweisgrenzen einer mit UV-Absorption arbeitenden CE bei ausgewählten Arzneistoffen zu senken. Dabei sollte die Möglichkeit einer spektralen Identifizierung der Proben gegeben sein.

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt die spektroskopische Untersuchung der Arzneistoffe, die sich in zwei Teile gliederte: die Erstellung von Absorptionsspektren und die Aufnahme von Anregungs-/Emissionsspektren.

Die Ergebnisse der Absorptionmessungen zeigen, daß bei kleinen Aromaten mit ein bis zwei Benzolringen eine energetische Anregung nur mit Wellenlängen kleiner 300nm möglich ist. Dabei stimmen die Spektren aller Substanzen insofern überein, daß sie bei Wellenlängen um 210nm ihr absolutes Absorptionsmaximum aufweisen. Bei großen Aromaten mit vier kondensierten Benzolringen dehnt sich das Absorptionsspektrum bis in den sichtbaren Spektralbereich aus, wobei das Absorptionsmaximum bei 230nm liegt.

Aus diesen Spektren bestimmt sich der Wellenlängenbereich, der für die anschließenden A/E-Spektren genutzt werden kann.

Im Gegensatz zu den Absorptionmessungen zeigen sich die Emissions-Spektren von Tramadol und den Metaboliten im Bereich von 240nm-270nm wenig strukturiert, und sie unterscheiden sich bis um einen Faktor 10 in der Fluoreszenzstärke. Weiterhin ergibt sich, daß mit einer Anregungswellenlänge, die der Wellenlänge des Absorptionsmaximums entspricht, nicht in jedem Fall die maximale Fluoreszenzausbeute erzielt wird. Verantwortlich dafür sind Relaxationsprozesse, die mit der Fluoreszenz konkurrieren und in Kapitel 2.2 dargestellt sind.

Die Fluoreszenzspektren der anderen Arzneistoffe sind ebenfalls wenig strukturiert. Viele dieser Substanzen weisen eine maximale Fluoreszenz auf, wenn die Anregungswellenlänge 270nm aus dem Bereich 240nm-270nm gewählt wird. Insgesamt ergibt sich die Aussage, daß die Fluoreszenzen vieler Arzneistoff-

fe sehr ähnlich und anhand ihrer Emissionen nicht immer eindeutig zu bestimmen sind. Mit Ausnahme von Propranolol beginnen die Emissionen unabhängig von der Anregungswellenlänge oberhalb bei 270nm und weisen wenig Struktur bezüglich Fluoreszenzmaxima und -minima auf. Bei hinreichenden Unterschieden, wie z. B. bei Propranolol und Salbutamol ist eine entsprechende Identifizierung möglich.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurden die Anregungswellenlängen für eine maximale Fluoreszenz bei Tramadol und den Metaboliten für die CZE-Messungen auf 270nm und 212nm festgelegt.

Bei dem Aufbau des CE-Systems wurde eine on-column-Detektion realisiert. Damit verbunden sind Maßnahmen gegen das Streulicht von der Kapillaroberfläche, das bei gepulsten Lasersystemen niedriger Frequenz (10Hz) besonders groß ist.

Die Verwendung von Kantenfiltern und dielektrischen Spiegeln konnte in Verbindung mit der hohen räumlichen Auflösung des abbildenden Hohlspiegels und einem Spektrometer das Streulicht hinreichend gut unterdrücken.

Bei der Anregungswellenlänge 212nm kann sogar auf optische Filter gegen das Streulicht verzichtet werden, wenn die Temperaturverhältnisse konstant bleiben und damit keine Verschiebung der optischen Wege erfolgt.

Neben dem Einsatz von optischen Filtern konnte das polarisierte Rayleighlicht durch die Wahl der Polarisationssebene des anregenden Farbstofflasers zusätzlich um den Faktor acht gesenkt werden.

Das Ergebnis dieser Maßnahmen ist ein Signaluntergrund, der von der Intensität der Laserstrahlung und der Wellenlänge abhängt. Eine weitere Reduktion kann nur durch die Verwendung kontinuierlicher Laserstrahlung erreicht werden, die dann in Verbindung mit einem streulichtarmen Abbildungsverfahren, wie z. B. einer sheath-flow-Küvette betrieben werden sollte.

Somit ist eine UV-LIF-Detektion bei den Wellenlängen 212nm und 270nm realisiert worden, deren Signaluntergrund durch den Puffer in der Kapillare und die Verunreinigungen in dem Quarz der Kapillare bestimmt ist.

Ausgehend von den Polarisationsmessungen für die Reduktion des Rayleighlichtes wurden entsprechende Messungen für die Arzneistoffe durchgeführt und keine Polarisation bei Tramadol und den Metaboliten in wässriger Lösung festgestellt.

Hingegen zeigt sich ein Einfluß des pH-Wertes der Lösungsmittel für die phenolischen Metabolite. Es bestätigt sich die Fluoreszenzminderung bei steigendem pH-Wert, so daß ein niedriger pH-Wert sinnvoll erscheint.

Dieses Ergebnis sollte jedoch nicht isoliert betrachtet werden und steht im Gegensatz zu den Bedingungen für eine erfolgreiche Trennung von Tramadol und den Metaboliten in der CZE. Messungen mit dem pH-Wert 4.6 zeigen kei-

ne vollständige Trennung eines entsprechenden Substanzgemisches. Erst der Übergang zu dem Wert $\text{pH}=10.4$ führt zu einer Aufspaltung des Elektropherogramms in die notwendigen fünf Signale der aufgegebenen Probe. Damit ist in Zusammenarbeit mit der Universität Münster¹ ein Trennsystem für Tramadol und die Metabolite in Form eines 50mM Boraxpuffers $\text{pH}=10.6$ entwickelt worden, das für CZE-Messungen bisher nicht existierte. Die anderen Arzneistoffe konnten ebenfalls zum ersten Mal in CZE-Messungen mit einer UV-LIF-Detektion nachgewiesen werden.

Das detektierte Fluoreszenzsignal konnte in der CZE am Beispiel von Daunorubicin zweidimensional räumlich aufgelöst werden, so daß der Innenbereich mit einem Innendurchmesser von $50\mu\text{m}$ und der Außenbereich der Kapillare zu erkennen sind. In Kombination mit einem Spektrometer ist die Migration einer Substanz durch das Detektionsfenster (3mm) am Beispiel von Tramadol mit eindimensionaler räumlicher und spektraler Auslösung demonstriert worden. Damit war es möglich, im Gegensatz zu dem oftmals nur $100\mu\text{m}$ breiten Detektionsvolumen bei kommerziell erhältlichen Geräten, das Fluoreszenzsignal der gesamten Probe für die Detektion zu nutzen.

Einen großen Einfluß auf die Stärke des Fluoreszenzsignals übt die Laserleistung aus. Die Bestrahlung mit UV-Licht führt zu einem Ausbleichen der Proben, deren Fluoreszenz nach drei Laserpulsen auf bis zu 60% absinken kann. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Laserleistung und der Stärke des Fluoreszenzsignals ist nur bei einer Substanz zu beobachten. Den Aussagen dieser Messungen folgend wurde die maximale Laserleistung auf 0.2mJ/Puls begrenzt.

Damit ist die Nutzungszeit der Kapillare verbunden, die bei höheren Leistungen durch Inhomogenitäten des Laserstrahlprofils auf der Oberfläche zerstört wird. Der dadurch verursachte Anstieg des Streulichtsignals verhindert eine Fluoreszenzdetektion.

Nach diesen vorbereitenden Messungen konnten die Nachweisgrenzen der hier verwendeten Arzneistoffe bei den Wellenlängen 212nm und 270nm bestimmt werden.

Diese konnten für viele Substanzen um mehr als zwei Größenordnungen gegenüber den Werten einer CE mit UV-Absorption gesenkt werden. Für viele der anderen Substanzen ist eine Senkung um mindestens eine Größenordnung erreicht worden.

Einige Stoffe zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Fluoreszenzstärke von der Anregungswellenlänge, bei anderen sind kaum Unterschiede zu beobachten. Die Senkung der Nachweisgrenzen ist mit Hilfe der abstimmbaren Strahlung eines Farbstofflasers erzielt worden, mit der eine flexible Wahl der Anregungs-

¹Institut für Pharmazeutische Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Herr Apotheker B. Kurth

wellenlänge gegeben war. Für die anderen Arzneistoffe könnte die Fluoreszenzstärke gesteigert werden, wenn die Anregungswellenlänge für das absolute Emissionsmaximum außerhalb des hier zugänglichen Bereichs (240nm-270nm) der A/E-Spektren liegt.

Nicht variable Anregungswellenlängen anderer Lasersysteme sind nur in Ausnahmefällen dafür geeignet.

Die Senkung der Nachweisgrenzen ermöglicht den Nachweis und die Identifikation von Tramadol und einigen Metaboliten in einer unaufbereiteten Urinprobe, die einem Nachweis durch die UV-Absorption nicht zugänglich sind. Dabei ist hervorzuheben, daß die Detektion der Substanzen aus solch einer unaufbereiteten Urinprobe bei den Wellenlängen des tiefen UV-Bereiches (212nm und 270nm) möglich ist und nicht durch die Vielzahl anderer darin enthaltenen Substanzen verhindert wird. Eine eindeutige Identifizierung einzelner Substanzen ist dabei aufgrund der ähnlichen Emissionsspektren nicht immer möglich. Stoffgruppen mit gleichen Emissionsstrukturen können jedoch, wie im Fall von Tramadol und den Metaboliten, von anderen Inhaltsstoffen abgegrenzt werden.

Als Anwendungsbeispiel wurden zwei Urinproben mit unterschiedlichen Sammelintervallen verwendet.

Innerhalb dieser Proben konnten unterschiedliche Konzentrationen und Metabolite nachgewiesen werden, die Ausdruck des dynamischen Prozesses der Verarbeitung von Medikamenten im menschlichen Körper sind. Eine Auswertung dieser Werte kann zu pharmakokinetischen Erkenntnissen beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen das große Potential der UV-LIF-Detektion gegenüber der UV-Absorption in der CE. Im Vergleich zu langwelligeren Fluoreszenzanregungen wird mit diesen Wellenlängen die Zahl der nachweisbaren Substanzen vergrößert, und die Nachweisgrenzen können um bis zu zwei Größenordnungen gesenkt werden. Begrenzend wirkt sich dabei der durch die hohen Intensitäten der gepulsten Laserstrahlung unvermeidbare Signaluntergrund aus. Dieser kann durch die Verwendung kontinuierlicher Laserstrahlung gesenkt werden. Der Einfluß einer manuellen Probenaufgabe auf die Nachweisgrenze wird durch den Einsatz einer automatischen Probeninjektion verringert.

Zusätzlich kann die Fluoreszenzausbeute gesteigert werden, wenn Lasersysteme mit höherer Pulsfrequenz oder Dauerstrichlaser verwendet werden.

Durch die Umsetzung dieser Maßnahmen ist die Senkung aller Nachweisgrenzen um ein bis zwei Größenordnungen zu erwarten.

Anhang A

Molekülstrukturen

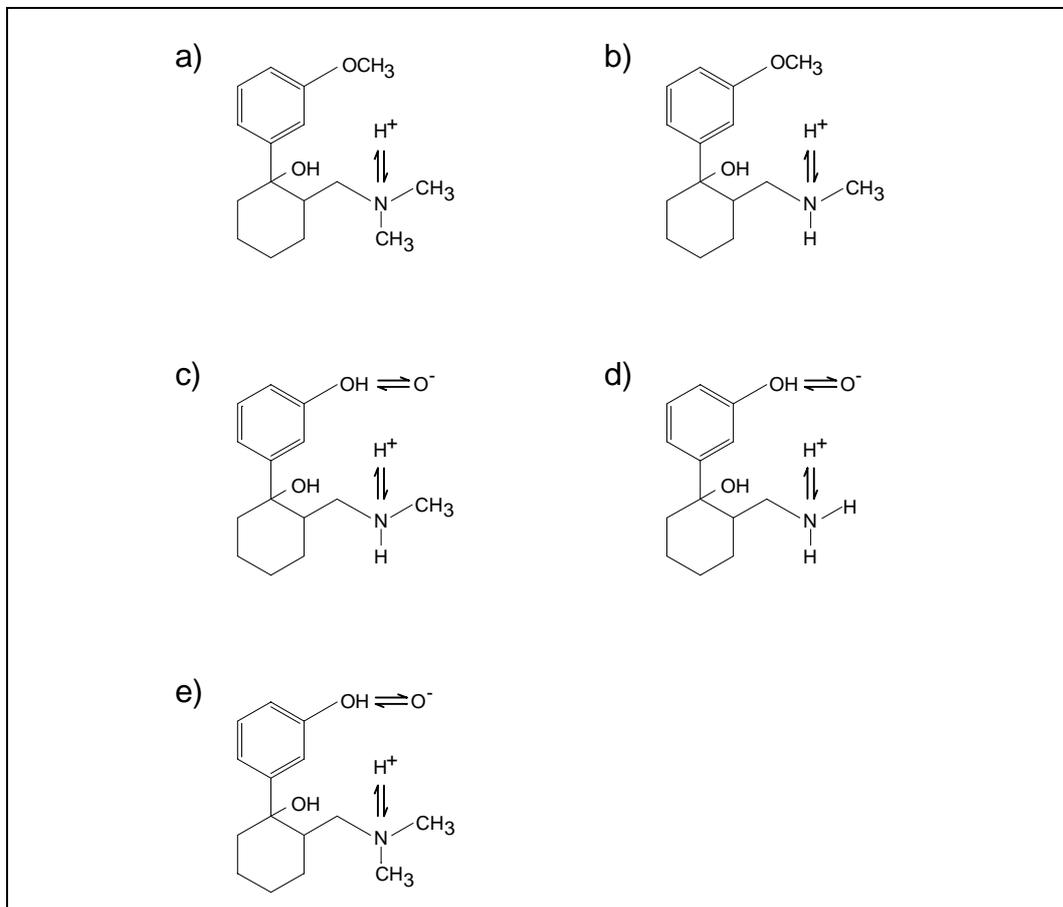


Abbildung A.1: Molekülstrukturen: a) Tramadol b) *N*-Des- c) *N,O*-Dides- d) *N,N,O*-Trides- e) *O*-Desmethyltramadol, Doppelpfeile weisen auf Austauschreaktionen hin, vgl. Text.

Die Doppelpfeile in Abbildung A.1 weisen auf Austauschbeziehungen hin: Bei allen pH-Werten kann das Stickstoffatom protoniert werden [137]. Somit sind a) Tramadol und b) N-Desmethyltramadol vorzugsweise positiv geladen und migrieren in der CZE zur Kathode.

Im alkalischen Bereich ($pH > 7$) spaltet die OH-Gruppe am Benzolring ein Proton ab und es bildet sich O^- . Der Anteil an O^- -Atomen überwiegt den Anteil der H^+ Atome, und die Substanz ist negativ geladen. Auf der Grundlage des pK_S -Wertes für Phenol $pK_S = 10$ sind im Mittel die Anteile der Moleküle mit OH und O^- gleich verteilt. Eine Steigerung des pH -Wertes über $pH = 10$ führt zu einem Übergewicht des O^- -Anteils, und die Substanzen c) N,O-Dides, d) N,N,O-Trides- und e) O-Desmethyltramadol sind im Mittel negativ geladen und migrieren in der CZE zur Anode.

A.1 Ausgewählte Arzneistoffe

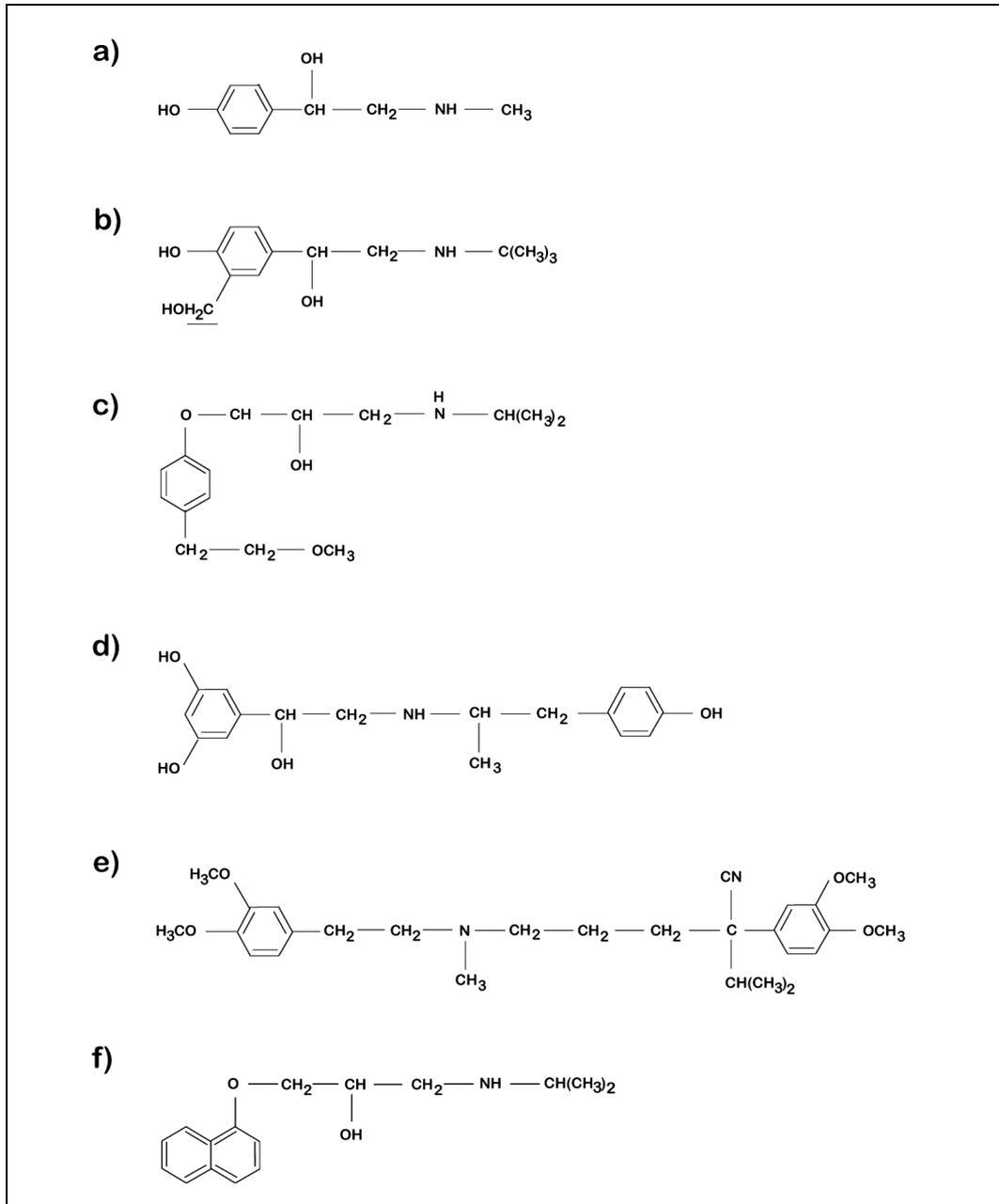


Abbildung A.2: Molekülstrukturen: a) Synephrin (Oxedrin) b) Salbutamol c) Metoprolol d) Fenoterol e) Verapamil f) Propranolol.

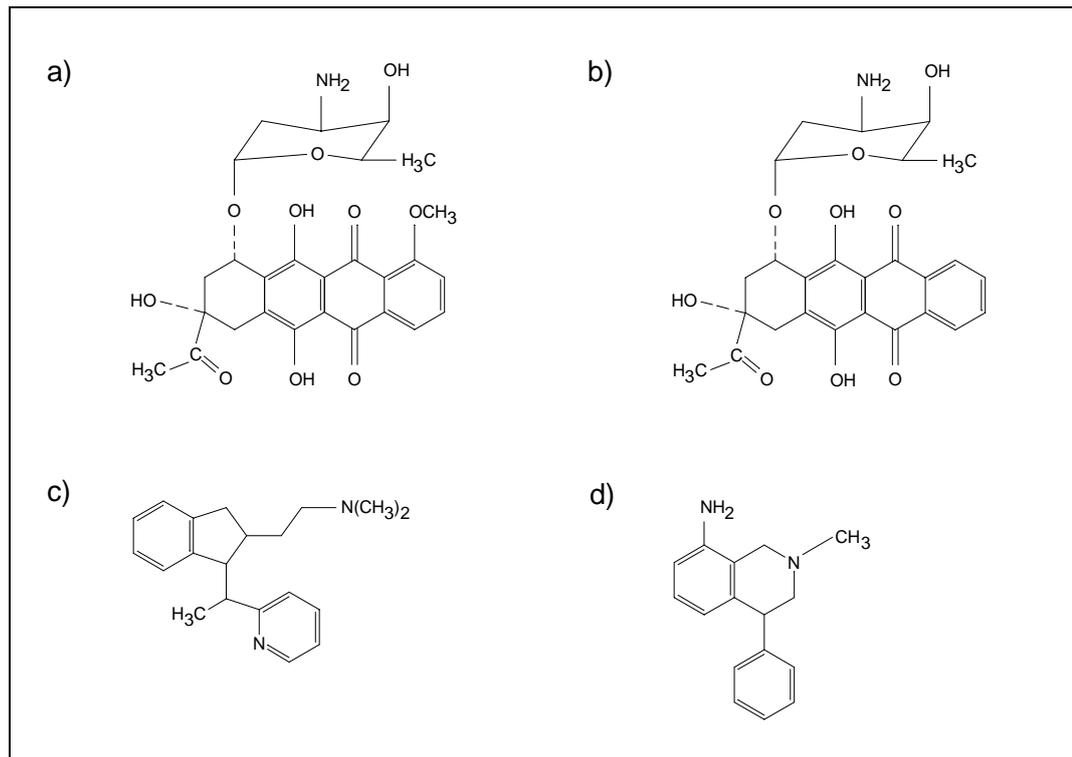


Abbildung A.3: Molekülstrukturen: a) Daunorubicin, b) Idarubicin c) Dimetinden, d) Nomefensin.

Bei den Substanzen a) Daunorubicin und b) Idarubicin wird im sauren pH-Bereich ($pH < 7$) die Aminogruppe am Zuckerrest protoniert, und die positiv geladenen Substanzen migrieren zur Kathode.

Bei c) Dimetinden wird im sauren pH-Bereich das Stickstoffatom mit den beiden Methylgruppen protoniert, und die Substanz migriert zur Kathode.

Anhang B

Molgewichte

Substanz	Molgewicht [g/mol]
Tramadol-HCl	299.85
O-Desmethyltramadol-HCl	285.81
N-Desmethyltramadol-HCl	285.81
N,O-Didesmethyltramadol-HCl	271.79
N,N,O-Tridesmethyltramadol-HCl	257.79
Astemizol-Base	458.59
Fenoterol-HBr	384.28
Propranolol-HCl	295.81
Metoprolol-Tartrat	684.82
Salbutamol-Sulfat	288.4
Synephrin-HCl	203.67
Verapamil-HCl	491.07
Dimetinden-Maleat	408.5

Anhang C

Techniken und Abkürzungen in der CE

HPE	high performance electrophoresis
HPZE	high performance zone electrophoresis
HPCE	high performance capillary electrophoresis
CE	capillary electrophoresis
CAE	capillary affinity electrophoresis
CES	capillary electrochromatography
CGE	capillary gel electrophoresis
CZE	capillary zone electrophoresis
CMEC	capillary micellar electrokinetic chromatography
EC	electrochromatography
EKC	electrokinetic chromatography
FSCE	free solution capillary electrophoresis
FZE	free zone electrophoresis
MEC	micellar electrokinetic chromatography
MECC	micellar electrokinetic capillary chromatography
MEKC	micellar electrokinetic chromatography

Dabei wird deutlich, daß einige Abkürzungen denselben Sachverhalt benennen, wie zum Beispiel CE, HPE und HPCE oder MEC, MECC und MEKC.

Anhang D

Zeta-Potential

Das Zeta-Potential tritt an der Grenzschicht zwischen der negativ geladenen Kapillarwand und der Pufferlösung auf. Es ist Teil des Potentials ψ , welches mit zunehmender Entfernung zur Kapillarwand abnimmt. Dabei können drei Bereiche unterschieden werden [138, 139], die in Abbildung D.1 dargestellt sind:

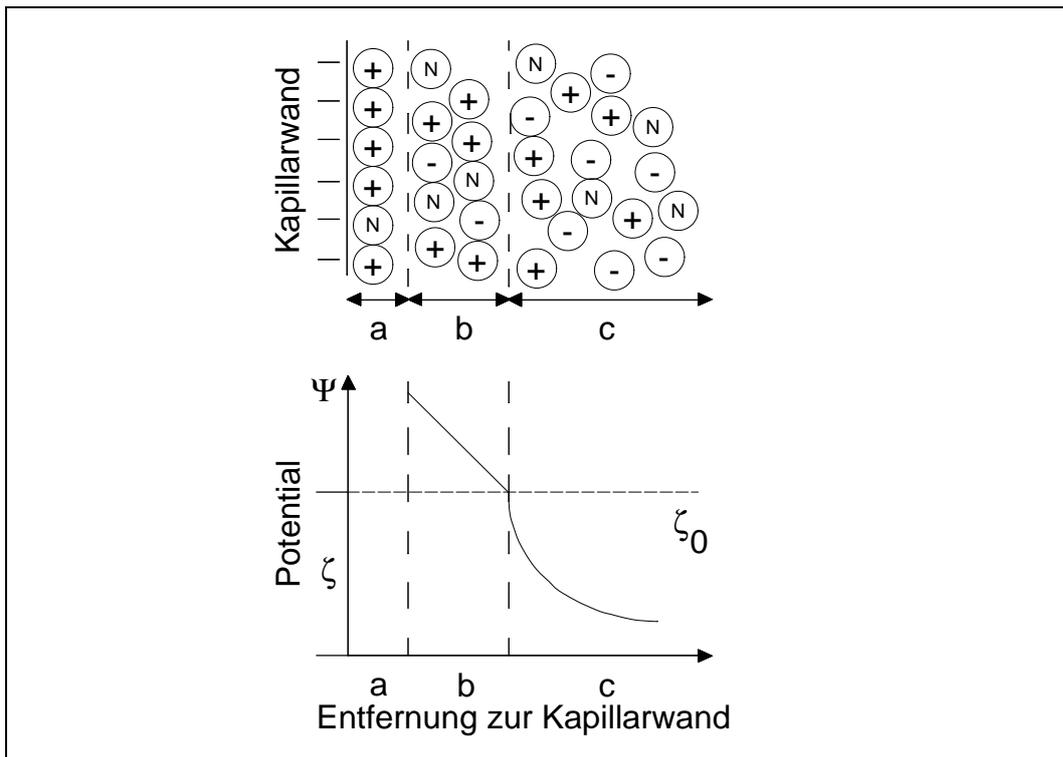


Abbildung D.1: Schematische Darstellung des Potentials in einer Quarzkapillare. oben) Teilchenverteilung, unten) Potentialverlauf.

- Bereich a)
Diese Schicht besteht fast ausschließlich aus positiv geladenen Ionen, die sich an die negativ geladenen OH^- -Gruppen des Siliciummaterials anlagern. Es entsteht eine unbewegliche Schicht mit einer Ausdehnung, die einer adsorbierten Monolage entspricht ($< 10\text{\AA}$). In diesem Bereich wird ein konstantes Potential ψ angesetzt, und die negativen Ladungen der Oberfläche werden fast vollständig abgeschirmt.
- Bereich b)
Mit zunehmender Entfernung von der Kapillarwand nimmt das Potential ψ ab und kann durch einen linearen Verlauf beschrieben werden. In diesem Bereich herrschen noch positiv geladenen Ionen vor, auch wenn negativ geladene Ionen und neutrale Teilchen dort vertreten sind.
- Bereich c)
In diesem Bereich ist der Verlauf des ψ -Potentials durch einen exponentiell abnehmenden Verlauf gekennzeichnet, und es wird als ζ -Potential bezeichnet. Es sind Anionen, Kationen und elektrisch neutrale Teilchen vertreten. Der Wert des ζ -Potentials nimmt mit wachsender Entfernung zur Kapillarwand ab und wird in großer Entfernung durch den pH-Wert und die Ionenstärke des Puffers bestimmt.
Die Breite dieser diffusen Schicht, als Entfernung, in der das Potential ζ den Wert $\zeta_0 * 1/e$ angenommen hat, wird durch den Ausdruck

$$\beta = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k T}{2 N_A e^2 I}} [m]$$

wiedergegeben, worin ϵ_r die relative dielektrische Konstante des Puffers, ϵ_0 die Dielektrische Konstante im Vakuum ($\epsilon_0 = 8,854 * 10^{-12} Fm^{-1}$), k die Boltzmannkonstante ($k = 1.38 * 10^{-23} JK^{-1}$), $T[K]$ die Temperatur, N_A die Avogadrokonstante ($N_A = 6.022 * 10^{23} mol^{-1}$) und I die Ionenstärke bezeichnen.

Mit typischen Werten $T = 298K$ und $\epsilon_r = 78.3$ berechnet sich die Breite für eine 0.1M Lösung zu $\beta = 5 - 10\text{\AA}$ und für eine 1mM Lösung zu $\beta = 50 - 100nm$ (vgl. [139]).

Unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes \vec{E} , das parallel zur Kapillare und somit senkrecht auf der in Abbildung D.1 verwendeten Zeichenebene steht, beginnen die Ionen im Bereich c) während der CZE zu wandern [87]. Durch van-der-Waals-, und Reibungskräfte entsteht eine Kopplung ihrer Bewegung zu anderen Teilchen, die in einer Bewegung der gesamten Flüssigkeitssäule in der Kapillare resultiert. Charakteristisch für diesen Transport ist das Strömungsprofil, welches im Gegensatz zu einer hydrodynamischen Strömung Geschwindigkeiten gleichen Betrages über den gesamten Querschnitt aufweist.

Anhang E

Filtervergleich bei Daunorubicin

In Verbindung mit kommerziell erhältlichen CE-Geräten werden für die LIF-Detektion häufig Interferenzfilter verwendet, die nur in geringem Maß an die zu detektierende Fluoreszenz angepaßt sind. Diese Art optischer Filter, die einen spektralen Bereich von ca. 10nm-20nm transmittieren, sollen für den Nachweis von Fluoreszenzen eingesetzt werden, die zeitgleich und spektral gegeneinander verschoben emittiert werden. Bei geringer spektraler Überlappung dieser Fluoreszenzen wird der Nachweis von einer dieser Fluoreszenzen durch die geeignete Wahl des Interferenzfilters ermöglicht. Ist jedoch solch eine Trennung der Fluoreszenzen nicht notwendig, bleibt damit bei denen, die sich über einen großen Wellenlängen erstrecken, ein (möglicherweise nicht unerheblicher) Teil der Fluoreszenz für die Detektion ungenutzt.

Im folgenden werden Ergebnisse einer LIF-Detektion am Beispiel von Daunorubicin unter der Verwendung eines Interferenz- und eines Kantenfilters vorgestellt, die von Herrn Dr. Hempel [140] durchgeführt worden sind.

Bei der Verwendung von optischen Filtern für die Fluoreszenzdetektion müssen folgende Anforderungen überprüft werden:

- die Anregungswellenlänge wird hinreichend gut diskriminiert
- die Fluoreszenz wird maximal transmittiert.

Nach der Wahl eines geeigneten Filters ist der Signaluntergrund bei der Anregungswellenlänge frei von Rayleigh-, Mie- und Oberflächenstreuung. Das Untergrundrauschen kann dann, besonders bei der Fluoreszenzanregung im sichtbaren Spektralbereich, durch ein Raman-Signal des Puffers bestimmt sein. Eine Reduzierung dieses Rauschens kann durch den Einsatz eines Interferenzfilters erreicht werden, der einen freien Spektralbereich von wenigen 10nm aufweist. Solche Interferenzfilter bilden die Standardausrüstung von kommerziellen CE-Geräten und können nicht optimal auf die Fluoreszenz der nachzuweisenden Proben abgestimmt werden. Eine Anpassung besteht in der Auswahl eines Filters, der das Maximum der Fluoreszenz transmittiert, wie das Beispiel von Daunorubicin zeigt.

Die Abbildung E.1 gibt das spektral aufgelöste Fluoreszenzsignal von Daunorubicin wieder (der durch den Standardinterferenzfilter für 520nm erfaßte Wellenlängenbereich ist grau hinterlegt). Von der Fluoreszenz wird weniger als ca. 1/10 für die Detektion genutzt. Die Verwendung eines Kantenfilters OG530 ermöglicht neben einer Diskriminierung der Anregungswellenlänge 488nm, wie sie in einem üblichen CE-Gerät mit einem Argon-Ionen-Laser bereitgestellt wird, zusätzlich die Detektion jeglicher langwelligerer Fluoreszenz. Das Wasser-Raman-Signal im Bereich zwischen 580nm und 595nm wird damit als Untergrundsignal erfaßt.

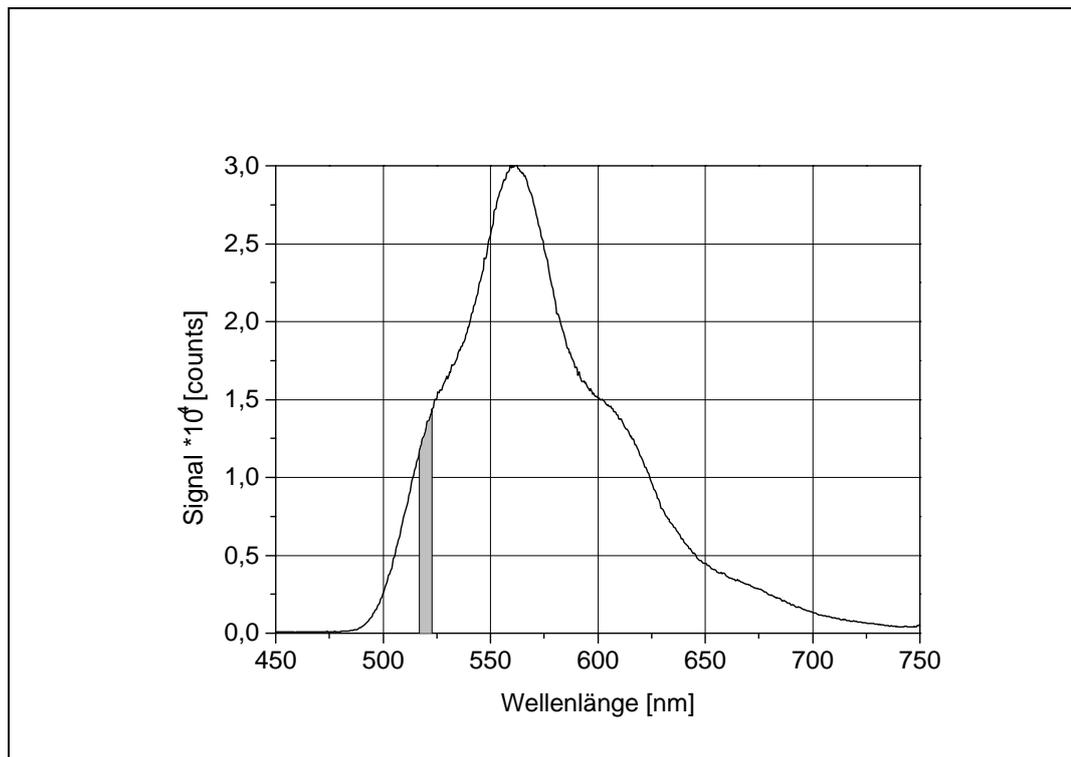


Abbildung E.1: Spektraler Bereich des vom Interferenzfilter erfaßten Fluoreszenzsignals (grau hinterlegt) bei Daunorubicin, Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 488nm$.

Die Abbildung E.2 zeigt den Signalvergleich in einem Elektropherogramm bei der Trennung von Idarubicinol, Daunorubicin (Kennzeichnung D) und Idarubicin (ca. $10\mu g/ml$) mit a) einem Interferenzfilter 520nm und b) dem Kantenfilter OG530 mit einheitlichen Skalen, so daß ein Vergleich der Signalstärken möglich ist [140]. Die Anregungswellenlänge war $\lambda_{ex} = 488nm$.

Das Untergrundrauschen steigt erwartungsgemäß durch das Wasser-Raman-Signal an und vergrößert sich um den Faktor 1,4. Gleichzeitig wird jedoch

das Fluoreszenzsignal von Daunorubicin um den Faktor 15 verbessert, so daß insgesamt die Nachweisgrenze um eine Größenordnung gesenkt wird.

Bei einem Kantenfilter ist der Übergang zwischen einer Transmission $T > 98\%$ und $T < 10^{-5}$ auf den Bereich von typischerweise 100nm ausgedehnt. Im Gegensatz dazu bieten dielektrische Filter einen auf ca. 10nm-20nm beschränkten Bereich für diesen Übergang, der aber eine geringere Diskriminierung im Minimum der Transmission aufweist ($T > 10^{-3}$)¹.

Als Fortführung obiger Versuche mit dem Kantenfilter OG530 wurden Messungen mit dielektrischen Filtern an einem kommerziellen CE-Gerät durchgeführt, das an einem HeCd-Laser gekoppelt war, der die Wellenlänge 325nm emittiert [141].

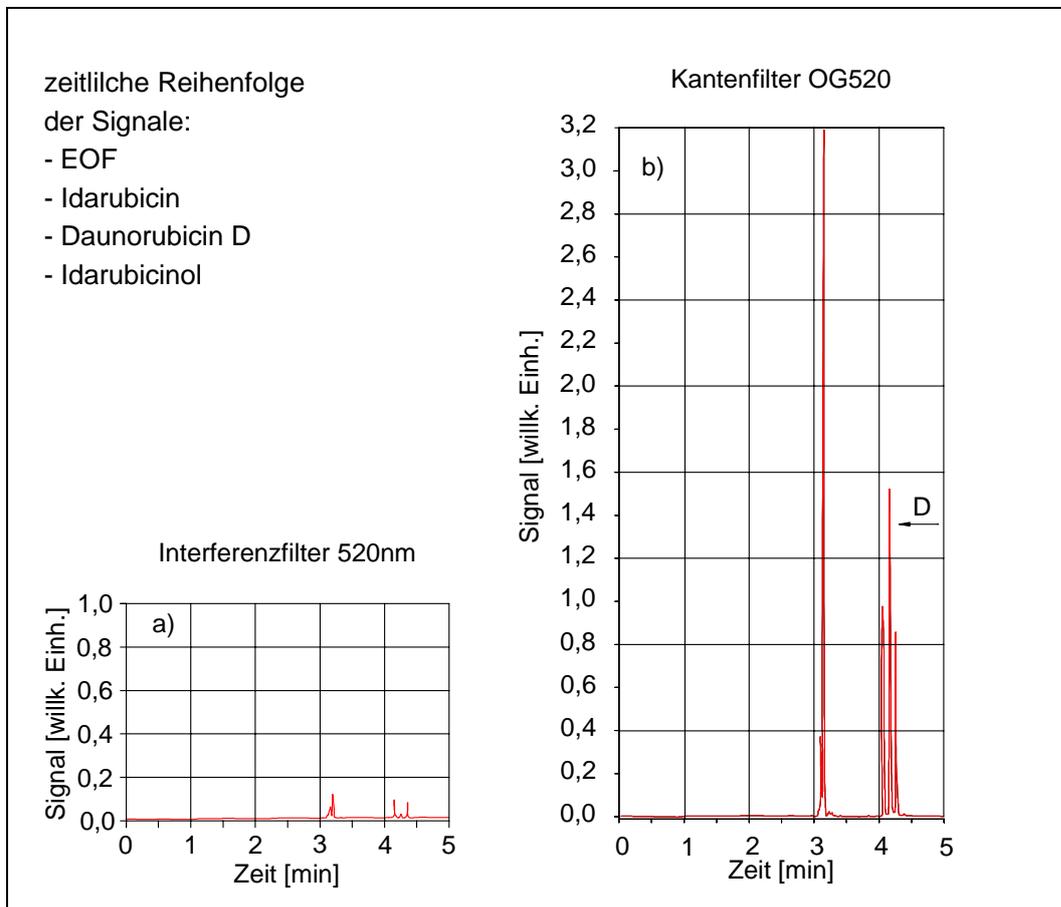


Abbildung E.2: Signalvergleich bei a) Interferenzfilter 520nm und b) Kantenfilter OG530 nach einer Anregung mit der Wellenlänge 488nm.

¹Im Gegensatz zu Kantenfiltern weisen dielektrische Beschichtungen oft keine eigene Fluoreszenz auf.

Die Verwendung von dielektrischen Spiegeln resultierte in einer Steigerung des Untergrundrauschens. Dieses kompensierte den Signalgewinn durch ein schlechteres S/R-Verhältnis und verursachte somit geringere Nachweisgrenzen, als sie bei Verwendung der Interferenzfilter erzielbar wurde. Als Ursache für dieses Ergebnis sind die Intensitätsschwankungen (1%-2%) eines HeCd-Lasers, die im Gegensatz zu einem Argon-Ionen-Laser (0.5%-1%) größer sind [45], und die höhere Transmission des dielektrischen Filters im Vergleich zu einem Kantenfilter zu nennen.

Literaturverzeichnis

- [1] H. Wojciechowski, H. G. Gumbinger, U. Vahlensieck, H. Winterhoff, A. Nahrstedt und F. H. Kemper, *Journal of Chromatography A*, 717, 261-270 (1995).
- [2] E. Jellum, A. K. Thorsrud und E. Time, *Journal of Chromatography*, 559, 455-465 (1991).
- [3] E. S. Yeung in: „Chromatographic Science Series“, 64, Autor: N. A. Guzman, 587-603 (1993).
- [4] R. P. Oda, R. Clark, J. A. Katzmann und J. P. Landers, *Electrophoresis*, 18, 1715-1723 (1997).
- [5] F. Tagliaro, S. Turrina und F. P. Smith, *Forensic Science International*, 77, 211-229 (1996).
- [6] G. Hempel, S. Haberland, P. Schulze-Westhoff, N. Möhling, G. Blaschke und J. Boss, *Journal of Chromatography B*, 698, 287-292 (1997).
- [7] N. J. Reinhoud, U. R. Tjaden, H. Irth und J. von der Greef, *Journal of Chromatography*, 574, 327-334 (1992).
- [8] X. Páez, P. Rada, S. Tucci, N. Rodríguez und L. Hernández, *Journal of Chromatography A*, 735, 263-269 (1996).
- [9] O. Brüggemann, M. Meder und R. Freitag, *Journal of Chromatography A*, 744, 167-176 (1996).
- [10] A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.*, 33, 524 (1934).
- [11] A. D´Hulst, P. Augusijns, S. Arens, L. Van Parijs, S. Colson, N. Verbeke und R. Kinget, *Journal of Chromatographic Science*, 34, 276-281 (1996).
- [12] K. Kakehi, A. Susami, A. Taga, S. Suzuki und S. Honda, *Journal of Chromatography A*, 680, 209-215 (1994).

- [13] J. P. Landers, in:
„Handbook of Capillary Electrophoresis”, CRC Press, Boca Raton, Fl.
(1994).
- [14] M. Dekker, in:
„Capillary Electrophoresis Technology”, Autor: N. A. Gauzman, New
York (1993).
- [15] P. Jandik und G. Bonn, in:
„Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions”, VCH Publis-
hers, (1993).
- [16] S. F. Y. Li, in:
„Capillary Electrophoresis”, Elsevier, Amsterdam (1992).
- [17] J. R. Petersen, M. G. Bissell und A. A. Mohammad,
Journal of Chromatography A, 744, 37-44 (1996).
- [18] T. W. Garner und E. S. Yeung,
Anal. Chem. , 62, 2195 (1990).
- [19] M. Yu und N. J. Dovichi,
Anal. Chem. , 61, 37 (1989).
- [20] M. Yu und N. J. Dovoichi,
Mikrochim. Acta, III, 27 (1988).
- [21] T. Odake, T. Kitamori und T. Sawada,
Anal. Chem. ,69, 2537-2540 (1997).
- [22] M. Albin, R. Weinberger, E. Sapp und S. Moring,
Anal. Chem. , 63, 417 (1991).
- [23] L. Hernández, J. Escalona, N. Joshi und N. Guzman,
Journal of Chromatography, 559, 183 (1991).
- [24] S. M. Nie und R. N. Zare,
Annual Review Of Biophysics and Biomolecular Structure, 26, 567-596
(1997).
- [25] W. G. Kuhr und E. S. Yeung,
Anal. Chem. , 60, 1832 (1988).
- [26] L. Gross und E. S. Yeung,
Journal of Chromatography, 480, 169 (1989).
- [27] B. L. Hogan und E. S. Yeung,
Journal of Chromatographic Science, 28, 15 (1990).

- [28] C. E. MacTaylor, A. E. Ewing,
Electrophoresis, 18, 2279-2290 (1997).
- [29] E. Clar, in:
„Polycyclic Hydrocarbons”, Academic Press, London, New York,
Springer-Verlag, Berlin (1964).
- [30] E. Arraga, D. Y. Chen, X. L. Cheng und N. J. Dovichi,
Journal of Chromatography A, 652, 347 (1993).
- [31] D. J. Rose und J. W. Jorgensen,
Journal of Chromatography, 447, 117 (1988).
- [32] R. G. Brownlee und S. W. Compton,
Am. Biotechno. Lab. , October 10 (1988).
- [33] M. Jansson und J. Roeraade,
Anal. Chem. , 65, 2766-2769 (1993).
- [34] F. K. Kneubühl und M. W. Sigrist, in:
„Laser”, Physik, Teubner Taschenbücher, 3. Auflage (1991).
- [35] E. Gassmann, J. E. Kuo und R. N. Zare,
Science, 230, 813 (1985).
- [36] G. Hempel und G. Blaschke,
Journal of Chromatography B, 675, 131-137 (1996).
- [37] C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao und R. N. Zare,
Anal. Chem. , 67, 2026-2029 (1995).
- [38] T. T. Lee und E. S. Yeung
Journal of Chromatography, 595, 319 (1992).
- [39] A. T. Timperman, K. E. Oldenburg und J. V. Sweedler,
Anal. Chem. , 67, 3241 (1995).
- [40] K. C. Chan, G. M. Janini, G. M. Muschik und H. J. Issaq,
Journal of Liquid Chromatography, 16, 1877-1890 (1993).
- [41] J. R. Lakowisz, in: „Principles of Fluorescence Spectroscopy”,
Plenum Press, New York, London (1983).
- [42] I. B. Berlman, in:
„Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules”, 2. Auflage,
Academic Press, New York, London (1971).
- [43] S. J. Kok, E. M. Kristenson, C. Gooijer, N. H. Velthorst und U. A. Th.
Brinkman,
Journal of Chromatography A, 771, 331-341 (1997).

- [44] A. J. G. Mank, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman und C. Gooijer, *Journal of Chromatography A*, 695, 75 (1995).
- [45] R. J. van de Nesse, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman und C. Gooijer, *J. of Chromatography A*, 704, 1-25 (1995).
- [46] R. E. Milofsky und E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 65, 153-157 (1993).
- [47] M. J. Sepaniak, T. Vo-Dinh, D. L. Stokes, V. Tropina und J. E. Dickens, *Talanta* 96, 1889-1901 (1996).
- [48] S. Folestad, L. Johnson, B. Josefsson und B. Galle, *Anal. Chem.*, 54, 925 (1982).
- [49] K. J. Miller und F. E. Lytle, *Journal of Chromatography*, 648, 245-250 (1993).
- [50] J. M. Song, H. Kawazumi, T. Inoue und T. Ogawa, *Journal of Chromatography A*, 727, 303-333 (1996).
- [51] L. W. Hershberger, J. B. Callis und G. D. Christian, *Anal. Chem.*, 51, 1444 (1979).
- [52] S. Wu und N. J. Dovichi, *Journal of Chromatography*, 480, 141-155 (1989).
- [53] private Mitteilung: R. N. Zare, Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, California.
- [54] J. V. Sweedler, J. B. Shear, H. A. Fishman, R. H. Scheller und R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 63, 497-502 (1991).
- [55] J. V. Sweedler, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 24, 59 (1993).
- [56] J. V. Sweedler, K. L. Ratzlaff und M. B. Denton, in: „Charge-Transfer Devices in Spectroscopy”, VCH, New York (1994).
- [57] Y. F. Cheng, R. D. Piccard, T. Vo-Dinh, *Appl. Spectrosc.*, 44, 755 (1990).
- [58] S. Nilsson, J. Johansson, M. Mecklenburg, S. Birnbaum, S. Svanborg, K.-C. Wahlund, K. Mosbach, A. Miyabayashi und P.-O. LLarsson, *J. CAP. Elec.* 2, 46-52 (1995).
- [59] A. T. Timperman und J. V. Sweedler, *The Analyst*, 121, 45R-52R (1996).

- [60] R. Weinberger, E. Sapp und S. Moring,
Journal of Chromatography, 516, 271-285 (1990).
- [61] D. Y. Chen, K. Adelheim, X. L. Cheng und N. J. Dovichi,
Analyst, 119, 349-252 (1994).
- [62] K. Hebenbrock, P. M. Williams und B. L. Xarger,
Electrophoresis, 16, 1429-1436 (1995).
- [63] Gerthsen, Kneser, Vogel, in:
„Physik“, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1974).
- [64] M. Alonso und E. J. Finn, in:
„Quantenmechanik“, Addison-Wesley Publishing Company, 2. Auflage
(1988).
- [65] E. Riedel, in:
„Allgemeine und Anorganische Chemie“, de Gruyter, 6. Auflage, 101
(1994).
- [66] S. G. Schulmann, in:
„Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy“, Pergamon Press, Ox-
ford, New York, Toronto, Frankfurt (1977).
- [67] G. H. Schenk, in:
„Absorption of Light and Ultraviolet Radiation“, Allyn and Bacon, Inc.
, Boston, 5 (1973).
- [68] D. M. Hercules, in:
„Fluorescence and Phosphorescence Analysis“, Interscience Publishers,
New York, London, Sydney, 22 (1966).
- [69] M. Zander, in:
„Fluorimetrie“, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 4. Auflage
(1981).
- [70] M. Kasha,
Disc. Faraday Soc. , 9, 14 (1950).
- [71] R. E. Kellogg und R. G. Bennett,
J. Chem. Phys. , 42, 3042 (1964) private Mitteilung von E. Lim.
- [72] H. L. J. Bäckström und K. Sandros,
Acta. Chem. Scand. , 12, 823 (1958).
- [73] C. A. Parker und C. G. Hatchard,
J. Phys. Chem. , 66, 2506 (1962).

- [74] M. Beer und H. C. Longuet-Higgins,
J. Chem. Phys. , 23, 1390 (1955).
- [75] G. Viswanath und M. Kasha,
J. Chem. Phys. , 24, 574 (1956).
- [76] S. A. Asher, R. W. Bormett, X. G. Chen, D. H. Lemmon, N. Cho, P. Peterson, M. Arrigoni, L. Spinelle und J. Cannon,
Appl. Spectros. , 47, 628 (1993).
- [77] P. A. Harmon, J. Teraoka und S. A. Asher,
J. Am. Chem. Soc. , 122 , 8789 (1990).
- [78] R. A. Mathies, K. Peck und L. Stryer,
Anal. Chem. , 62, 1766 (1990).
- [79] D. C. Nguyen, R. A. Keller, J. H. Jett und J. C. Martin,
Anal. Chem. , 59, 2158 (1987).
- [80] H. E. Zimmerman und V. R. Sandel,
J. A. Chem. Soc. , 24 , 915 (1963).
- [81] G. Jackson und G. Porter,
Proc. Roy. Soc. (London), A260, 13 (1961).
- [82] R. T. William und J. W. Bridges,
J. Clin. Pathol. , 17, 371 (1964).
- [83] I. M. Warner, in:
„Molecular Fluorescence and Phosphorescence in „Instrumental Analysis“, Autoren G. D. Christian und J. E. O’Neilly, Prentice Hall (1986).
- [84] C. A. Parker, in:
„Photoluminescence of Solutions“, New York, American Elsevier, 435 (1968).
- [85] J. Czekalla,
Z. Elektrochem. , 64, 1221 (1960).
- [86] J. Czekalla und G. Wick,
Z. Elektrochem. , 65, 727 (1961).
- [87] S. Hjertén, in:
„Topics In Bioelectrochemistry And Bioenergetics“, Autor: G. Milazzo, 2, 9-128 (1978).
- [88] A. W. Adamson, in:
„Physical Chemistry of Surfaces“, Wiley-Interscience, New York, 3. Auflage, Kapitel 4 (1976).

- [89] W. J. Lambert und D. L. Meddleton,
Anal. Chem. 62, 1685 (1990).
- [90] R. J. Hunter, in:
„Zeta Potential in Colloid Science”, Academic Press, New York (1981).
- [91] M. v. Smoluchowski,
Physik. Zeitschrift, 17, 529-531 (1905).
- [92] K. D. Lukacs und J. W. Jorgenson,
HRC, 8, 407 (1985).
- [93] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs,
J. Chrom. , 218, 209-216 (1981).
- [94] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs,
Anal. Chem. , 53, 1298-1302 (1981).
- [95] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs,
Science, 222, 266-272 (1983).
- [96] J. H. Knox,
Chromatographia, 8 (1988).
- [97] L. D. Kevin, Kei-Lee. K. Liu, Maureen Lanan und M. D. Morris,
Anal. Chem. , 65, 292-298 (1993).
- [98] Kei-Lee Liu, L. Kevin und M. D. Morris,
Anal. Chem. , 66, 3744-3750 (1994).
- [99] R. J. Nelson, A. Paulus, A. S. Cohen, A. Guttman und B. L. Karger,
Chromaotrphia, 21, 812 (1989).
- [100] E. Grushka, R. M. McCormik und J. J. Kirkland,
Anal. Chem. , 61, 241-246 (1989).
- [101] J. O. N. Hinckley,
Journal of Chromatography, 109, 209-217 (1975).
- [102] R. Weinberger, in:
„Capillary Electrophoresis”, Academic Press. Inc. (1993).
- [103] R. Kuhn und S. Hoffstetter-Kuhn, in:
„Capillary Electrophoresis: Principles and Practice”, Springer Laboratory (1993).
- [104] K. K. Unger, in: „Porous Silica”,
J. Chromatogr. Library, 16, Elsevier Co. Amsterdam, (1979).

- [105] S. Hjertén,
Electrophoresis, 11, 665-690 (1990).
- [106] S. Hjertén,
Journal of Chromatography, 347, 189-198 (1985).
- [107] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts und Th. P. E. M. Verheggen,
Journal of Chromatography, 169, 11-20 (1979).
- [108] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts und Th. P. E. M. Verheggen,
Journal of Chromatography, 169, 1-10 (1979).
- [109] D. J. Rose und J. W. Jorgenson,
Anal. Chem. , 60, 624 (1988).
- [110] T. Berg, Dipl.-Arbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik (1995).
- [111] A. Lougar, Dipl.-Arbeit, Universität Bielefeld, Fakultät für Physik (1995).
- [112] Firma Laseroptics, Garbsen
- [113] H. W. Funk in:
„Einführung in die Bildverstärkertechnik“, Proxitronik, Bensheim.
- [114] „Wissenswertes über CCD-Kameras 05/97“, in: PCO-CCD-Imaging,
PCO Computer Optics GmbH, Ludwigsplatz 4, D-93309 Kelheim.
- [115] A. C. Eckbreth, in:
„Laser Diagnostics for Combustion, Temperature And Species“, Abacus
Press, Tunbridge Wells, Kent & Cambridge, Maas (1988).
- [116] P. M. Epperson und M. B. Denton,
Anal. Chem. , 61, 1513-1519 (1989).
- [117] A. T. Young,
Physics Today, 35, 42-48 (1982).
- [118] S. F. Y. Li in:
J. Chrom. Library, 52, 73-95 (1993).
- [119] D. E. Burton, M. J. Sepaniak und M. Maskarinec,
J. Chromatogr. Sci. , 24, 347 (1986).
- [120] N. J. Dovichi und Y. F. Cheng,
Am. Biotechnol. Lab. , 7, 10 (1989).
- [121] E. J. Guthrie, J. W. Jorgenson und P. R. Duszneski,
J. Chromatogr. Sci. , 22, 171 (1984).

- [122] Schott Glaswerke, Mainz
- [123] „Booklet Of Grating Efficiency Curves”, Oriel Instruments, Darmstadt.
- [124] private Mitteilung, Herr Dipl. Phys. F. Bormann, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld.
- [125] J. B. Birks, in:
„Photophysics Of Aromatic Molecules”, John Wiley & Sons, London,
126-131 (1970).
- [126] D. A. Long, in:
„Raman Spectroscopy”, McGraw-Hill, New York (1977).
- [127] A. E. Bruno, E. Gassman, N. Pericles und A. Anton,
Anal. Chem. , 63, 730 (1989).
- [128] J. A. Luy, U. Haeusig und G. Schomburg,
HRC, 13, 374 (1990).
- [129] R. L. Beyer, in:
„Parametric Oscillators and Nonlinear Material”, Nonlinear Optics, Aca-
demic Press, London, New York, San Francisco (1997).
- [130] Kommentar zum Deutschen Arzneibuch 10, Grundlfg. 1991.
- [131] J. T. Brownrigg, A. W. Hornig und H. J . Coleman:
Paper 396 präsentiert bei der 28. Pittsburgh Conference an Analytical
Chemistry and Applied Spectroscopy, März 1977.
- [132] L. P. Giering,
Ind. Res. , 20, 134 (1978).
- [133] private Mitteilung,
Herr Apotheker B. Kurth, Institut für Pharmazeutische Chemie,
Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Hittorfstr. 58-62, 48149
Münster.
- [134] M. Heuermann und G. Blaschke,
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 12, 753-760 (1994).
- [135] private Mitteilung,
Herr Apotheker S. Haberland, Institut für Pharmazeutische Chemie,
Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Hittorfstr. 58-62, 48149
Münster.
- [136] T. G. Matthews und F. E. Lytle,
Anal. Chem. , 51, 583 (1979).

- [137] H. R. Christen, in:
„Einführung in die Chemie“, 10. Auflage, S. 275, Diesterweg Salle, Sauerländer (1975).
- [138] M. Cignitti, in:
„Topics in Bioelectrochemistry And Bioenergetics“, Autor: G. Milazzo,
2, 31- 52 (1978).
- [139] G. R. Wiese, R. O. James und T. W. Healy,
Discuss. Faraday Soc. , 52, 302-311 (1971).
- [140] private Mitteilung,
Dr. Hempel, Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde, Pädiatrische
Hämatologie/Onkologie, Albert Schweizer Straße 33, 48129 Münster.
- [141] private Mitteilung,
Herr Apotheker J. G. Moeller, Institut für Pharmazeutische Chemie,
Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Hittorfstr. 58-62, 48149
Münster.

Lebenslauf

Name : Jens Höbel

Geburtsdatum : 02. August 1965

Geburtsort : Berlin / Neukölln

Schulbesuch : 1971-1975 Grundschule Neesen
1975-1978 Besselgymnasium Minden
1978-1985 Wesergymnasium Vlotho

Wehrdienst : 1985-1986 HFLGWAS Bückeberg

Studium : Studium der Physik an der Universität Bielefeld
1990-1992 Diplomarbeit am
Lehrstuhl für Molekül- und Oberflächenphysik
der Universität Bielefeld
Thema: „Aufbau und Erprobung eines
Spinpolarisationsdetektors nach dem Prinzip der
Niederenergie-Elektronenbeugung“
seit 1994:
Zusatzstudiengang mit Diplomabschluß
für Ingenieure und Naturwissenschaftler
im Fachbereich Wirtschaftswissenschaften
an der Fern-Universität Hagen
1998: Erlangung des Hauptdiploms

Promotion : seit 1992:
Promotion am
Lehrstuhl für Angewandte Laserphysik
der Universität Bielefeld

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zu dem Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben und in diesem Zusammenhang meine Eltern nennen, die mich unterstützt und mir maßgebliche Voraussetzungen zu einem Studium geschaffen haben.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. P. Andresen für die Themenstellung und die Unterstützung für den Fortgang der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. G. Blaschke vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelm-Universität Münster für die großzügige Bereitstellung von Labormaterial und Arzneiprobe, sowie für die Unterstützung der Forschungsarbeiten. Den Doktoranden S. Haberland, J. G. Möller und B. Kurth aus seiner Arbeitsgruppe danke ich für die engagierte Mitarbeit bei dem Aufbau eines CE-Systems an der Fakultät für Physik in Bielefeld und die fachlichen Diskussionen über die CE und die Pharmakologie.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Angewandte Laserphysik" danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die fachlichen Diskussionen und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Stellvertretend möchte ich hier Herrn Dr. G. Wiebusch für die Betreuung der Lasersysteme, Dipl. Phys. F. Liedeker für die gute Zusammenarbeit im Labor und Dipl. Phys. D. Struve für die Korrektur dieses Skripts erwähnen.

Ein Dankeschön richte ich auch an die Mitarbeiterin/Mitarbeiter der Mechanik-Werkstatt und die Mitarbeiter der Elektronik-Werkstatt an der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld für den Rat und die Tat beim Aufbau des Experimentes.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Ehefrau bedanken, die mich während dieser nicht immer einfachen Zeit der Promotion und des Zweitstudiums begleitet hat.

