



Analytische Chemie

ENTWICKLUNG EINES KOMPAKTEN DETEKTIONSSYSTEMS
FÜR DIE LASERINDUZIERTE, WELLENLÄNGENAUFGELOSTE
FLUORESZENZDETEKTION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Lukas Dudek

aus Breslau

- 2012 -

Dekan: Prof. Dr. Bart Jan Ravoo

Erster Gutachter:Prof. Dr. Uwe Karst

Zweiter Gutachter:Prof. Dr. Jan Andersson

Tag der mündlichen Prüfung: 09 . 10 . 2012

Tag der Promotion: ____ . ____ . 2012

Inhaltsverzeichnis

KAPITEL 1

1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung	3

KAPITEL 2

Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion

– Theoretischer Überblick –		4
2.1	Kapillaronenelektrophorese	4
2.2	CE/ESI-MS	6
2.3	Laser	8
2.4	Laserdioden	11
2.5	Fluoreszenz	12
2.6	Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion	14
2.7	CE-LIF mit wellenlängenaufgelöster Detektion	21

KAPITEL 3

Ausgangspunkt der Entwicklung eines kompakten CE-LIF-Systems

3.1	CE-LIF mit einem Mikroskop als fokussierendes Element	25
3.1.1	<i>Einleitung (Oyster[®]-488 und β-Lactoglobulin A)</i>	<i>25</i>
3.1.2	<i>Instrumenteller Aufbau</i>	<i>27</i>

3.1.3	<i>Funktionsweise</i>	29
3.2	Experimenteller Teil	30
3.2.1	<i>Probenvorbereitung</i>	30
3.2.2	<i>Massenspektren von Oyster[®]-488</i>	31
3.2.3	<i>CE- und Spektrometereinstellungen</i>	31
3.2.4	<i>HPLC- und MS-Parameter</i>	32
3.2.5	<i>Chemikalien</i>	33
3.2.6	<i>Geräte</i>	34
3.3	Auswertung.....	34
3.3.1	<i>Identifizierung von Oyster[®]-488-Addukten mit β-Lactoglobulin A</i>	34
3.3.2	<i>CE-Trennung von β-Lactoglobulin A und Oyster[®]-488</i>	40
3.3.3	<i>Nachweisgrenze der LIF-Detektion</i>	41
3.4	Fazit und Ausblick des dritten Kapitels.....	42

KAPITEL 4

Entwicklung eines kompakten, wellenlängenaufgelösten

Fluoreszenzdetektors für die Kapillarelektrophorese

4.1	Einleitung	44
4.2	Geräte	46
4.3	Chemikalien.....	48
4.4	Erster Prototyp.....	49
4.4.1	<i>Einleitung und Konstruktionszeichnungen</i>	49
4.4.2	<i>Modellanalyt Carboxynaphthofluorescein</i>	51

4.4.3	<i>Kassette im Eigenbau</i>	53
4.4.4	<i>Ergebnisse und nächsten Schritte</i>	54
4.5	Zweiter Prototyp	56
4.5.1	<i>Einleitung</i>	56
4.5.2	<i>Technische Änderungen</i>	57
4.5.3	<i>Modellanalyt Oxazin-1</i>	60
4.5.4	<i>Elektrophoretische Trennung des Modellanalyten Oxazin-1</i>	62
4.5.5	<i>Nachweisstärke des zweiten Prototypen</i>	63
4.5.6	<i>Ergebnisse und Weiterentwicklung</i>	65
4.6	Dritter Prototyp.....	68
4.6.1	<i>Einleitung</i>	68
4.6.2	<i>Technische Verbesserungen</i>	69
4.6.3	<i>Auswahl des Filters</i>	73
4.6.4	<i>Optische Bank im Eigenbau</i>	74
4.6.5	<i>Wahl der cut-on-Wellenlänge des Filters</i>	76
4.6.6	<i>Quadratur des Kreises (Flache Kapillargeometrie)</i>	79
4.6.7	<i>Linsenvariation am Laser</i>	82
4.6.8	<i>Optimierung der Glasfaser</i>	87
4.6.9	<i>Bandbreitenoptimierung</i>	91
4.6.10	<i>Optimierung des Kapillardurchmessers</i>	94
4.6.11	<i>Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und linear dynamischer Bereich</i>	96
4.6.12	<i>Modelltrennung</i>	98

4.6.13	<i>Fazit und Ausblick</i>	102
4.7	Vierter Prototyp	104
4.7.1	<i>Einleitung</i>	104
4.7.2	<i>Technische Änderungen</i>	106
4.7.3	<i>Lasergehäuse im Eigenbau</i>	109
4.7.4	<i>Anregungsenergie in Korrelation zur emittierten Fluoreszenz</i>	111
4.7.5	<i>Analytische Leistungsfähigkeit für rote Laser</i>	115
4.7.6	<i>Modellanalyt Coumarin 343</i>	117
4.7.7	<i>Beschichtung der Laserlinse</i>	121
4.7.8	<i>Elektrophoretische Trennung des Modellanalyten Coumarin 343</i>	123
4.7.9	<i>Quadratische Kapillare</i>	124
4.7.10	<i>Variation der Integrationszeit</i>	127
4.7.11	<i>Optimierung der Injektionszeit</i>	130
4.7.12	<i>Specana – Datenanalyse für die Analytik</i>	132
4.7.13	<i>Optimierung der Integrationsgrenzen</i>	139
4.7.14	<i>Optimierung des gleitenden Mittelwerts</i>	142
4.7.15	<i>Auswirkungen der Integrationsgrenzen und des gleitenden Mittelwerts</i>	143
4.7.16	<i>Geräteparameter zur Bestimmung der analytischen Leistungsfähigkeit des Detektionssystems</i>	145
4.7.17	<i>Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und linear dynamischer Bereich</i>	147

4.7.18	<i>Ergebnisse und Ausblick</i>	149
4.8	Fünfte Modellversion	152
4.8.1	<i>Einleitung</i>	152
4.8.2	<i>Technische Veränderungen</i>	154
4.8.3	<i>Optische Bank für den HPLC-Adapter</i>	157
4.8.4	<i>Optimierung der Glaskapillaren zur HPLC-Kopplung</i>	159
4.8.5	<i>Flüssigchromatographische Analyse des Modellanalyten Coumarin 343</i>	162
4.8.6	<i>Leistungsfähigkeit des HPLC-LIF-Systems</i>	164
4.8.7	<i>Fazit und Ausblick</i>	169

KAPITEL 5

Evaluation des entwickelten Detektionssystems

5.1	Untersuchung eines Rhodamingemisches mittels CE-LIF....	172
5.1.1	<i>Einleitung</i>	172
5.1.2	<i>Probenvorbereitung</i>	174
5.1.3	<i>CE- und Spektrometereinstellungen</i>	175
5.1.4	<i>Geräte</i>	177
5.1.5	<i>Chemikalien</i>	177
5.1.6	<i>Kapillarelektrophoretische Trennung eines Rhodamingemisches</i>	178
5.1.7	<i>Fazit und Ausblick der Untersuchung eines Rhodamingemisches</i>	183

5.2	Trennung eines Farbstoffgemisches mittels HPLC-LIF/ESI-MS/MS.....	184
5.2.1	<i>Einleitung</i>	184
5.2.2	<i>Probenvorbereitung</i>	186
5.2.3	<i>Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode</i>	187
5.2.4	<i>Chemikalien</i>	189
5.2.5	<i>Geräte</i>	190
5.2.6	<i>Flüssigchromatographische Trennung eines Farbstoffgemisches</i>	190
5.2.7	<i>Fazit und Ausblick der Trennung eines Farbstoffgemisches</i>	195
5.3	Analyse von Aminosäuren sowie β -Lactoglobulin A mittels CE und HPLC nach Derivatisierung mit NBD-Cl.....	197
5.3.1	<i>Einleitung</i>	197
5.3.2	<i>Probenvorbereitung</i>	200
5.3.3	<i>Parameter der CE-LIF-Methode</i>	202
5.3.4	<i>Parameter der CE/ESI-ToF-MS-Methode</i>	204
5.3.5	<i>Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode</i>	206
5.3.6	<i>Geräte</i>	209
5.3.7	<i>Chemikalien</i>	210
5.3.8	<i>Kapillarelektrophoretische Trennung einer Aminosäuremischung</i>	211
5.3.9	<i>Flüssigchromatographische Trennung einer Aminosäuremischung</i>	217

5.3.10	<i>Kapillarelektrophoretische Analyse von β-Lactoglobulin A</i>	222
5.3.11	<i>Zusammenfassung und Ausblick der Analyse von Biomolekülen</i>	227

KAPITEL 6

Zusammenfassung und Ausblick

6.1	Zusammenfassung	230
6.2	Ausblick	236
	Literaturverzeichnis	240
	Publikationsliste	247
	Abkürzungsverzeichnis	248
	Danksagung	250
	Lebenslauf	252

Kapitel 1

1.1 Einleitung

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine moderne und leistungsfähige Analysenmethode für ionische Verbindungen. Sie hat in den vergangenen drei Jahrzehnten durch den instrumentellen Fortschritt stark an Bedeutung gewonnen [1, 2]. Schnelle und effiziente Trennungen zählen zu den Vorteilen der CE, sowie die Möglichkeit, mit kleinen Probenvolumina im Nanoliterbereich arbeiten zu können. Diese stellen jedoch hohe Anforderungen an die Detektion [3, 4]. Es werden hauptsächlich optische Detektionsverfahren eingesetzt [5, 6]. Die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF) ist dabei die empfindlichste optische Detektionsmethode in der CE [1, 7, 8]. Dies gilt insbesondere im Vergleich zur UV/Vis-Detektion, da im Gegensatz dazu die Messung des Fluoreszenzlichts beinahe ohne Hintergrundstrahlung stattfinden kann [9].

In klassischen Fluoreszenzdetektoren werden als Anregungsquellen Xenonlampen benutzt. Diese sind im Vergleich zu den meisten Lasern preiswerter und emittieren über das gesamte sichtbare Spektrum. Jedoch können besonders hohe Anregungsenergien nur mit Lasern erreicht werden. Durch die lineare Proportionalität von Anregungsenergie und Fluoreszenzintensität werden äußerst niedrige Nachweisgrenzen erzielt [10]. Die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion ist mit dem gut

fokussierbaren Laserstrahl hervorragend für die Kapillarelektrophorese geeignet.

Die niedrigsten Nachweisgrenzen können mit Photomultipliern (PMT, engl. *photo multiplier tube*) erzielt werden. Jedoch werden dabei außer der Migrationszeit keine weiteren Informationen über den Analyten gewonnen [11, 12]. Unter Einbeziehung multidimensionaler Daten, erhalten durch wellenlängen- oder zeitaufgelöste Detektion, können Analyten oftmals zweifelsfrei identifiziert und unterschieden werden. Analog zur UV/Vis-Detektion mit einem Diodenarraydetektor (DAD) liefert die Kombination von CE mit wellenlängenaufgelöster Fluoreszenzdetektion sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über die Analytmoleküle [13]. Dies ist besonders interessant, um Abweichungen der Migrationszeiten oder mögliche Komigrationen ausschließen zu können. Daher werden immer mehr Detektoren mit Photodiodenarrays (PDA) oder *charge-coupled devices* (CCD) entwickelt, welche einen großen spektralen Bereich simultan erfassen und so komplementäre Informationen über die Analyten liefern [14].

Bei der Weiterentwicklung dieser Systeme zur laserinduzierten, wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzdetektion steht die Miniaturisierung im Vordergrund. Es werden daher stets kompaktere und günstigere Detektionssysteme ohne aufwändige Optiken oder große Gas- bzw. Festkörperlaser entwickelt. Diese Systeme sollen dennoch möglichst leistungsstark sowie variabel sein und einen hohen Informationsgehalt über die Analyten bieten.

1.2 Zielsetzung

Um die Vorteile der laserinduzierten, wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzdetektion für den alltäglichen Gebrauch nutzbar zu machen, soll ein komplettes Detektionssystem mit integriertem Laser, Linsen zur Fokussierung sowie Filter zur Minimierung der Streustrahlung entwickelt, optimiert und charakterisiert werden. Dabei wurden die folgenden Punkte als Ziele festgelegt:

- Miniaturisierung des Detektionssystems unter Verwendung möglichst einfacher optischer Komponenten
- Primäre Ausrichtung auf die Kapillarelektrophorese, um die technisch bedingte geringe Empfindlichkeit zu verbessern
- Möglichst hohe Variabilität des Systems bezüglich der eingesetzten Anregungswellenlängen und Anwendungsmöglichkeiten
- Entwicklung einer Software für die Verarbeitung der multidimensionalen Daten zu 3D-Elektropherogrammen bzw. 3D-Chromatogrammen
- Charakterisierung des entwickelten Detektionssystems anhand analytischer Leistungsdaten
- Evaluation des Potentials bezüglich der Detektion kapillarelektrophoretischer und chromatographischer Trennungen

Kapitel 2

Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF) – Theoretischer Überblick –

2.1 Kapillarzonenelektrophorese

Der Begriff Elektrophorese bezeichnet Techniken, bei denen die Trennung geladener Teilchen in einer Elektrolytlösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten erfolgt [15].

Üblicherweise besteht ein Kapillarelektrophoresesystem aus einer Gleichstromhochspannungsquelle, einer Quarzkapillare mit einem Innendurchmesser von 25 bis 150 μm , zwei Elektrolytgefäßen und einer Detektionseinheit. Die mit Pufferlösung gefüllte Kapillare verbindet die beiden Gefäße, in welche über die zwei Platinelektroden eine Potentialdifferenz von bis zu 30 kV angelegt wird. In der Regel ist die Elektrode auf der Einlassseite als Anode und diejenige im Auslassgefäß als Kathode geschaltet. Durch die so erzeugte Potentialdifferenz wandern die Ionen in der Kapillare zum jeweils entgegengesetzt geladenen Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen hängt von deren Größe und Ladung ab.

Im Gegensatz zu anderen elektrokinetischen Trenntechniken tritt bei der Kapillarelektrophorese zusätzlich ein makroskopischer Fluss der Pufferlösung, der sogenannte elektroosmotische Fluss (EOF), auf. Dieser wird durch die Wechselwirkung der Pufferionen mit den deprotonierten Silanolgruppen der Kapillarwand verursacht. Dabei werden die elektrophoretischen Mobilitäten der Analytione überlagert, sodass eine parallele Bestimmung von Kationen und Anionen an einem Kapillarende möglich ist [16]. Ein Beispiel für die Migrationsreihenfolge verschiedener Anionen und Kationen ist in Abbildung 2.1 gezeigt.

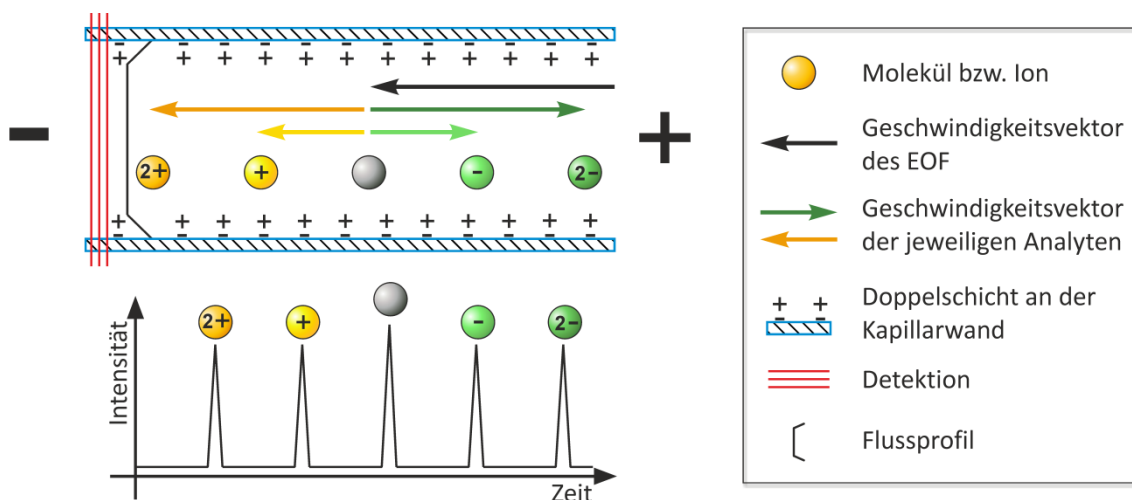


Abbildung 2.1: Überlagerung des elektroosmotischen Flusses (EOF) mit den elektrophoretischen Mobilitäten der Analytione (oben) und die resultierende Migrationsreihenfolge der Trennung mit einem signifikanten EOF (unten)

Durch den EOF und den kleinen Durchmesser der Kapillare bildet sich ein stempelförmiges Flussprofil aus. Dadurch wird im Vergleich mit dem laminaren Flussprofil bei flüssigchromatographischen Methoden eine sehr hohe Auflösung erreicht [17]. Im Anschluss an die Trennung erfolgt die Detektion meist direkt innerhalb der Kapillare (*on-column*) über UV/Vis-,

Fluoreszenz- oder Leitfähigkeitsdetektion. Bei Nutzung einer massenspektrometrischen oder elektrochemischen Detektion wird außerhalb der Kapillare detektiert (*off-column*).

2.2 CE/ESI-MS

Die Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie bietet einige Vorteile. So können komigrierende Analyten über ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) unterschieden oder Strukturinformationen über Fragmentierungsmuster gewonnen werden. Allerdings ist die direkte Kopplung aufgrund der geringen Flussraten bei der CE nicht möglich [18]. Üblicherweise werden modifizierte HPLC-Elektrosprayionisationsquellen verwendet. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Stromkreise von der CE sowie des MS sich nicht gegenseitig stören dürfen und die Flussraten von CE und HPLC sehr unterschiedlich sind. Während bei der HPLC Flussraten von 200 bis 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ verwendet werden, hängt die CE-Flussrate vom EOF ab und beträgt lediglich 0,25 $\mu\text{L}/\text{min}$ [19]. Um trotz der geringen Flussraten ein stabiles Spray aufrecht zu erhalten, wurden sogenannte *Sheath Liquid-Interfaces* entwickelt [20]. Dabei wird die Flussrate der CE durch einen zusätzlichen Fluss des sogenannten *Sheath Liquids* erhöht. Auf diese Weise kann zudem der Stromkreis zwischen der Elektrolytlösung in der CE-Kapillare und dem *MS-Interface*, welches in diesem Fall die Gegenelektrode der CE ist, geschlossen werden. Um dies gewährleisten zu können muss als *Sheath Liquid* ebenfalls eine leitende Flüssigkeit verwendet werden. Meist wird hierzu ein Gemisch aus einem organischen

Lösungsmittel wie Isopropanol und einer flüchtigen Säure, z.B. Ameisensäure eingesetzt. Die Verwendung von Isopropanol erhöht die Flüchtigkeit des Sprays, während die Säure die Ionisierungseffizienz verbessert. Das am häufigsten verwendete CE/ESI-MS-Interface ist das sogenannte koaxiale *Sheath Liquid-Interface* [18], dieses ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

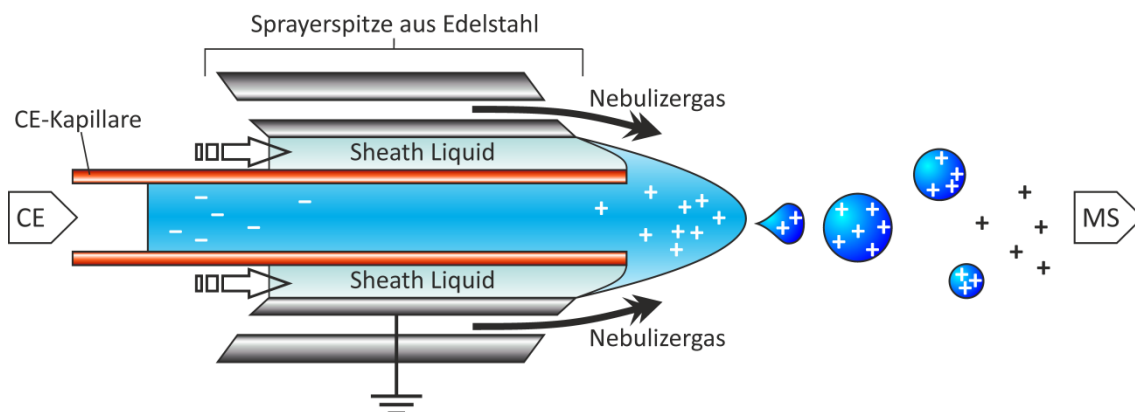


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Entstehung eines Elektrosprays an der Spitze einer koaxialen CE/ESI-MS-Interface-Nadel

Die CE-Kapillare befindet sich im Zentrum der *Interface*-Nadel und ist von einer Edelstahlkapillare, welche zugleich die ESI-Elektrode ist, umgeben. Zwischen diesen beiden Kapillaren wird das *Sheath Liquid* eingeleitet. Zusätzlich befindet sich außen eine weitere Kapillare, durch welche das Nebulizergas geleitet wird und die Mischung aus Elektrolytlösung und *Sheath Liquid* zerstäubt. Die zerstäubte Analytlösung gelangt nach Verdampfen des Lösungsmittels durch eine Potentialdifferenz in das MS [21]. Obwohl durch die zusätzliche Flüssigkeit des *Sheath Liquids* geringe Verdünnungseffekte beobachtet werden können [22], ist das koaxiale *Sheath Liquid-Interface* das robusteste CE/ESI-MS-Interface.

2.3 Laser

Das Prinzip des Lasers beruht auf einer induzierten Strahlungsemission im optischen Bereich und wurde erstmals von MAINMAN 1960 in Form des Rubinlasers publiziert [23]. Das Wort „LASER“ ist ein Akronym und steht für „*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*“ (Lichtverstärkung durch angeregte [induzierte] Emission von Strahlung).

Laser können entweder im Dauer- oder Pulsmodus betrieben werden und Licht im sichtbaren, UV- oder IR-Bereich mit Leistungen von weniger als einem Milliwatt bis hin zu einigen Megawatt abstrahlen. Die meisten Laser haben jedoch drei Gemeinsamkeiten. Sie bestehen aus einem Lasermedium, einer Pumpquelle und einem Resonator [24].

Das Lasermedium kann dabei ein Festkörper, eine Flüssigkeit, ein Gas oder ein Halbleiter sein. Gemeinsam ist allen Lasermedien, dass eine Besetzungsinversion möglich sein muss, d.h. die Mehrheit der aktiven Teilchen des Mediums muss auf ein angeregtes, metastabiles elektronisches Niveau gehoben werden können. Die meisten Laser basieren auf einem Drei- bzw. Vier-Niveau-System (Abbildung 2.3). Bei einem Drei-Niveau-Laser werden die Atome des Lasermediums durch Pumpen aus dem Grundniveau E_1 zunächst in das angeregte Niveau E_3 gebracht, welches sich schnell in Richtung E_2 entleert. Die stimulierte Emission von Licht findet beim Übergang von E_2 zu E_1 statt. Drei-Niveau-Laser werden in der Regel gepulst betrieben, da Atome in E_1 das emittierte Licht absorbieren und auf das Niveau E_2 angehoben werden können. Somit ist es beinahe unmöglich die Besetzungsumkehr im Dauerbetrieb aufrecht

zu erhalten. Ein Beispiel für einen Drei-Niveau-Laser stellt der Rubinlaser dar. Das beschriebene Energieschema mit der Besetzungszahl der Energieniveaus eines Drei-Niveau-Lasers ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

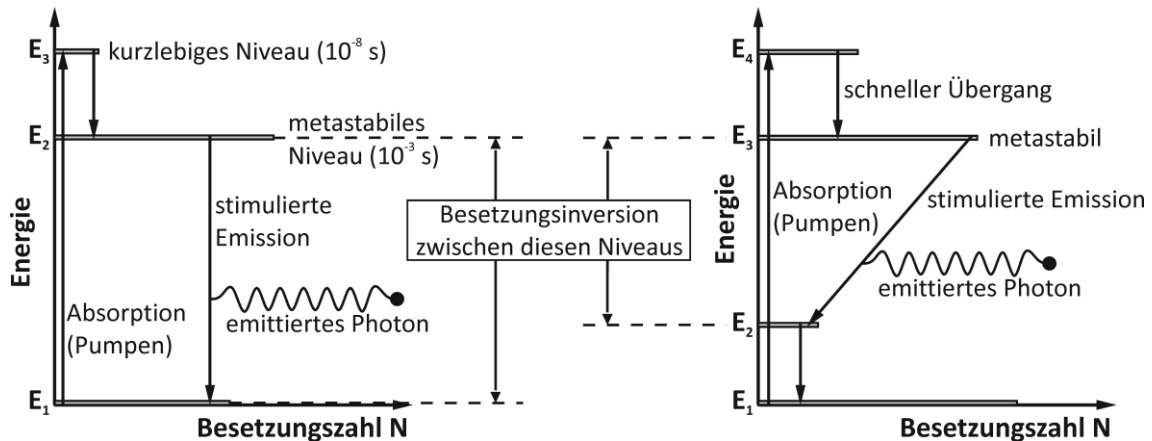


Abbildung 2.3: Energieschema mit der jeweiligen Besetzungszahl der Energieniveaus eines Drei- (links) bzw. Vier-Niveau-Lasers (rechts)

Bei einem Vier-Niveau-System wird durch Pumpen eine Anregung aus dem Grundzustand E_1 in das angeregte Niveau E_4 erreicht, welches sich schnell in Richtung E_3 entleert. Die stimulierte Emission von Photonen findet beim Übergang von E_3 zu E_2 statt. Anschließend gehen die Atome wieder in den Grundzustand E_1 über. Solche Vier-Niveau-Laser können auch dauerhaft betrieben werden, wenn die Lebensdauer von E_2 kurz genug ist. Der Helium-Neon-Laser (HeNe-Laser) ist ein Beispiel für ein Vier-Niveau-System [25].

Die Pumpquelle führt dem Lasermedium Energie zu. Dies kann optisch, elektrisch oder chemisch erfolgen. Gaslaser (HeNe, Ar-Ion) nutzen in der Regel eine elektrische Entladung mittels Gleichstrom, während bei chemischen Lasern die Besetzungsumkehr durch eine schnelle chemische

Reaktion erreicht wird. Optisches Pumpen findet meistens bei Festkörperlasern (Rubin, Nd:YAG) durch einen hochenergetischen Xenonblitz oder einen zweiten Laser bzw. eine Laserdiode (grüne diodengepumpte und frequenzverdoppelte Festkörperlaser) statt. Halbleiterlaser (Laserdioden) werden meist mittels Gleichstrom gepumpt [26].

Der Resonator ist in den meisten Fällen ein Fabry-Pérot-Interferometer, welches aus zwei an den Enden des zylinderförmigen Lasermediums angebrachten Spiegeln besteht. Die emittierten Photonen werden infolge der Reflexion zwischen den Spiegeln in Form einer stehenden Welle hin und her reflektiert. Dabei werden weitere Atome zur induzierten Emission angeregt und die Strahlung immer weiter verstärkt. Da einer der beiden Spiegel teildurchlässig ist, kann der Laserstrahl bei Erreichen eines Schwellenwertes das Lasermedium auf dieser Seite verlassen. Die Spiegelflächen des Resonators können entweder perfekt planparallel oder leicht konkav geformt sein. [27]

Die besonderen Eigenschaften der Laserstrahlung sind ihre Monochromasie (fast nur eine Wellenlänge), Kohärenz (alle Lichtwellen sind in Phase) und Parallelität. Die Besonderheit der bei der stimulierten Emission entstehenden Photonen ist, dass sie die gleiche Wellenlänge, Phase und Richtung wie das auslösende Photon aufweisen, was bereits von EINSTEIN postuliert wurde. Die Parallelität der emittierten Laserstrahlung wird auf technischem Wege erreicht, da nur Photonen, welche sich längs zum Resonator bewegen, oft genug reflektiert werden

um eine Kettenreaktion durch induzierte Emission und so einen außerordentlich intensiven Lichtimpuls auszulösen [28, 29].

2.4 Laserdioden

Laserdioden sind heute schon die am häufigsten benutzten Laser. Die Vorteile von Laserdioden sind ihre Kompaktheit, ihre geringen Herstellungskosten, ihre Modulierbarkeit und ihr guter Wirkungsgrad verbunden mit einer einfachen Stromversorgung. Sie werden mittlerweile in vielen Bereichen eingesetzt, wie in optischen Laufwerken, Laserdruckern, bei der Nachrichtenübertragung und zum optischen Pumpen anderer Laser [30].

Obwohl der Laserdiodenchip (das Licht emittierende Bauteil) mikroskopisch klein ist ($125\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$), besteht er aus vielen unterschiedlichen Halbleiterschichten mit aufeinander abgestimmter Zusammensetzung. Die Besetzungsinversion der Laserdiode wird durch den Betrieb der Diode in Durchlassrichtung erreicht. Sobald eine Elektronen-Loch-Rekombination stattfindet, wird die freiwerdende Energie als Photon emittiert. Bei ausreichend Elektronen-Lochpaaren und einer als Resonator ausgebildeten Übergangszone ergibt sich die lasertypische stimulierte Emission. Dieser Vorgang ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

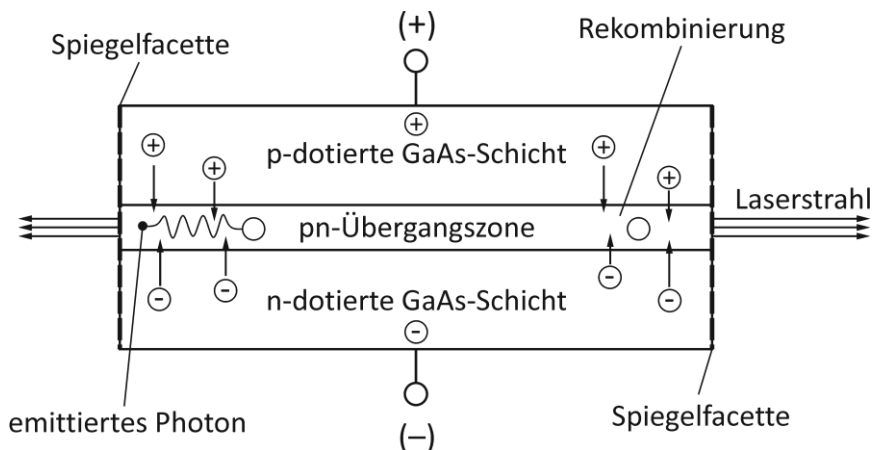


Abbildung 2.4: Seitliche Ansicht der Übergangszone einer GaAs-Laserdiode

Entscheidend für die Wahl der Halbleiter ist, dass bei der Elektronen-Loch-Rekombination die Energie als Photon (direkter Übergang) und nicht als Gitterschwingung freigegeben wird (indirekter Übergang). Es eignen sich besonders Mischungen der Elemente aus der III. und V. Hauptgruppe wie GaAs für die Herstellung von Laserdioden und LEDs, da ihre Bandlücke hinreichend groß für die Photonenemission ist [31].

2.5 Fluoreszenz

Absorption von kurzwelligem Licht und anschließende Emission von längerwelligem Licht wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die meisten Fluorophore weisen eine starre planare Anordnung einer aromatischen Ringstruktur mit delokalisierten π -Elektronen und einer dadurch eingeschränkten Schwingungsfreiheit auf. Diese Elektronen können leicht durch die Absorption eines Photons einen angeregten Singulettzustand (S_1) erreichen. Durch die Schwingungsanregung, welche sehr schnell relaxiert (10^{-12} - 10^{-10} s), wird Licht ausschließlich aus dem

Schwingungsgrundniveau des angeregten elektronischen Zustands emittiert. Aufgrund der üblicherweise starren Molekülstruktur ist die Desaktivierung von S_1 nach S_0 durch Strahlungsemission (Fluoreszenz) gegenüber der Schwingungsrelaxation (thermische Energiedissipation) bevorzugt. Das nach 10^{-9} bis 10^{-6} s emittierte Fluoreszenzlicht ist energieärmer und besitzt demnach eine um etwa 20-50 nm größere Wellenlänge. Diese Differenz der Wellenlänge zwischen absorbierter und emittierter Strahlung wird *Stokes-Shift* bezeichnet [10, 32, 33]. Eine vereinfachte Darstellung der elektronischen Übergänge der Fluoreszenzstrahlung ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

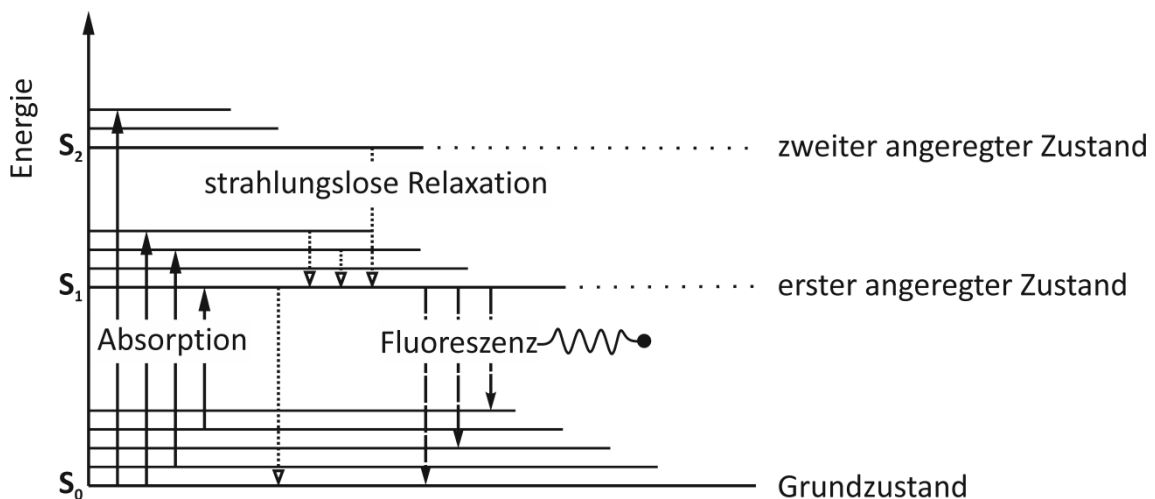


Abbildung 2.5: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm der elektronischen Übergänge der Fluoreszenzstrahlung

Die Elektronen können aus dem angeregten Zustand S_1 auch ohne Lichtemission in den Grundzustand S_0 zurückkehren. Die Energie wird dabei intramolekular oder über Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel umgewandelt. Ebenso kann die Anwesenheit von sogenannten *Quenchern* die Fluoreszenz auslöschen. Ein sehr effektiver *Quencher* vor allem bei

organischen Fluorophoren ist molekularer Sauerstoff (O_2) aufgrund seines ungewöhnlichen Triplettgrundzustands. Auf diesem Effekt beruht zum Beispiel das Verfahren zur Überwachung der Sauerstoffkonzentration in der Luft [34].

Eine wichtige Größe zur Beschreibung der Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren ist die Quantenausbeute. Diese entspricht der Wahrscheinlichkeit mit der die Anregung eines Moleküls tatsächlich zur Emission eines Photons führt. Wenn für jedes absorbierte Photon eines emittiert wird, ist die Quantenausbeute eins (100 %), was jedoch nur von wenigen Molekülen annähernd erreicht wird.

Fluoreszierende Substanzen haben ein breites Anwendungsspektrum, sie werden zum Beispiel als Marker (Fluoreszenzlabel) für Biomoleküle eingesetzt oder als Lasermedium in Flüssig- bzw. Farbstofflasern. Viele blaue Fluorophore mit einer Emission zwischen 400 und 500 nm werden als optische Aufheller in Waschmitteln, Papier oder Natur- sowie Kunstfasern verwendet, um eine strahlend weiße Farbe zu erhalten. Dafür werden von etwa 50 verschiedenen Fluorophoren über 35000 t/a produziert [35, 36].

2.6 Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion

Die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF) ist die empfindlichste Detektionsmethode für die CE und andere mikroanalytische Systeme [1, 7,

8]. Dies gilt insbesondere im Vergleich zur UV/Vis-Detektion, da im Gegensatz dazu die Messung des Fluoreszenzlichts beinahe ohne Hintergrundstrahlung stattfinden kann [9]. Problematisch bei der UV/Vis-Detektion ist außerdem die Kapillargeometrie, welche bei der *on-column*-Detektion auch als Küvette fungiert [37, 38]. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Absorption direkt proportional zur optischen Schichtdicke, welche im Fall einer 50 µm CE-Kapillare nur 1/200 im Vergleich zu einer HPLC-Durchflusszelle beträgt. Durch den Einsatz spezieller Detektionszellen [39-43] können mit LIF-Systemen wenige oder gar einzelne Moleküle nachgewiesen werden [44-46].

In klassischen Fluoreszenzdetektoren werden als Anregungsquellen Xenonlampen benutzt. Diese sind im Vergleich zu den meisten Lasern preiswerter und emittieren über das gesamte sichtbare Spektrum. Jedoch können besonders hohe Anregungsenergien nur mit Laserlicht erreicht werden. Durch die lineare Proportionalität [10] von Anregungsenergie und Fluoreszenzintensität bis hin zur Sättigungskonzentration können so äußerst niedrige Nachweisgrenzen erzielt werden [47, 48]. Die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion ist mit dem gut fokussierbaren Laserstrahl hervorragend für die Kapillarelektrophorese geeignet. Nachteilig ist jedoch die normalerweise nicht vorhandene Durchstimbarkeit des Lasers, sodass die Anregungswellenlänge fest vorgegeben ist [7, 49]. Die meisten Systeme zur Fluoreszenzdetektion bestehen aus den drei folgenden Elementen: Anregungsquelle, Linsensystem zur Bündelung des Lichts und Detektionseinheit.

Bei der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion ist die Wahl des Lasers anwendungsspezifisch. Kontinuierlich strahlende Laser sind allgemein besser geeignet, da ihre Lichtintensität stabiler ist und sie besser fokussiert werden können. Im Allgemeinen wird ein Anregungsbereich von 350 bis 650 nm verwendet, da für diese Wellenlängen die meisten Laser verfügbar sind und die Effizienz der Photomultiplier (PMT) im sichtbaren Spektrum am größten ist [50-52]. In diesem Bereich sind Gaslaser mit Leistungen von einigen Milliwatt bis mehr als 1 W am Häufigsten vertreten: HeCd-Laser (325 nm, 442 nm), HeNe-Laser (543,6 nm, 592,6 nm, 633 nm), KrF-Excimerlaser (248 nm), Nd:YAG-Laser (266 nm) und Argonionen-Laser (488 nm, 514 nm) [51]. Allerdings werden auch Diodenlaser verstärkt eingesetzt, da sie günstiger, kompakter und mit einer Lebenszeit von über 10000 h sehr stabil sind. Diodenlaser können thermoelektrisch (TE) gekühlt werden und eine Leistung von einigen Milliwatt im Dauerbetrieb aufbringen [52]. Ein Pulsbetrieb ermöglicht sogar eine zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion [53].

Zur Lichtbündelung der Anregungsquelle kommen meist Mikroskopobjektive mit einer hohen numerischen Apertur, diese beschreibt das Vermögen Licht zu fokussieren, zum Einsatz [54]. Die numerische Apertur eines Objektivs ist quadratisch proportional zu dessen Fähigkeit Licht zu bündeln und umgekehrt proportional zum Arbeitsabstand. Aufgrund des geringen Durchmessers der CE-Kapillaren von 200 bis 400 μm können Objektive mit einer hohen numerischen Apertur sowie kleinem Arbeitsabstand verwendet und auf diese Weise kann möglichst viel des emittierten Fluoreszenzlichts auf den Detektor

fokussiert werden [39, 55]. Mit dichroitischen Spiegeln, welche Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge reflektieren und Licht oberhalb dieser Grenze durchlassen, kann dasselbe Mikroskopobjektiv welches den Laserstrahl fokussiert zur Bündelung der emittierten Fluoreszenz verwendet werden [56]. Zusätzlich oder anstelle eines Mikroskopobjektivs werden zylindrische Linsen sowie Kugellinsen eingesetzt, da diese sehr kurze Brennweiten mit einer großen numerischen Apertur kombinieren. Bevor das fokussierte Fluoreszenzlicht auf den Detektor trifft wird die Streu- und Hintergrundstrahlung mit verschiedenen Filtern eliminiert [10].

Für die Detektionseinheit stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. Häufig dient ein Photomultiplier (PMT), mit welchem sehr niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden können, zur Detektion der emittierten Photonen. Des Weiteren werden einfache Photodioden oder Photodiodenarrays sowie *charge-coupled devices* (CCDs) verwendet. Um möglichst niedrige Nachweisgrenzen zu erhalten ist es wichtig das detektierte Signal zu maximieren und gleichzeitig Streulicht der Komponenten sowie die Ramanstreuung von Flüssigkeiten zu minimieren [53, 57, 58].

Obwohl die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion sich durch eine sehr gute Sensitivität sowie Selektivität auszeichnet, ist es von Nachteil, dass nur fluoreszierende Substanzen nachgewiesen werden können. Daher werden die Analyten oft mit Fluorophoren derivatisiert. Solche Derivatisierungsreagenzien sollten folgende Eigenschaften aufweisen: Eine schnelle Umsetzung mit dem Analyten, eine hohe Quantenausbeute und eine gute

Stabilität des resultierenden Addukts. Zudem sollte das Reagenz möglichst keine Fluoreszenz aufweisen, sodass nur ein geringes Hintergrundsignal resultiert. Außerdem sollte die Umsetzung hervorragend reproduzierbar sein [59-62].

Die Kombination von Kapillarelektrophorese und laserinduzierter Fluoreszenzdetektion findet bereits in der medizinischen und pharmazeutischen Analytik Verwendung [63-65]. Auch im Bereich der Mikrochip-Kapillarelektrophorese, bei welcher mit sehr kleinen Volumina gearbeitet wird, kommen die Vorteile von LIF-Systemen zum Tragen [66-68]. Insbesondere für die Analyse von Biomolekülen wie Aminosäuren, Peptiden und Proteinen werden LIF-Systeme zur Detektion eingesetzt.

So wurde von ZINELLU et al. eine Methode entwickelt um Taurin in Blutplasma mittels CE-LIF zu quantifizieren. Taurin ist eine Aminosulfonsäure sowie ein Abbauprodukt von Cystein und Methionin. Dabei wurde eine Vorsäulenderivatisierung des Taurins mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) durchgeführt und Homocystein als interner Standard eingesetzt, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit sowohl der Migrationszeiten als auch der Signalfächen erreicht wurde. Mit der entwickelten Methode wurden Blutplasma, Erfrischungsgetränke und Milch untersucht [69].

Von LEE et al. wurden mittels eines CE-LIF-Systems kinetische Studien durchgeführt. Für die Untersuchung der Sphingosinkinase und der Sphingosinphosphatase-Aktivität wurde mit Fluorescein markiertes Sphingosin verwendet. Mit dieser Methode konnten die

Michaeliskonstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) der Enzyme mit einer sehr guten Empfindlichkeit bestimmt werden. Außerdem gelang es, die Aktivität von Sphingosinkinase in lebenden Zellen zu untersuchen, da das fluoreszierende Substrat gut von diesen aufgenommen wurde [70].

Ein anderer Ansatz um den zusätzlichen Aufwand der Derivatisierung zu vermeiden, ist die direkte Detektion der nativen Fluoreszenz einiger Biomoleküle [71, 72]. Dabei werden die vorhandenen Fluoreszenzeigenschaften der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin, welche bei etwa 305 nm (Tyrosin) bzw. 355 nm (Tryptophan) ihre maximale Emissionswellenlänge aufweisen, ausgenutzt [73-75]. Insbesondere Proteine und Peptide mit einer großen Anzahl von Tyrosin und Tryptophan sind gut detektierbar. Da diese Aminosäuren im UV-Bereich von 260 bis 280 nm gut angeregt werden können, sind LIF-Systeme mit UV-Lasern wie einem Nd:YAG-Laser (266 nm) sowie eine UV-durchlässige Optik aus Quarzglas oder eine Zweiphotonenanregung notwendig [76].

Ein Nd:YAG-Festkörperlaser wurde von CHEN et al. für die Analyse von verschiedenen nativen Proteinen und Peptiden mittels CE-LIF verwendet, wobei Nachweisgrenzen von $6 \cdot 10^{-9}$ mol/L für Conalbumin und $8 \cdot 10^{-9}$ mol/L für Rinderserumalbumin (BSA) erzielt wurden [77]. Ein Vergleich der Eignung eines NeCu-Lasers (248 nm) und eines frequenzverdoppelten Argonionen-Lasers (257 nm) für die Analyse von nativen Aminosäuren wurde von ZHANG et al. durchgeführt. Bei diesem Vergleich konnten mit

dem Argonionen-Laser für alle untersuchten Aminosäuren die niedrigsten Nachweisgrenzen erzielt werden [78]. SCHULZE et al. analysierten verschiedene native Proteine mit einer mikrochipbasierten Kapillarelektrophorese. Die Anregung erfolgte mit einem Nd:YAG-Laser (266 nm) und es konnten Nachweisgrenzen knapp unterhalb des mikromolaren Bereichs für einige Proteine angegeben werden. Diese Publikationen verdeutlichen gut die Einsatzmöglichkeiten kontinuierlich betriebener UV-Laser bei der Analyse von Proteinen und Peptiden mittels CE-LIF [79].

Um die gute Empfindlichkeit eines PMT und die zusätzlichen Informationen einer wellenlängenaufgelösten Detektion zu vereinen, haben LAPAINIS et al. ein Mehrkanaldetektionssystem mit einem HeAg-Laser (224 nm) für die Analyse von Aminosäuren, Peptiden sowie Neurotransmittern entwickelt. Dabei wurde das fokussierte Fluoreszenzlicht mit drei dichroitischen Strahlteilern in drei Wellenlängenbereiche aufgeteilt (250-310 nm, 310-400 nm und >400 nm) und von jeweils einem PMT detektiert. Auf diese Weise können Analyten zusätzlich zur elektrophoretischen Mobilität auch über die Verhältnisse zwischen den einzelnen Detektionsbereichen identifiziert und die Komplexität eines wellenlängenaufgelösten Detektionssystems vermieden werden. Für die Neurotransmitter konnten Nachweisgrenzen im niedrigen nanomolaren Bereich erreicht werden [80].

2.7 CE-LIF mit wellenlängenaufgelöster Detektion

Mit der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion können sehr niedrige Nachweisgrenzen erreicht werden (Abschnitt 2.6). Allerdings werden dabei nur wenige Informationen abgesehen von der Migrationszeit gewonnen. Unter Einbeziehung multidimensionaler Daten, erhalten mittels wellenlängen- oder zeitaufgelöster [81, 82] Detektion, können Analyten oftmals zweifelsfrei identifiziert und unterschieden werden. Die Kombination von CE mit wellenlängenaufgelöster Fluoreszenzdetektion liefert sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über die Analytmoleküle [83]. Dies ist besonders interessant, um Abweichungen der Migrationszeiten oder mögliche Komigrationen ausschließen zu können [72, 84, 85].

Der instrumentelle Aufbau weicht lediglich beim Detektor von einer gewöhnlichen laserinduzierten Fluoreszenzdetektion ab. Die wellenlängenaufgelöste Detektion ermöglicht es, einzelne spektrale Bereiche mit Filtern, Gittern oder Prismen getrennt zu betrachten. Alternativ können Detektoren verwendet werden, die einen großen spektralen Bereich simultan erfassen, wie Photodiodenarrays (PDAs) oder CCDs. Dabei ist die Leistungsfähigkeit des gesamten Detektionssystems jedoch stark von diesen abhängig. Thermoelektrisch gekühlte CCDs zeichnen sich durch einen niedrigen Dunkelstrom, hohe Quanteneffizienz und einen großen dynamischen Bereich aus [86-88]. Allerdings sind CCDs im roten bzw. infraroten Spektralbereich am empfindlichsten, daher wird bei nativer Fluoreszenzdetektion diese in den roten Bereich verschoben,

zum Beispiel mit phosphorbeschichteten Filtern [55]. Empfindlicher im Vergleich zu PDAs sind die sogenannten IPDAs (*intensified PDA*), diese sind mit einem Photonenverstärker ausgestattet und erreichen so eine 3000- bis 9000-fach bessere Empfindlichkeit bei geringerer Hintergrundstrahlung [89, 90]. Da CCDs im Vergleich zu PDAs ein sehr geringes Grundrauschen und einen niedrigen Dunkelstrom aufweisen, werden diese in der Regel ohne zusätzliche Verstärkung (*intensification*) eingesetzt [87, 88]. Die Vorteile von IPDAs liegen darin, dass sie eine höhere zeitliche Auflösung erreichen können, wohingegen bei der wellenlängenaufgelösten Detektion die Auslesegeschwindigkeit eine eher untergeordnete Rolle spielt [91].

Eines der ersten CE-LIF-Systeme mit einer wellenlängenaufgelösten Detektion wurde 1995 von TIMPERMAN et al. entwickelt und publiziert. Als Anregungsquelle verwendeten sie einen ArKr-Laser, der eine gute Flexibilität bezüglich der Anregungswellenlänge lieferte. Der Laserstrahl wurde mit Hilfe einer zylindrischen Linse auf die Kapillare fokussiert und die emittierte Fluoreszenz im 90° Winkel detektiert. Die Rayleighstreuung, welche durch die Detektion direkt in der Kapillare resultierte, wurde mit Filtern eliminiert. Als Detektor wurde ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter CCD (1024 x 256 Pixel, 3 Hz Auslesegeschwindigkeit) eingesetzt. Eine Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-13}$ mol/L konnte dabei als Nachweisgrenze für Fluorescein angegeben werden [58].

Um auf Aufkonzentrierungs- und Extraktionsschritte, die bei bisherigen Methoden zur Analyse von Tramadol notwendig waren, verzichten zu

können, entwickelten SOETEBEER et al. die erste extraktionsfreie Methode zur Bestimmung von Tramadol in Urin. Tramadol ist ein synthetisches Opioid und wird zur Behandlung mäßig starker bis starker Schmerzen verwendet. Als Anregungsquelle wurde ein frequenzverdoppelter Argonionen-Laser (257 nm, 200 mW) eingesetzt, welcher mit einer zylindrischen Linse (Brennweite $f=40$ mm) auf die Kapillare fokussiert wurde. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einem sphärischen Aluminiumspiegel (Durchmesser $d=5$ cm) im 90° Winkel auf den iCCD (*intensified* CCD, 4,5 Hz Ausleserate) zur wellenlängenaufgelösten Detektion gelenkt. Die Nachweisgrenze wurde mit $3,8 \cdot 10^{-9}$ mol/L angegeben und war im Vergleich zu einem UV/Vis-Detektor etwa um den Faktor 1000 besser [92].

Für die Analyse von Umweltproben sind besonders niedrige Nachweisgrenzen notwendig. So entwickelten Kok et al. eine CE-LIF-Methode zur Untersuchung von Naphthalensulfonaten bzw. deren Metabolite in Flusswasser, welche durch die Farbstoffherstellung in die Umwelt gelangen [93]. Aufgrund der starken Abhängigkeit der Fluoreszenzemission dieser Analyten vom Substitutionsmuster können über die Fluoreszenzspektren direkt Strukturinformationen gewonnen werden. Die Anregung wurde mit einem frequenzverdoppelten Farbstofflaser (10 mW) bei 280 nm (Rhodamin 6G) oder bei 325 nm (Rhodamin B) durchgeführt und über eine Quarzlinse (Brennweite $f=3$ cm) fokussiert. Die Fluoreszenz wurde nach Bündelung mittels eines Mikroskopobjektivs (numerische Apertur $NA=0,6$) mit einem *intensified* DAD detektiert. Zur Aufkonzentrierung der Proben und

Entfernung der Matrix wurde vor der Analyse eine Festphasenextraktion durchgeführt. Mit dieser Methode konnten Nachweisgrenzen von 0,4 bis 10 µg/L für die untersuchten Naphthalensulfonate erzielt werden [94].

Eines der seltenen Beispiele von nativer Fluoreszenzdetektion in der Mizellaren elektrokinetischen Chromatographie wurde von BEEKMAN et al. publiziert. BEEKMAN et al. entwickelten eine Methode zur Analyse von Isoflavonoiden insbesondere des Formononetins in rotem Klee nach vorheriger Festphasenextraktion. Zur Anregung wurde die Wellenlänge 275 nm eines Argonionen-Lasers (120 mW) genutzt und mittels einer Quarzlinse ($f=3$ cm) fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wurde mit einem Mikroskopobjektiv ($NA=0,4$) gesammelt und mit einem *intensified* DAD (1 Hz Ausleserate) detektiert. Als Nachweisgrenzen konnten 0,1 bzw. 0,4 µmol/L für Standardlösungen und $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L für das extrahierte Formononetin erreicht werden. Der lineare dynamische Bereich wurde mit drei Dekaden angegeben [95].

HUHN et al. bestimmten Tryptaminderivate in Ecstasytabletten. Dazu wurden sowohl eine HPLC-UV- als auch eine CE-LIF-Methode entwickelt. Als Anregungsquelle der LIF-Detektion wurde ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser eingesetzt und die Fluoreszenz oberhalb von 337 nm detektiert. Die Bestimmung der Psychopharmaka gelang mit beiden komplementären Trenntechniken in guter Übereinstimmung, wobei die Nachweisgrenzen der CE-LIF-Methode niedriger waren. Durch die Aufstockung (*stacking*) der Probe wurde eine Nachweisgrenze von 5,3 nmol/L für Tryptamin erreicht [96].

Kapitel 3

Ausgangspunkt der Entwicklung eines kompakten CE-LIF-Systems

3.1 CE-LIF mit einem Mikroskop als fokussierendes Element

3.1.1 Einleitung (Oyster[®]-488 und β -Lactoglobulin A)

Um die Anwendungsmöglichkeiten des im Haus vorhandenen CE-LIF-Systems zu prüfen, wurde eine elektrophoretische Proteintrennung gewählt. Dazu wurde das Molkenprotein β -Lactoglobulin A (β -LGA) umgesetzt mit einem Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieses Protein kommt hauptsächlich bei Wiederkäuern, aber auch bei anderen Säugetieren vor, nicht jedoch beim Menschen. Es wurde zur Derivatisierung mit Oyster[®]-488 verwendet, weil es sich mit 162 Aminosäuren und einer Masse von 18,4 kDa um ein kleines Protein mit einer einfachen Struktur handelt [97].

Oyster[®]-488 ist ein Derivatisierungsreagenz der Firma Luminartis. Da nur wenige Analyten eine native Fluoreszenz zeigen, welche bei 473 nm angeregt wird, wurde auf die Derivatisierung mittels eines kommerziell erhältlichen Reagenzes zurückgegriffen. Das Anregungs- und Emissionsspektrum von Oyster[®]-488 in Wasser ist in Abbildung 3.1 zu sehen.

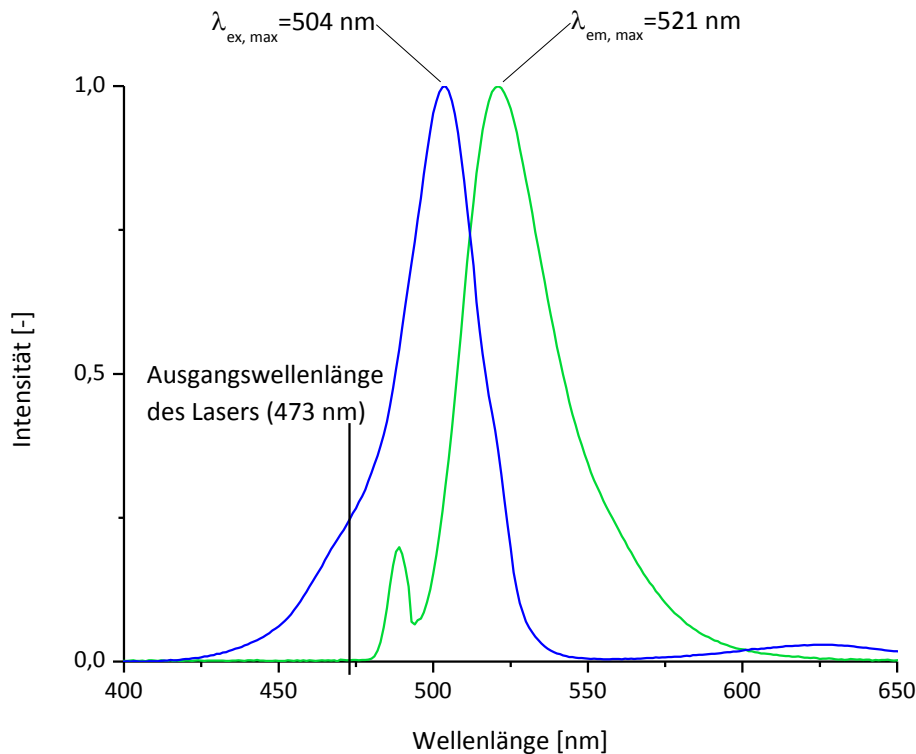


Abbildung 3.1: Normiertes Anregungs- und Emissionsspektrum von Oyster®-488

Das Reagenz weist eine maximale Anregungswellenlänge ($\lambda_{ex, max}$) von 504 nm auf, womit es nah an der Ausgangswellenlänge des verwendeten Lasers von 473 nm liegt und eine hinreichend gute Anregung erfolgen kann. Die maximale Emissionswellenlänge ($\lambda_{em, max}$) liegt bei 521 nm. Oyster®-488 ist ein auf Rhodaminen basierender Farbstoff, wodurch er laut Herstellerangaben eine ausgezeichnete Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität aufweist. Es ist somit ein kommerziell erhältliches Derivatisierungsreagenz, welches eingesetzt werden kann, um auch Analyten detektieren zu können, die keine Fluoreszenz aufweisen bzw. deren Anregungswellenlänge nicht bei 473 nm liegt.

Da der Hersteller nur die ungefähre Masse des Derivatisierungsreagenzes mit $\sim 1050 \text{ g/mol}$ angibt, wurde zunächst dessen exakte Masse bestimmt.

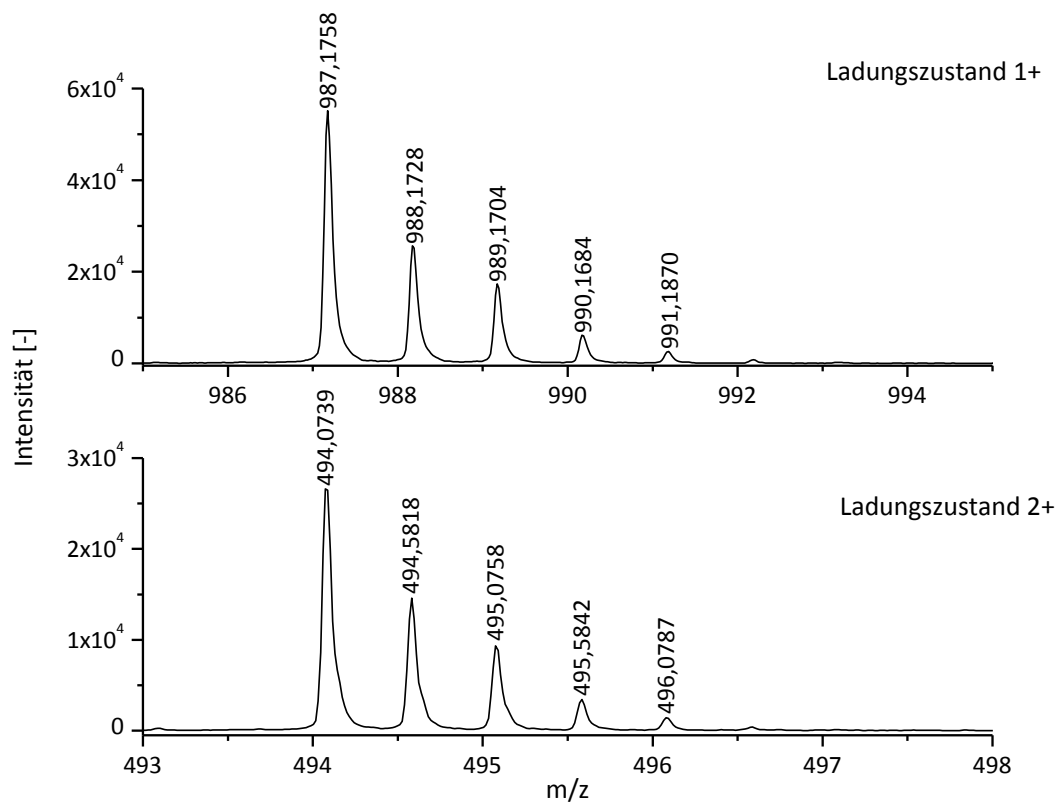


Abbildung 3.2: Massenspektrum von Oyster®-488 für die beiden Ladungszustände 1+ und 2+

Die exakte Masse von Oyster®-488 beträgt 987,1758 u. Mit dieser Information können gebildete Addukte mittels massenspektrometrischer Untersuchung identifiziert werden.

3.1.2 Instrumenteller Aufbau

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Detektionssystems für die laserinduzierte Fluoreszenz wurde ein bereits bestehendes System auf der Basis eines Mikroskops genutzt. Der Aufbau ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

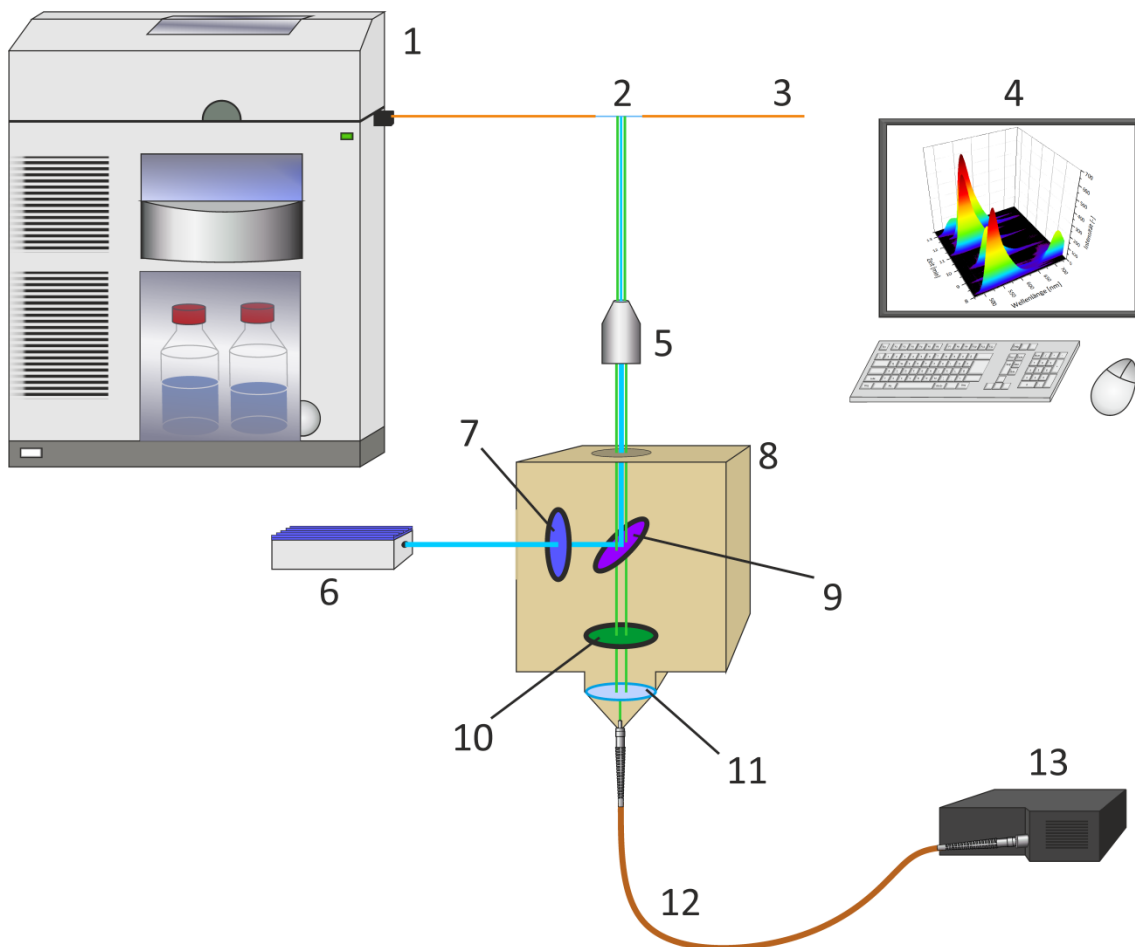


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des CE-LIF-Systems auf Mikroskopbasis: 1 Kapillarelektrophorese, 2 Detektionsfenster, 3 Kapillare, 4 Steuerungs- und Auswertungseinheit, 5 Objektiv, 6 Laser, 7 Anregungsfilter, 8 Filterwürfel, 9 Dichroitischer Spiegel, 10 Emissionsfilter, 11 Sammellinse, 12 Glasfaser, 13 Kompaktspektrometer

Die Kapillare wurde seitlich aus der CE geführt und auf dem Mikroskoptisch eingespannt. Das Potential wurde an der Eingangsseite (*Inlet*) der Kapillare angelegt. Die Ausgangsseite (*Outlet*) tauchte in ein geerdetes und mit Pufferlösung gefülltes Gefäß. Um den Siphoneffekt zu unterbinden wurden Auslass- und Einlassgefäß auf die gleiche Höhe gebracht. Für das Detektionsfenster wurde in einem Abstand von 10 cm zum Auslassende der Kapillare die Polyimidbeschichtung entfernt.

Als Anregungsquelle wurde ein kompakter, diodengepumpter Festkörperlaser OXX-473-50-S mit einer Wellenlänge von 473 nm ($\pm 0,2$ nm) und einer optischen Ausgangsleistung von 50 mW eingesetzt. Für eine optimale und reproduzierbare Anregung ist eine genaue Einkopplung des Laserstrahls in das Mikroskop unerlässlich. Deshalb wurde der Laser auf einer eigens konstruierten Plattform mit einem präzise justierbaren Gestell montiert, welches die exakte Positionierung des Laserstrahls gewährleistet. Mit diesem Aufbau können alle Freiheitsgrade (Translation, Rotation und Neigung) mikrometergenau justiert werden.

3.1.3 Funktionsweise

Der Laserstrahl wird nach Passieren eines Filterwürfels innerhalb des Mikroskops über das Objektiv (60-fache Vergrößerung, NA=0,7) auf das Detektionsfenster der Kapillare fokussiert. Dabei wird zuerst im Filterwürfel die Hintergrundstrahlung unterhalb von 470 nm mit dem Anregungsfilter eliminiert. Anschließend wird der Laserstrahl über den dichroitischen Spiegel in einem 90° Winkel nach oben abgelenkt. Dieser Spiegel ist durchlässig für Licht mit einer Wellenlänge >500 nm. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv eingefangen, gebündelt und passiert den dichroitischen Spiegel. Als Emissionsfilter wurde ein sogenannter Bandpassfilter verwendet, der Licht der Wellenlängen <505 nm und >585 nm eliminiert. Eine am seitlichen Mikroskopausgang befindliche Sammellinse fokussiert die Fluoreszenzstrahlung in die Glasfaser des Kompaktspektrometers.

Mit diesem System wurde eine Nachweisgrenze für Rhodamin 123 von $4 \cdot 10^{-12}$ mol/L und eine Bestimmungsgrenze von $1 \cdot 10^{-11}$ mol/L erhalten. Der linear dynamische Bereich erstreckt sich auf 4,5 Dekaden von $4 \cdot 10^{-12}$ mol/L bis $1 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

3.2 Experimenteller Teil

3.2.1 Probenvorbereitung

In 2 mL eines Boratpuffers (100 mmol/L, pH=8,4) werden 2 mg β -Lactoglobulin A gelöst, dies entspricht einer Proteinkonzentration von $5,5 \cdot 10^{-5}$ mol/L. Zu dieser Lösung werden 0,3 mg Oyster[®]-488 gegeben, was einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L entspricht. Es wurde der Tetrafluorophenylester (TFP) verwendet, dieser bildet eine stabile Bindung mit Aminogruppen. Nach einstündiger Reaktion bei Raumtemperatur wird die Lösung mittels CE-LIF und HPLC/ESI-ToF-MS analysiert. Die Ausgangslösung des umgesetzten Proteins wurde um den Faktor 550 auf eine Proteinkonzentration von 10^{-7} mol/L für die CE-LIF-Messungen verdünnt.

Als Elektrolytlösung wurde ein 100 mmol/L Boratpuffer mit einem pH-Wert von 8,4 genutzt. Die Herstellung des Puffers erfolgte durch Lösen von 50 mmol (3,1 g) Borsäure in 500 mL Wasser und Einstellen des pH-Wertes mit wässriger Ammoniaklösung (1 mol/L).

3.2.2 Massenspektren von Oyster[®]-488

Die exakte Masse des Oyster[®]-488 wurde mittels ESI-ToF-MS bestimmt. Dazu wurde eine Oyster[®]-488-Lösung (10^{-4} mol/L) mittels einer Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 5 μ L/min in das *ESI-Interface* des MS eingetragen. Die verwendeten MS-Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

3.2.3 CE- und Spektrometereinstellungen

Für die kapillarelektrophoretische Trennung wurden folgende Parameter verwendet:

Die Injektionszeit betrug 5 s bei einem Injektionsdruck von 50 mbar, dies entspricht 250 mbar·s. Die verwendete Kapillare hatte eine Länge von 65 cm (effektiv 50 cm) und einen inneren Durchmesser von 75 μ m. Es wurde eine Spannung von 30 kV mit einem resultierenden Strom von etwa 39 μ A angelegt. Als Messwellenlänge wurde 521 nm mit einer Bandbreite von 10 Pixeln gewählt. Der CCD-Chip wurde über den TE-Kühler auf -15 °C gekühlt. Die Integrationszeit des Spektrometers betrug 300 ms. Als Elektrolytlösung wurde ein Boratpuffer (100 mmol/L, pH=8,4, Herstellung s. Abschnitt 3.2.1) genutzt.

Vor Beginn der Messungen wurde die Kapillare durch Spülen mit Natronlauge (1 mol/L, 5 min) und Boratpuffer (15 min) konditioniert. Nach jeder Trennung wurde die Kapillare mit Natronlauge (0,1 mol/L, 1 min) und anschließend drei Minuten mit Pufferlösung gespült.

3.2.4 HPLC- und MS-Parameter

Die ToF-MS-Parameter für die Detektion von β -Lactoglobulin A und dessen Addukte sowie für die Aufnahme der Massenspektren des Oyster[®]-488 sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: ESI-ToF-MS-Parameter für die Detektion von β -Lactoglobulin A und Oyster[®]-488 (Die englischen Bezeichnungen der MS-Software wurden übernommen)

Ion Polarity	Positive
End Plate Offset	-400 V
Capillary	4200 V
Nebulizer	1,3 bar
Dry Gas	9,0 L/min
Dry Temp	200 °C
Capillary Exit	150,0 V
Hexapole 1	23,0 V
Hexapole 2	21,4 V
Transfer Time	89,0 μ s
Skimmer 1	50,0 V
Skimmer 2	26,5 V
Hexapole RF	500,0 Vpp
Pre Puls Storage	13,0 μ s
Lens 1 Extraction	30,0 V
Lens 2	7,4 V
Lens 3	-21,0 V
Lens 4	0,3 V
Lens 5	-27,5 V
Mass Range	m/z 50-3000

Die Parameter für die flüssigchromatographische Trennung sind in Tabelle 3.2 bzw. Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Parameter der HPLC-Trennung von β -Lactoglobulin A

Säule	Supelco Discovery [®] Bio Wide Pore C5 150 mm x 2,1 mm, 5 μ m
Wässrige mobile Phase	Ameisensäure (0,1 % in Wasser)
Organische mobile Phase	Acetonitril
Flussrate	300 μ L/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Injektionsvolumen	10 μ L

Tabelle 3.3: Gradient der Trennung von β -Lactoglobulin A

Zeit [min]	0	4	19	22	25	30
AcN [%]	5	5	80	80	5	5

3.2.5 Chemikalien

Tabelle 3.4: Verwendete Chemikalien mit Reinheit, CAS-Nummer und Hersteller

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nr.	Hersteller/Vertrieb
Acetonitril	$\geq 99,9$ %	75-05-8	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Ameisensäure	p.a.	64-18-6	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Ammoniak	25 %	1336-21-6	Merck, Darmstadt
Borsäure	$\geq 99,5$ %	10043-35-3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	>98 %	1310-73-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oyster [®] -488	- / -	- / -	Luminartis, Münster
β -Lactoglobulin A	>90 %	50863-92-8	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2.6 Geräte

Tabelle 3.5: Verwendete Geräte und deren Hersteller bzw. Vertrieb

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	TE214S	Sartorius, Göttingen
Autosampler	Alexys AS100	Antec Leyden, Zoeterwoude (NL)
Controller	Alexys AC100	Antec Leyden, Zoeterwoude (NL)
DPSS Laser	OXX-473-50-S	Laser 2000, München
ESI-ToF-MS	micrOTOF	Bruker Daltonics®, Bremen
Fluoreszenzspektrometer	RF-5301	Shimadzu, Duisburg
Hubkolbenpipette	Reference®	Eppendorf, Hamburg
Kapillare	TSP 075 375	Polymicro, Phoenix (USA)
Kapillarelektrophorese	G1600	Agilent, Waldbronn
LC-Pumpen	Alexys LC100	Antec Leyden, Zoeterwoude (NL)
Mikroskop	IX 71	Olympus Europa, Hamburg
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Dülmen
Säulenofen	Alexys Decade II	Antec Leyden, Zoeterwoude (NL)
Spektrometer	QE65000	Ocean Optics, Ostfildern
Spritzenpumpe	Model 74900	Cole Parmer, Vernon Hills (USA)

3.3 Auswertung

3.3.1 Identifizierung von Oyster®-488-Addukten mit β -Lactoglobulin A

β -Lactoglobulin A wurde mit Oyster®-488 umgesetzt, um im Folgenden CE-LIF-Messungen des Proteins zu ermöglichen. Zur Überprüfung der Umsetzung wurde zunächst eine massenspektrometrische Untersuchung

mit vorheriger HPLC-Trennung durchgeführt. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

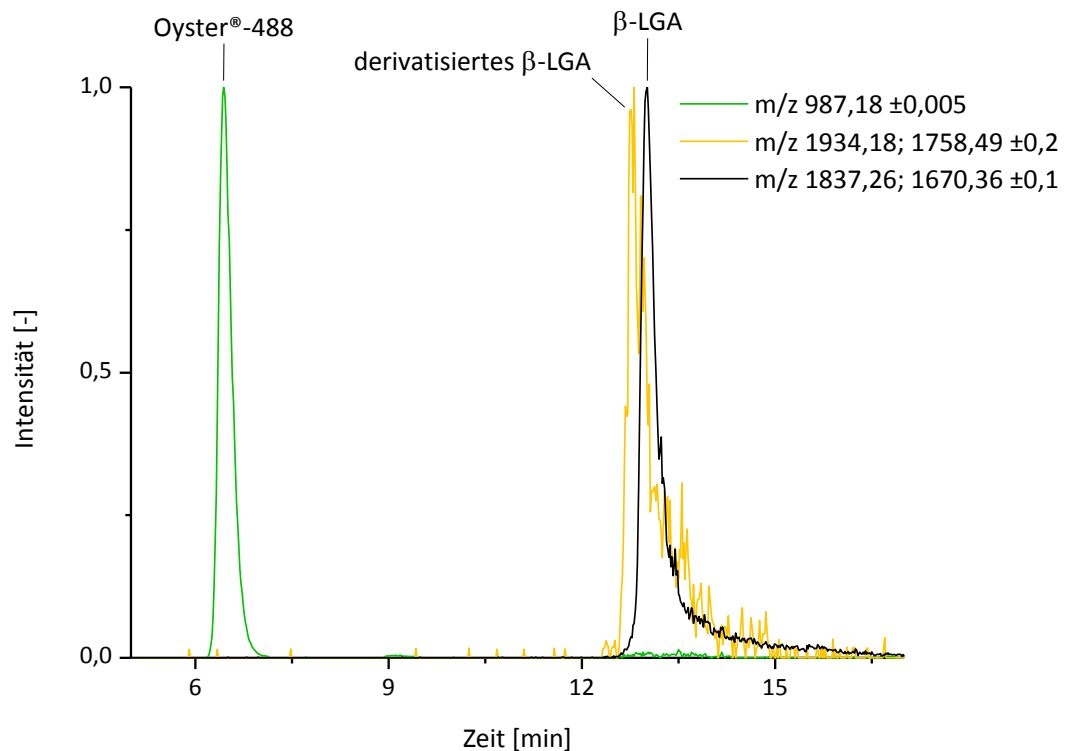


Abbildung 3.4: Normierte, extrahierte Massenbereiche von Oyster®-488 ($m/z\ 987,18 \pm 0,005$), derivatisiertem β -LGA ($m/z\ 1934,18; 1758,49 \pm 0,2$) und dem nativen β -LGA ($m/z\ 1837,26; 1670,36 \pm 0,1$)

In Abbildung 3.4 sind die normierten, extrahierten Ionenspuren von Oyster®-488, derivatisiertem β -LGA und dem nativen β -LGA gezeigt. Allerdings sind hier nur Massenspuren von zwei Ladungszuständen des Proteins aufgetragen (vgl. Abbildung 3.5). Das native β -LGA ($m/z\ 1837,26; 1670,36 \pm 0,1$) weist eine Retentionszeit von 13 min auf, wohingegen das mit Oyster®-488 derivatisierte β -LGA eine Retentionszeit von 12,7 min hat. Dies zeigt, dass das gebildete Farbstoff-Protein-Addukt eine etwas höhere Polarität als das native Protein aufweist. Allerdings reicht dieser

Unterschied nicht aus um beide Substanzen vollständig voneinander zu trennen. Jedoch ist es mit dieser Methode möglich, das Protein sowie dessen Farbstoff-Addukt vom Derivatisierungsreagenz zu trennen. Dieses weist eine Retentionszeit von 6,4 min auf.

Zur eindeutigen Identifizierung der Peaks wurden die jeweiligen Massenspektren generiert. Ein Vergleich der Massenspektren von freiem β -Lactoglobulin A und des umgesetzten Proteins ist in Abbildung 3.5 gezeigt.

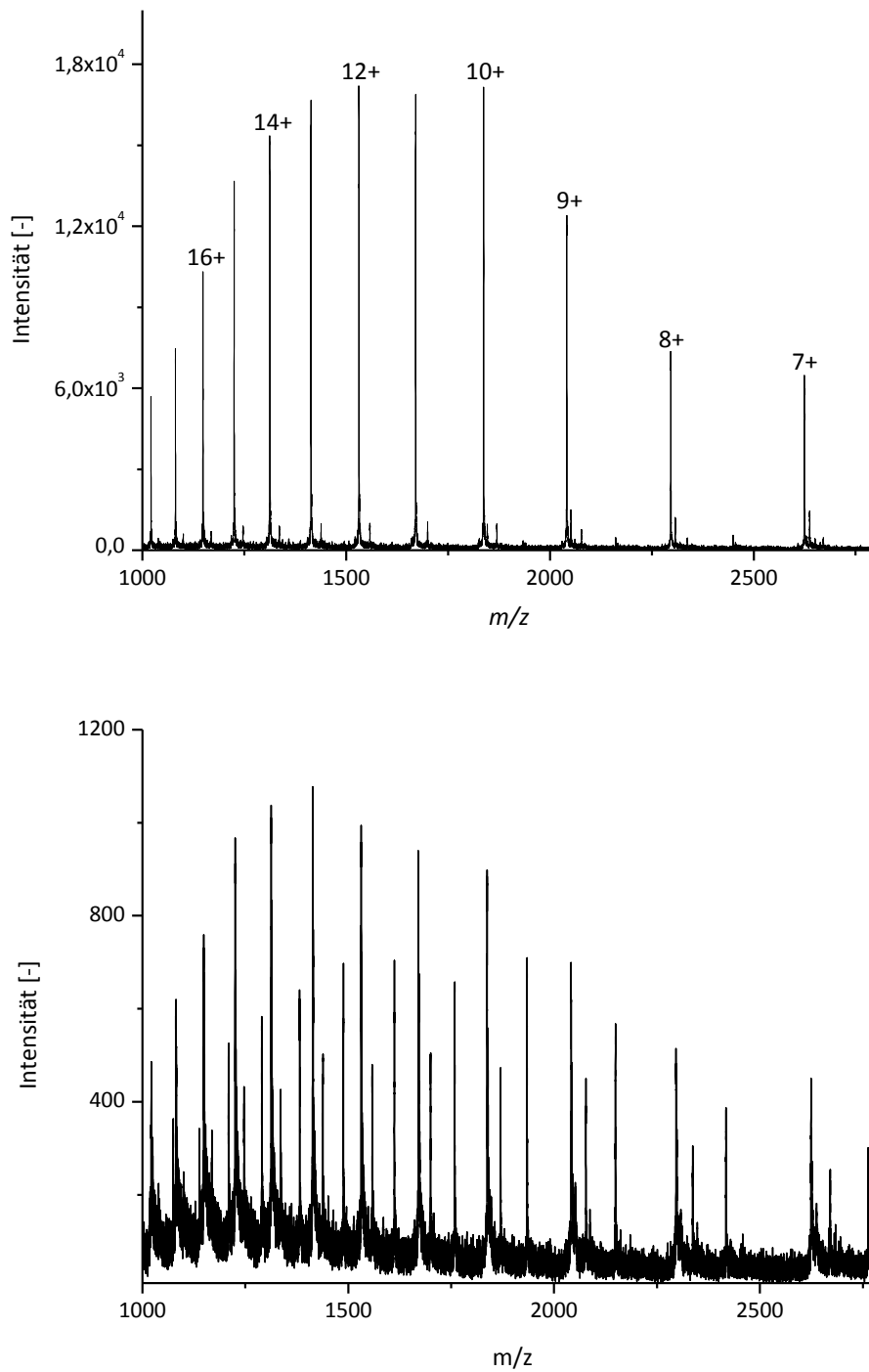


Abbildung 3.5: Massenspektrum des nativen β -Lactoglobulin A (oben) und des derivatisierten β -LGA (unten)

In Abbildung 3.5 ist in den Massenspektren die übliche Ladungsverteilung eines Proteins zu erkennen. Der Vergleich des nativen β -LGA mit dem derivatisierten zeigt außerdem, dass zusätzliche Peaks vorhanden sind. Es hat also eine Umsetzung des Proteins mit dem Markierungsreagenz stattgefunden. Zur besseren Übersicht und um neutrale Spektren mit den exakten Massen zu erhalten, wurden die beiden Massenspektren dekonvoliert. Das dekonvolierte Massenspektrum des nativen β -Lactoglobulins A ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

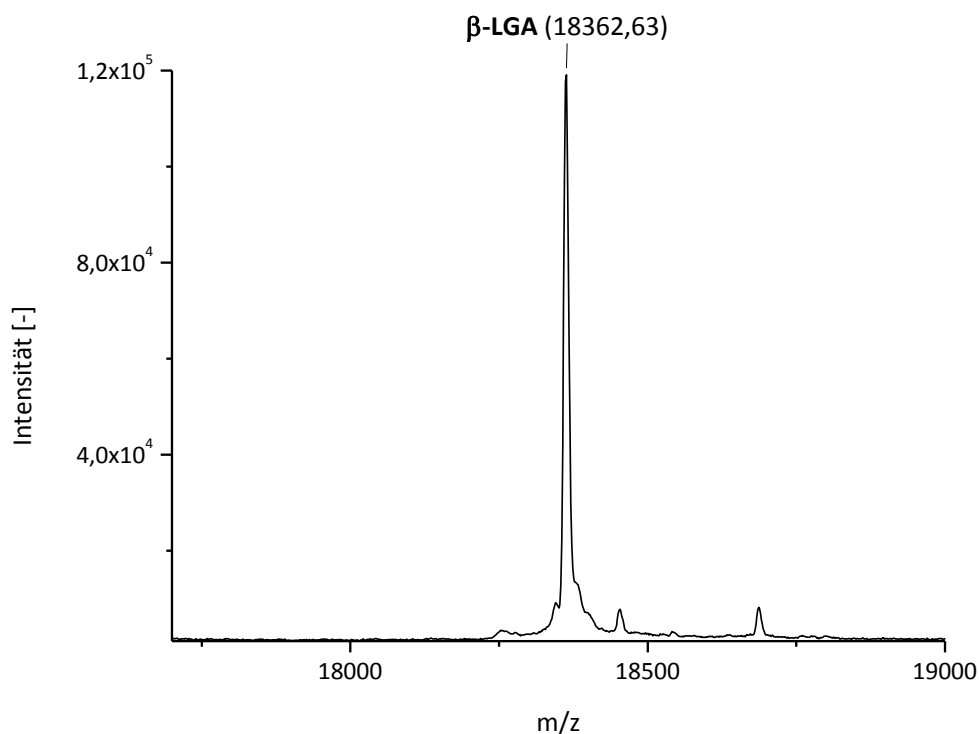


Abbildung 3.6: Massenspektrum des nativen β -Lactoglobulins A nach Dekonvolierung

Die Dekonvolierung des freien Proteins ergab eine molekulare Masse von 18362,63 u für das β -LGA, was gut mit den Literaturwerten übereinstimmt [98].

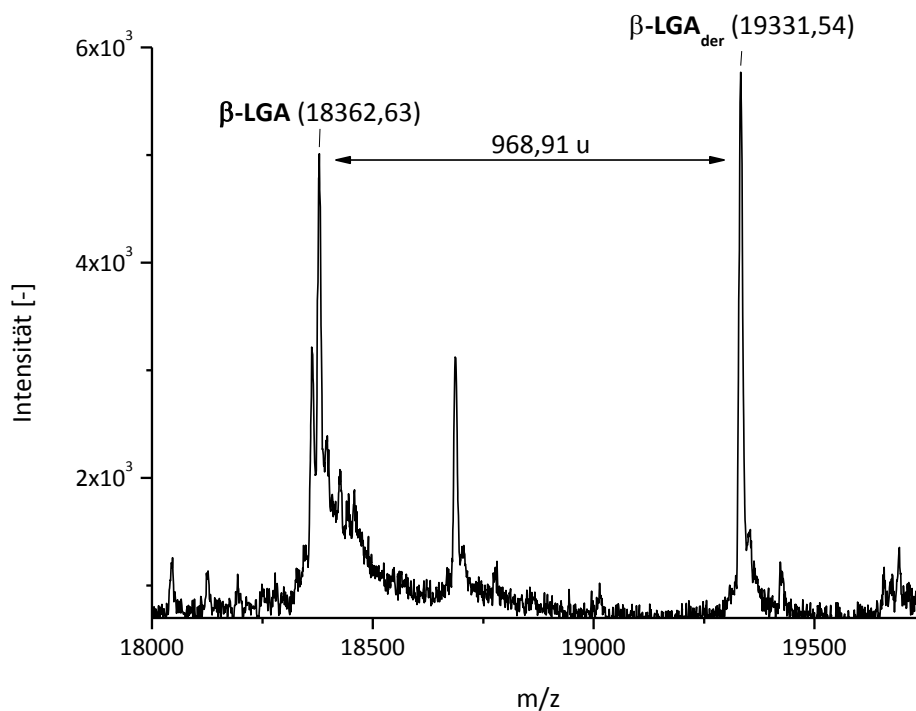


Abbildung 3.7: Massenspektrum des derivatisierten β -Lactoglobulins A nach Dekonvolierung

In dem dekonvolierten Proteinspektrum des umgesetzten β -LGA sind zwei Peaks zu beobachten. Der Peak mit der Masse 18362,63 u kann dem nativen β -Lactoglobulin A zugeordnet werden. Zudem tritt ein weiterer Peak auf mit einer Masse von 19331,54 u. Dies entspricht einem Massenzuwachs von 968,91 u. Somit ist eine Derivatisierung des β -LGA unter Abspaltung von Wasser mit Oyster[®]-488 erfolgt. Eine Wasserabspaltung erklärt den Unterschied von 18 u zur Masse des freien Derivatisierungsreagenzes, welche 987,18 u beträgt. Außerdem tritt ein dritter Peak mit der Masse 18687,52 u auf. Dieses Signal tritt auch beim nativen β -LGA (Abbildung 3.6) auf, da es sich dabei um eine Isoform des β -LGA handelt. Allerdings erscheint dieses Signal in Abbildung 3.7

verhältnismäßig groß, da die Signalintensitäten des nativen sowie des derivatisierten β -LGAs relativ gering sind.

Durch den Einsatz von HPLC/ESI-ToF-MS konnte die erfolgreiche Umsetzung von β -Lactoglobulin A mit dem Derivatisierungsreagenz Oyster[®]-488 belegt werden.

3.3.2 CE-Trennung von β -Lactoglobulin A und Oyster[®]-488

Wie mittels HPLC/ESI-ToF-MS gezeigt werden konnte ist β -Lactoglobulin A erfolgreich mit Oyster[®]-488 umgesetzt worden. Somit kann dies nun eingesetzt werden, um die Leistungsfähigkeit der CE-LIF zu verdeutlichen. Diese elektrophoretische Trennung mit dem vorhandenen CE-LIF-System auf Mikroskopbasis, welches als Ausgangspunkt für eine weitere Entwicklung dienen soll, soll auch den Nutzen eines deutlichen kompakteren und flexibleren Detektionssystems aufzeigen.

Mittels CE-LIF konnte ebenfalls eine Trennung des β -LGA vom Markierungsreagenz erfolgreich entwickelt werden. Allerdings kann hierbei nur das fluoreszierende Protein-Farbstoff-Addukt detektiert werden. In Abbildung 3.8 ist ein Elektropherogramm dieser Trennung gezeigt.

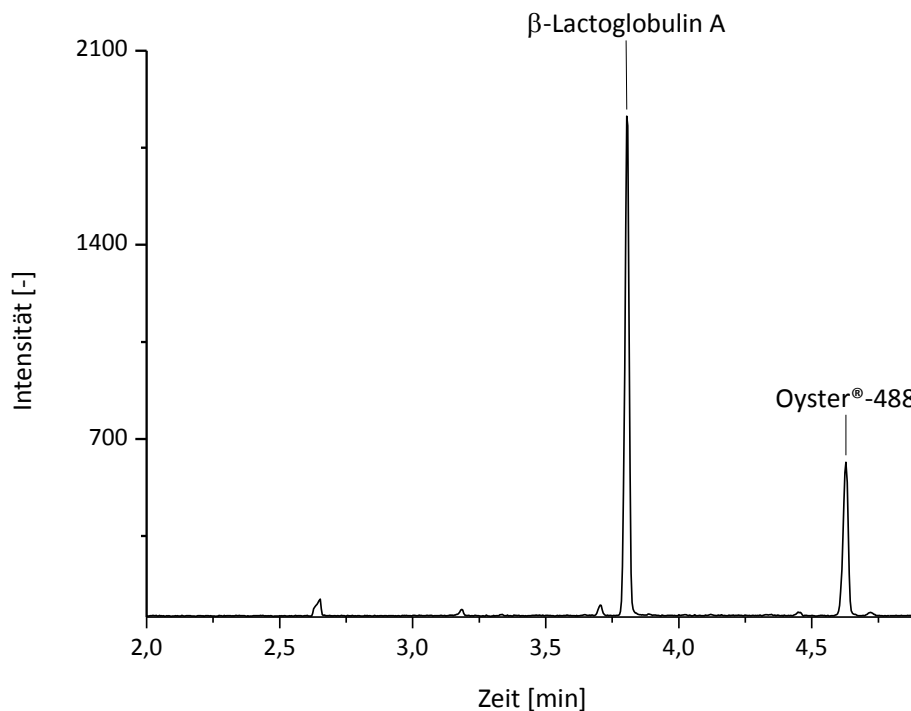


Abbildung 3.8: Elektropherogramm von mit Oyster®-488 derivatisiertem β -Lactoglobulin A (10^{-7} mol/L, $\lambda_{\text{ex}}=473$ nm, $\lambda_{\text{em}}=521$ nm)

Abbildung 3.8 zeigt ein Elektropherogramm von mit Oyster®-488 derivatisiertem β -LGA. Der erste Peak mit einer Migrationszeit von 3,8 min ist dabei das Addukt aus β -Lactoglobulin A und Oyster®-488. Der zweite Peak mit einer Migrationszeit von 4,6 min konnte dem freien Derivatisierungsreagenz zugeordnet werden. Die Identifizierung wurde über die separate Messung einer Lösung von Oyster®-488 erreicht.

3.3.3 Nachweisgrenze der LIF-Detektion

Damit die Leistungsfähigkeit für die Detektion des markierten Proteins mit anderen Systemen verglichen werden kann, wurden die Nachweisgrenzen aus dem Elektropherogramm in Abbildung 3.8 abgeschätzt. Dazu wurde

das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N, engl. *signal-to-noise ratio*) bestimmt. Als Rauschen wurde die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet. Da die Standardabweichung der Schwankung um einen Mittelwert nach oben und unten entspricht, wird auf diese Weise ein objektiver Wert für das Rauschen erhalten. Für das markierte β -Lactoglobulin A kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von >2200 angegeben werden und für Oyster[®]-488 ein Verhältnis von >16700.

Unter Verwendung der so berechneten S/N-Verhältnisse und der bekannten eingesetzten Konzentrationen kann die Nachweisgrenze abgeschätzt werden. Dazu wird üblicherweise von einem Wert von S/N = 3 ausgegangen. Die Nachweisgrenze für das derivatisierte Protein kann mit $1,3 \cdot 10^{-10}$ mol/L angegeben werden, während für das Markierungsreagenz eine Nachweisgrenze von $1,8 \cdot 10^{-11}$ mol/L erhalten wird.

3.4 Fazit und Ausblick des dritten Kapitels

Als Grundlage der Experimente mit derivatisiertem β -LGA konnten das Anregungs- sowie das Emissionsspektrum von Oyster[®]-488 aufgenommen werden. Außerdem wurde die exakte Masse des kommerziell erhältlichen Derivatisierungsreagenzes bestimmt. Die Umsetzung des Proteins mit Oyster[®]-488 wurde mittels HPLC/ESI-ToF-MS nachgewiesen, sodass eine elektrophoretische Trennung des umgesetzten β -Lactoglobulin A erfolgreich entwickelt werden konnte. Die entwickelte CE-LIF-Methode ist nicht nur deutlich sensitiver sondern mit einer Dauer von fünf Minuten deutlich kürzer als die HPLC-Methode, welche eine Länge von >18 min

aufweist. Mit LIF als Detektionssystem können Proteine nach vorheriger Umsetzung mit geeigneten Reagenzien sehr empfindlich nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze ist mit $1,3 \cdot 10^{-10}$ mol/L sehr gut.

Dessen ungeachtet ist dieses auf einem Mikroskop basierende System für die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion für einen routinemäßigen Einsatz nicht uneingeschränkt einsetzbar, da zum einen die Größe des Mikroskops der Mobilität Grenzen setzt. Zum anderen muss die Kapillare aus der CE herausgeführt werden. Da bei jeder Messung die Position des Auslassgefäßes manuell geändert werden muss, kann der integrierte Autosampler nicht verwendet und kein hoher Probendurchsatz erreicht werden. Auch muss darauf geachtet werden, dass keinerlei Verstellung des Systems durch äußere Einflüsse vorkommt, da ansonsten das Detektionssystem sehr aufwändig justiert werden muss. Des Weiteren ist die Flexibilität bezüglich der Anregungswellenlänge (λ_{ex}) sehr gering, da mit dem Laser auch der Anregungsfilter, der Emissionsfilter und der dichroitische Spiegel angepasst bzw. ausgetauscht werden müssen.

Aus diesen Gründen besteht die Notwendigkeit, das LIF-System auf Basis eines Mikroskops weiterzuentwickeln. Wichtig ist hierbei, dass das neue Detektionssystem kompakt und somit variabel einsetzbar ist. Ebenso erforderlich ist eine hohe Flexibilität bezüglich der Anregungswellenlänge, sodass der Laser und weitere optische Bauteile schnell und einfach getauscht werden können. Dennoch sollte auch das kompakte LIF-System die Vorteile einer wellenlängenaufgelösten Detektion nutzen und eine vergleichbare Nachweisstärke aufweisen.

Kapitel 4

Entwicklung eines kompakten, wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzdetektors für die Kapillarelektrophorese

4.1 Einleitung

Die ausgezeichnete Nachweisstärke der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion in Kombination mit einer kapillarelektrophoretischen Trennung konnte am Beispiel von derivatisiertem β -Lactoglobulin A aufgezeigt werden (Nachweisgrenze $1,3 \cdot 10^{-10}$ mol/L). Jedoch muss das verwendete LIF-System aufwändig eingestellt werden und durch das Herausführen der Kapillare aus der CE sind nur manuell durchgeführte Messungen möglich. Daher soll das Ersetzen des großen und sperrigen Mikroskops als fokussierendes Element primäres Ziel sein. Weiterhin soll mit einer kompakten Lösung das Detektionssystem in die Kapillarelektrophorese integriert werden, um die Nutzung des Autosamplers zu ermöglichen. Zwar gibt es kommerziell erhältliche Systeme der Firma Picometrics, die durch Einbringen eines Detektionskopfes in die Kapillarelektrophoresegeräte den integrierten Autosampler nutzen können, die Gesamtgröße dieser LIF-Systeme entspricht jedoch etwa einem Computergehäuse (Abbildung 4.1). Des Weiteren ist der Laser fest eingebaut und damit die Anregungswellenlänge nicht variabel.



Abbildung 4.1: Zwei LIF-Systeme von der Firma Picometrics: Picometrics ZETALIF Discovery™ 2.0 (links) und Picometrics ZETALIF Discovery™ (rechts) [99]

Weiteres Potential birgt die Größe des Lasers. Standardmäßig werden Argonionen- oder Nd:YAG-Laser für die LIF-Detektion eingesetzt, welche recht groß und schwer sind (einige Kilogramm). Der Einsatz eines einfachen Diodenlasers würde einen Größen- und Kostenvorteil ergeben. Diodenlaser sind bekannt durch den Einsatz in Laserpointern oder optischen Laufwerken. Durch diese Anwendungen sind die Laser nicht nur äußerst klein, sondern zusätzlich sehr kostengünstig zu erwerben, sodass eine flexible Wahl der Anregungswellenlänge möglich ist.

Die Variabilität der Laser ermöglicht zudem den Einsatz der LIF-Detektion in unterschiedlichen Gebieten. So könnte das Feld der medizinischen Fluoreszenzdetektion mit einem roten oder NIR-Laser erschlossen werden. In der Medizin werden häufig Fluoreszenzlabel verwendet, die in diesem Bereich fluoreszieren, da sich im Bereich um 650 nm ein sogenanntes biologisches Fenster befindet. Die Strahlung in diesem Bereich hat eine besonders hohe Eindringtiefe in biologisches Gewebe.

Aus diesen Gründen wurden für erste Modellstudien rote Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm und einer optischen Ausgangsleistung von 5 mW der Firma Roithner verwendet. Diese Laser zeichnen sich durch ihre Größe von lediglich 12 mm im Durchmesser und eine Länge von 29,2 mm aus. Sie besitzen außerdem einen einfachen Kollimator, der aus einer asphärischen Acryllinse mit einer Antireflektionsbeschichtung besteht. Mit diesem kann der Laser auf Entfernungen ab 10 cm gut fokussiert werden. Die Entwicklung der verschiedenen LIF-Systeme erfolgte in Zusammenarbeit mit Manfred Krause und Lino von Heynitz aus der feinmechanischen Werkstatt des Institutes für Anorganische und Analytische Chemie.

4.2 Geräte

Tabelle 4.1: Im vierten Kapitel verwendete Geräte und deren Hersteller bzw. Vertrieb

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	TE214S	Sartorius, Göttingen
Asphärische Linse I	NT83-710	Edmund Optics, Karlsruhe
Asphärische Linse II	NT83-709	Edmund Optics, Karlsruhe
Autosampler	SIL-HT	Shimadzu, Duisburg
Bikonvexe Sammellinse	LB1406	Thorlabs, Dachau
Diodenlaser (635 nm, 5 mW)	LDM 635/5LJ	Roithner, Wien (A)
Diodentreiber	EU37	Roithner, Wien (A)
Emissionsfilter (435 nm)	5CGA-435	Newport, Darmstadt
Emissionsfilter (645 nm)	5CGA-645	Newport, Darmstadt
Emissionsfilter (665 nm)	5CGA-665	Newport, Darmstadt

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Hubkolbenpipette	Reference®	Eppendorf, Hamburg
Kapillare quadratisch	WWP 075 375	Polymicro, Phoenix (USA)
Kapillare rund	TSP 075 375	Polymicro, Phoenix (USA)
Kapillarelektrophorese	G1600	Agilent, Waldbronn
Kollimatorlinse I	LEN046	Philips, Amsterdam (NL)
Kollimatorlinse II	LEN100	Philips, Amsterdam (NL)
Kollimatorlinse III	LEN183	Philips, Amsterdam (NL)
Kugellinse	NT67-385	Edmund Optics, Karlsruhe
Laserablation	LSX-213	Cetac, Omaha (USA)
Laserdiode (405 nm, 100 mW)	PHR-805T	Insaneware Deluxe, Gladbeck
Laserdiode (635 nm, 20 mW)	ADL-63201TL	Roithner, Wien (A)
Laserdiode (635 nm, 35 mW)	LCU-633541A	Laser Components, Olching
Laserdiode (635 nm, 7 mW)	QL63D5SA	Roithner, Wien (A)
Laserdiode (635 nm, 80 mW)	RLD65PZB5	Rohm, Düsseldorf
Laserdiodenkollimator	GS-8019	Roithner, Wien (A)
LC-Pumpen	LC-10AD	Shimadzu, Duisburg
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Dülmen
Quadrupol-MS	QTrap 2000	Applied Biosystems, Darmstadt
Säulenofen	CTO-10A	Shimadzu, Duisburg
Spannungsquelle	6080	Peaktech, Ahrensburg
Spektrometer	QE65000	Ocean Optics, Ostfildern
Spritzenpumpe	Model 74900	Cole Parmer, Vernon Hills (USA)

4.3 Chemikalien

Tabelle 4.2: Im vierten Kapitel verwendete Chemikalien mit Reinheit, CAS-Nummer und Hersteller bzw. Vertrieb

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nr.	Hersteller/Vertrieb
Acetonitril	≥99,9 %	75-05-8	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Acridinorange	99 %	65-61-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ameisensäure	p.a.	64-18-6	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Ammoniak	25 %	1336-21-6	Merck, Darmstadt
Borsäure	≥99,9 %	10043-35-3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carboxynaphthofluorescein	≥90 %	128724-35-6	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coumarin 30	99%	41044-12-6	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coumarin 343	97 %	55804-65-4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	99 %	64-19-7	VWR, Darmstadt
Fluorescein	99 %	518-47-8	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	≥99,9 %	67-56-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	≥98 %	1310-73-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nilblau	95 %	53340-16-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrostilben	≥99,8 %	2844-15-7	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oxazin-1	>99 %	24796-94-9	Acros Organics, Geel (B)
Rhodamin 110	>99 %	13558-31-1	Fluka Chemie, Buchs (CH)

4.4 Erster Prototyp

4.4.1 Einleitung und Konstruktionszeichnungen

Für die ersten Versuche wurde ein möglichst einfacher Aufbau mit nur den notwendigen Komponenten gewählt. Dazu wurde ein kleines Gehäuse aus Messing entwickelt, in welches der Diodenlaser eingefügt werden kann. Dem Laser steht die Halterung für die Glasfaser im 90°-Winkel gegenüber. Eine technische Darstellung des zusammengestellten Systems ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

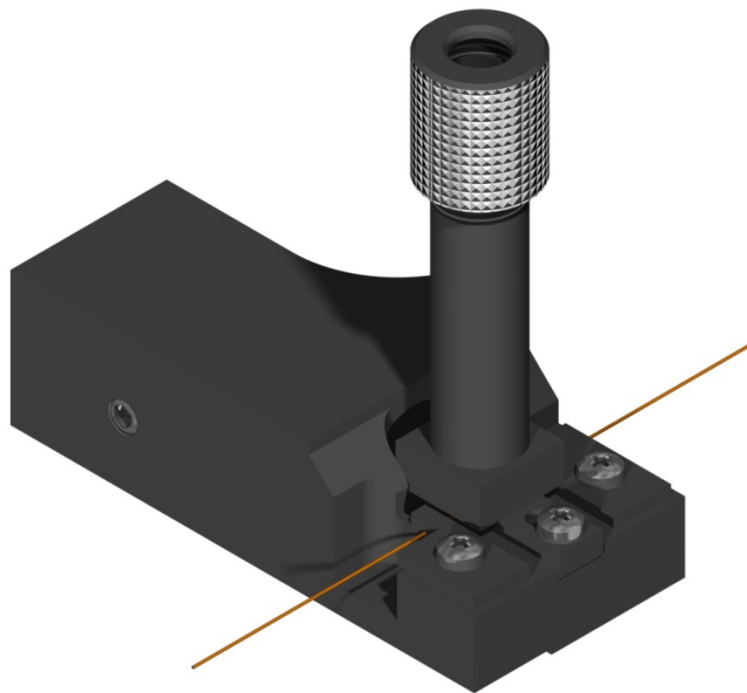


Abbildung 4.2: Erster Prototyp eines kompakten, wellenlängenaufgelösten LIF-Systems

Das in Abbildung 4.2 gezeigte LIF-System ist der erste Prototyp für eine kompakte, wellenlängenaufgelöste Detektionseinheit. Die orthogonale Anordnung wurde aus baulichen Gründen gewählt. Wichtig bei der Wahl der Geometrie ist, dass Laser und Detektor sich nicht gegenüber stehen,

da sonst das Laserlicht jegliche Fluoreszenz überstrahlen würde. Die Kapillare wurde direkt unter der Glasfaser angebracht. Auf eine Positionierungsmöglichkeit der Komponenten wurde verzichtet, da die Bauteile präzise gefertigt sowie zentriert werden können und vom einfachsten Aufbau ausgegangen werden sollte. Durch diese Kombination ist die gesamte Einheit lediglich 66 mm tief, 30 mm breit und 65,75 mm hoch. Für eine bessere Übersicht ist in Abbildung 4.3 eine sogenannte Explosionsansicht erstellt.

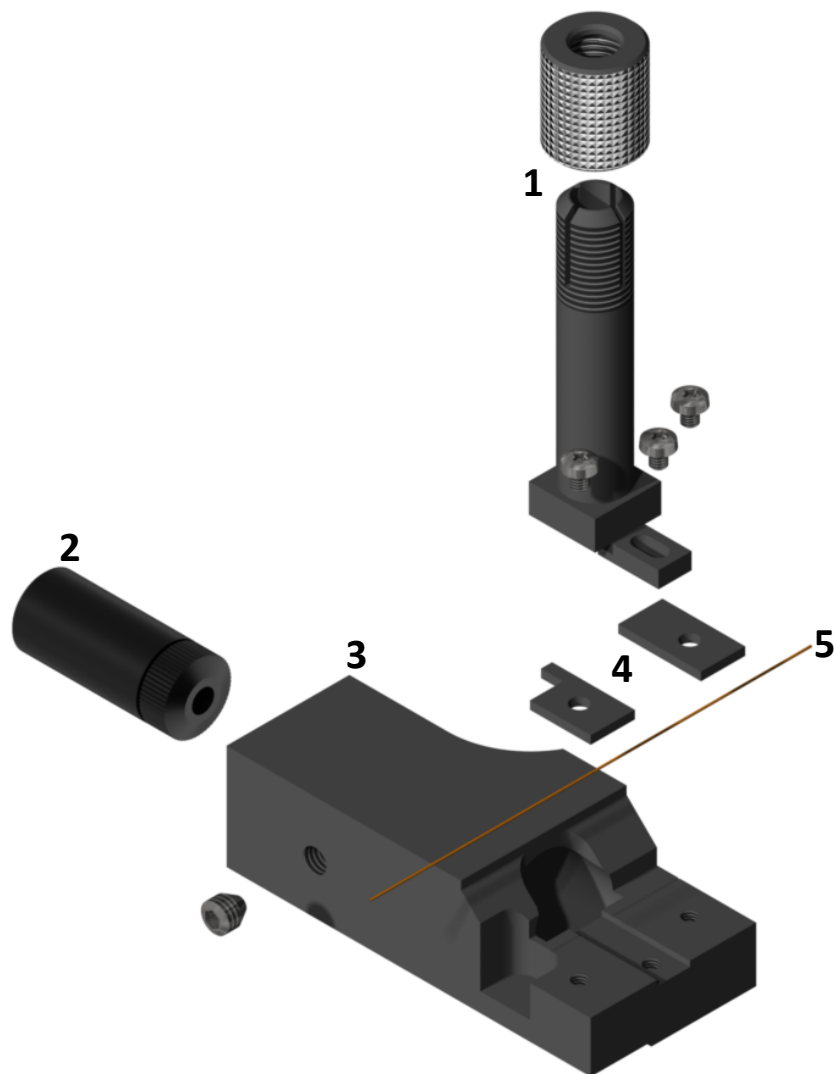


Abbildung 4.3: Explosionsansicht des ersten Prototyps: 1 Glasfaserhalterung, 2 Diodenlaser, 3 Gehäuse, 4 Kapillarenfixierung, 5 Kapillare

In der Explosionsansicht sind alle Bauteile im Detail dargestellt. Die Kapillare wird in einer Nut mit zwei Kunststoffplättchen fixiert, sodass sie sich genau im Strahlengang des Lasers befindet. Die Glasfaser des Spektrometers, welche einen zylindrischen Metallkopf besitzt, wird in der dazugehörigen Halterung angebracht.

4.4.2 Modellanalyt Carboxynaphthofluorescein

Die Funktionsprüfung des ersten Prototyp sollten mit einem geeigneten Modellanalyten erfolgen. Dazu wurde Carboxynaphthofluorescein (CNF) ausgewählt. Die Struktur des Analyten ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

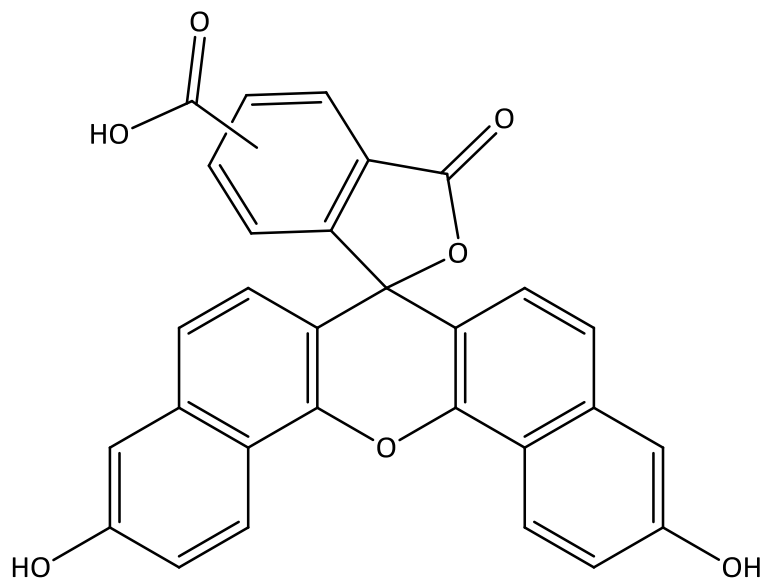


Abbildung 4.4: Strukturformel von Carboxynaphthofluorescein

Die Struktur des Carboxynaphthofluoresceins ist der des Fluoresceins sehr ähnlich. Durch Einlagerung einer weiteren Carbonsäuregruppe und vor allem durch die zwei zusätzlichen aromatischen Ringe, wird die Fluoreszenzanregung und -emission des Moleküls deutlich in den roten

Bereich verschoben werden. In Abbildung 4.5 ist das Anregungs- und Emissionsspektrum von Carboxynaphthofluorescein in Wasser (pH=9) dargestellt.

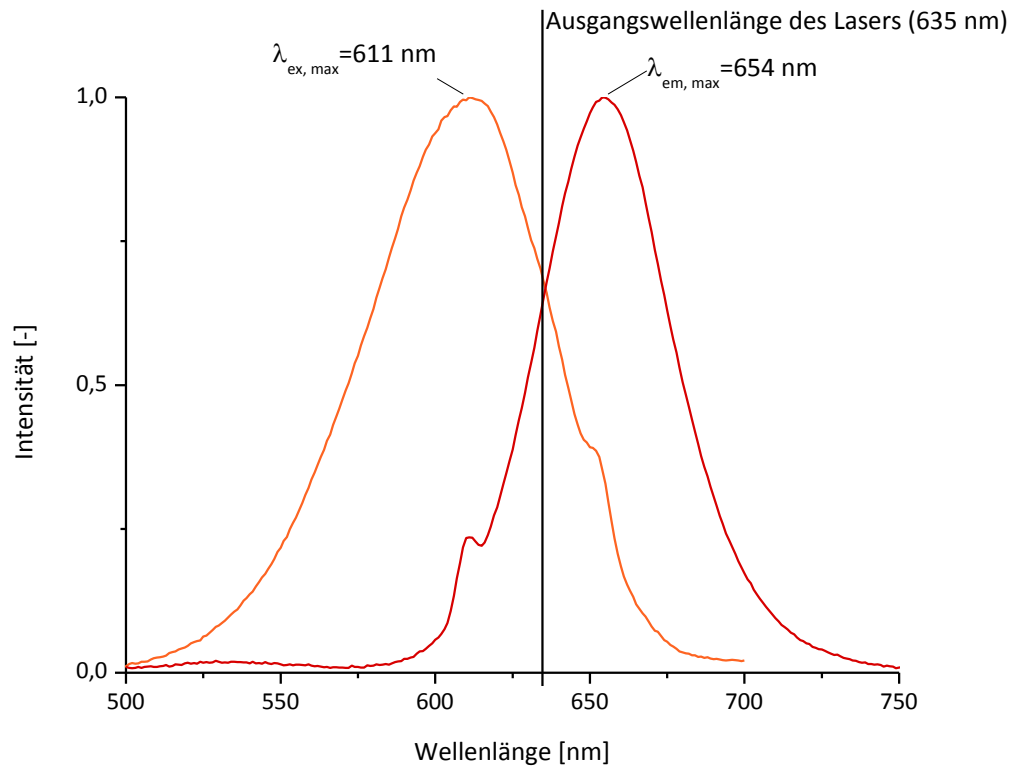


Abbildung 4.5: Normiertes Anregungs- und Emissionsspektrum von Carboxynaphthofluorescein in Wasser (pH=9)

Das Anregungsmaximum von 611 nm entspricht nicht exakt der Anregungswellenlänge des Lasers, allerdings gleicht der große *Stokes-Shift* von 43 nm dies wieder aus. Die Emissionswellenlänge liegt mit 654 nm hinreichend weit von der Wellenlänge des Lasers entfernt, um von dieser unterschieden zu werden.

4.4.3 Kassette im Eigenbau

Die Kapillarelektrophoresegeräte der Firma Agilent sind mit einer speziellen Kassette für die Kapillare ausgestattet. Die Kapillare kann außerhalb des Gerätes in die Kassette eingelegt sowie fixiert werden und anschließend unkompliziert und schnell in die CE eingeführt werden. Ausgelegt sind die Kassetten für die UV/Vis-Detektion, sodass die Integration eines selbstentwickelten LIF-Detektors einige Umbau-maßnahmen erfordert. Aufgrund des Platzbedarfs des LIF-Detektors müsste der Befestigungsmechanismus, welcher die Kapillare fixiert, der serienmäßigen Kassette entfernt werden. Um dies zu vermeiden wurde auf Grundlage der Kassette von Agilent eine eigene Kassette gefertigt, in der das selbstentwickelte Detektionssystem integriert werden kann.

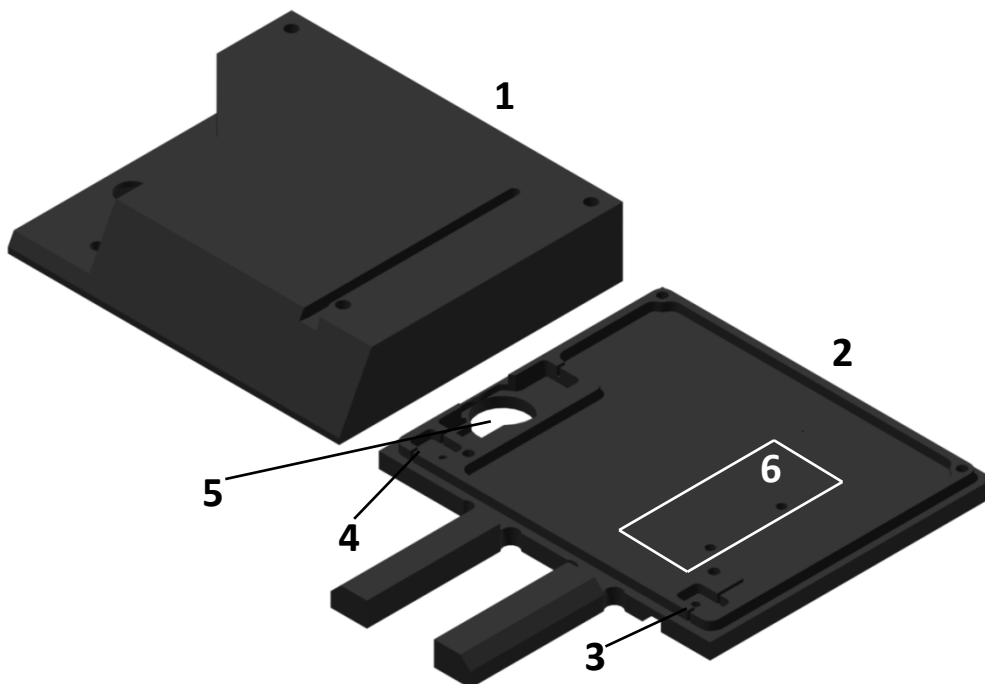


Abbildung 4.6: Kassette für die Detektionseinheit nach Vorbild der Kassetten von Agilent: 1 Oberteil, 2 Unterteil, 3 Kapillareneingang, 4 Kapillareneingangsmechanismus, 5 Öffnung für den geräteeigenen UV/Vis-Detektor, 6 Position des LIF-Detektionssystems

Abbildung 4.6 zeigt die eigens gefertigten Kassetten. Dabei stellt die weiße Markierung die Position der Detektionseinheit dar. Auf der linken Kassettenseite ist eine Aussparung für den UV/Vis-Detektor der CE angebracht, sodass weiterhin die Möglichkeit besteht, neben der LIF-Detektion die herkömmliche UV/Vis-Detektion zu nutzen.

4.4.4 Ergebnisse und nächsten Schritte

Zur Durchführung der ersten Versuche mit dem neuen System wurde eine Kapillare ($L=30$ cm, $ID=75$ μm) in das Detektionssystem eingespannt und eine Carboxynaphthofluoresceinlösung (10^{-3} mol/L) durch diese gepumpt. Dabei war festzustellen, dass diese sehr einfache Konstruktion nicht für eine LIF-Detektion geeignet ist. Es konnte weder beim Durchpumpen der CNF-Lösung durch die Kapillare ein Fluoreszenzsignal detektiert werden, noch war es möglich in die Kapillare injizierte Analytlösung beim Durchpumpen mit Wasser am Detektor zu registrieren. Ursache hierfür ist die Streustrahlung des Lasers. Obwohl die orthogonale Position der Glasfaser zum eingestrahlten Laserlicht dies verhindern sollte, streut und reflektiert der runde Querschnitt der Kapillare einen Teil des Lichts, sodass Laserlicht den Detektor erreicht. Zwar wird nur ein Teil der auf die Kapillare eingestrahlten Photonen gestreut, die hohe Photonendichte des 5 mW Lasers reicht dennoch aus um den CCD-Chip des Spektrometers zu überladen. Diese Überladung führt zu einem maximalen Ausschlag auf der Wellenlänge des Lasers. Die sehr hohe Strahlungsdichte blendet das Spektrometer über diese Wellenlänge hinaus, sodass bei großer Helligkeit der CCD-Chip vollständig überladen wird und der gesamte spektrale

Bereich einen maximalen Ausschlag aufweist. Da dieser erste Prototyp sehr einfach aufgebaut ist, war keine Option vorhanden, die Position der Glasfaser oder des Lasers zu ändern, um die Streuung in eine andere Richtung zu beeinflussen. Eine Überladung des Detektors konnte somit nicht verhindert werden.

Demnach sollte die zweite Version mit einem möglichst kleinen, einfachen und kostengünstigen Emissionsfilter ausgestattet werden, der die Streustrahlung des Lasers effizient eliminieren kann. Außerdem sollte eine verbesserte Positionierbarkeit des Lasers eingebaut werden, um den Laserstrahl leicht unterhalb des Mittelpunkts der Kapillare zu lenken und so die Streuung in Richtung Glasfaser zu verringern.

4.5 Zweiter Prototyp

4.5.1 Einleitung

Mit den Erkenntnissen des ersten Prototyps konnten in der zweiten Version wichtige Verbesserungen eingebaut werden. Im Vordergrund standen hierbei der Einbau eines Emissionsfilters sowie eine Positionierung des Lasers. Der Emissionsfilter sollte einen Großteil der Streustrahlung eliminieren und durch die Kippfunktion sollte die Anregung verbessert und die Streuung verringert werden.

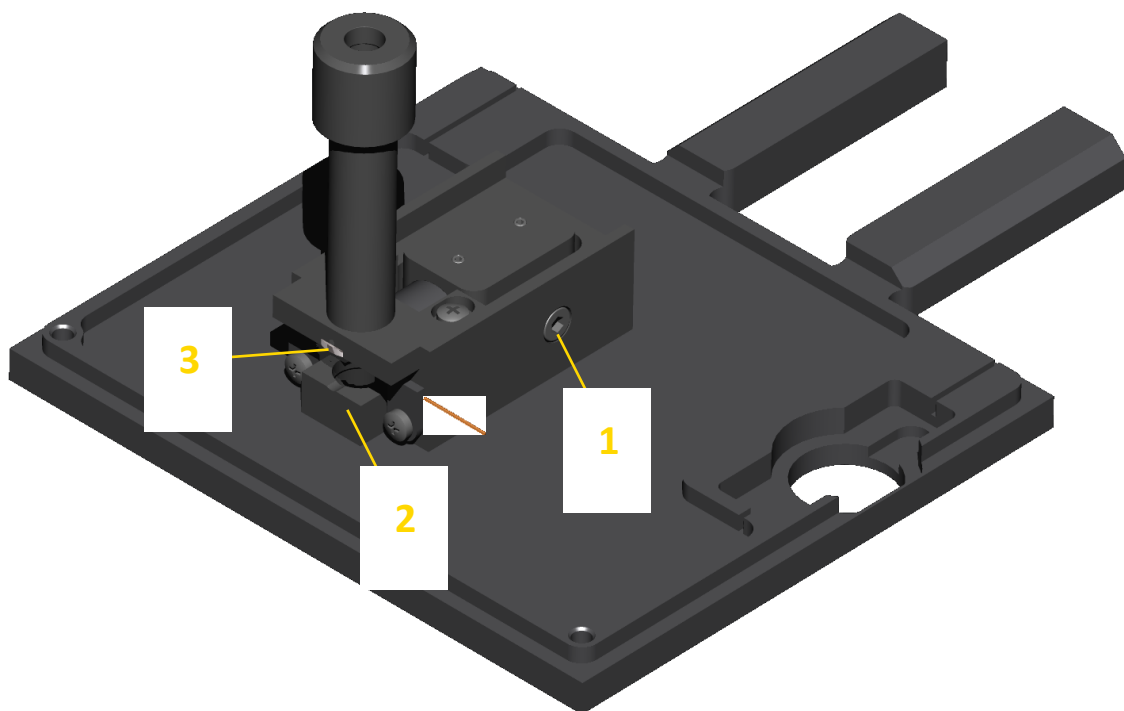


Abbildung 4.7: Zweiter Prototyp eines kompakten, wellenlängenaufgelösten LIF-Systems (1 Kippfunktion des Laser, 2 optionale Photodiode, 3 Emissionsfilter)

In dem weiterentwickelten Detektionssystem in Abbildung 4.7 ist neben dem zusätzlichen Filter und der Laserpositioniereinheit die Möglichkeit für

den Einbau einer Photodiode als alleiniger oder zusätzlicher Detektor vorhanden. Diese ist ebenfalls orthogonal zum Laserstrahl angeordnet und kann mit einem Emissionsfilter ausgestattet werden. Der Einsatz einer Photodiode als Detektor ermöglicht ein noch kompakteres System und ist zudem deutlich kostengünstiger. Allerdings erlaubt dieser Aufbau keine wellenlängenaufgelöste Detektion und ein weiterer Nachteil ist die wesentlich schlechtere Nachweisgrenze. Dennoch sollte diese Konfiguration eine selektivere sowie sensitivere Alternative zum UV/Vis-Detektor darstellen.

4.5.2 Technische Änderungen

Der bisherige Aufbau des ersten Prototypen wurde also um einen Emissionsfilter, eine Laserpositioniereinheit und eine optionale Photodiode erweitert. Die einzelnen Bauteile des zweiten Prototyps sind übersichtlicher in der folgenden Abbildung 4.8 als Explosionsansicht dargestellt.

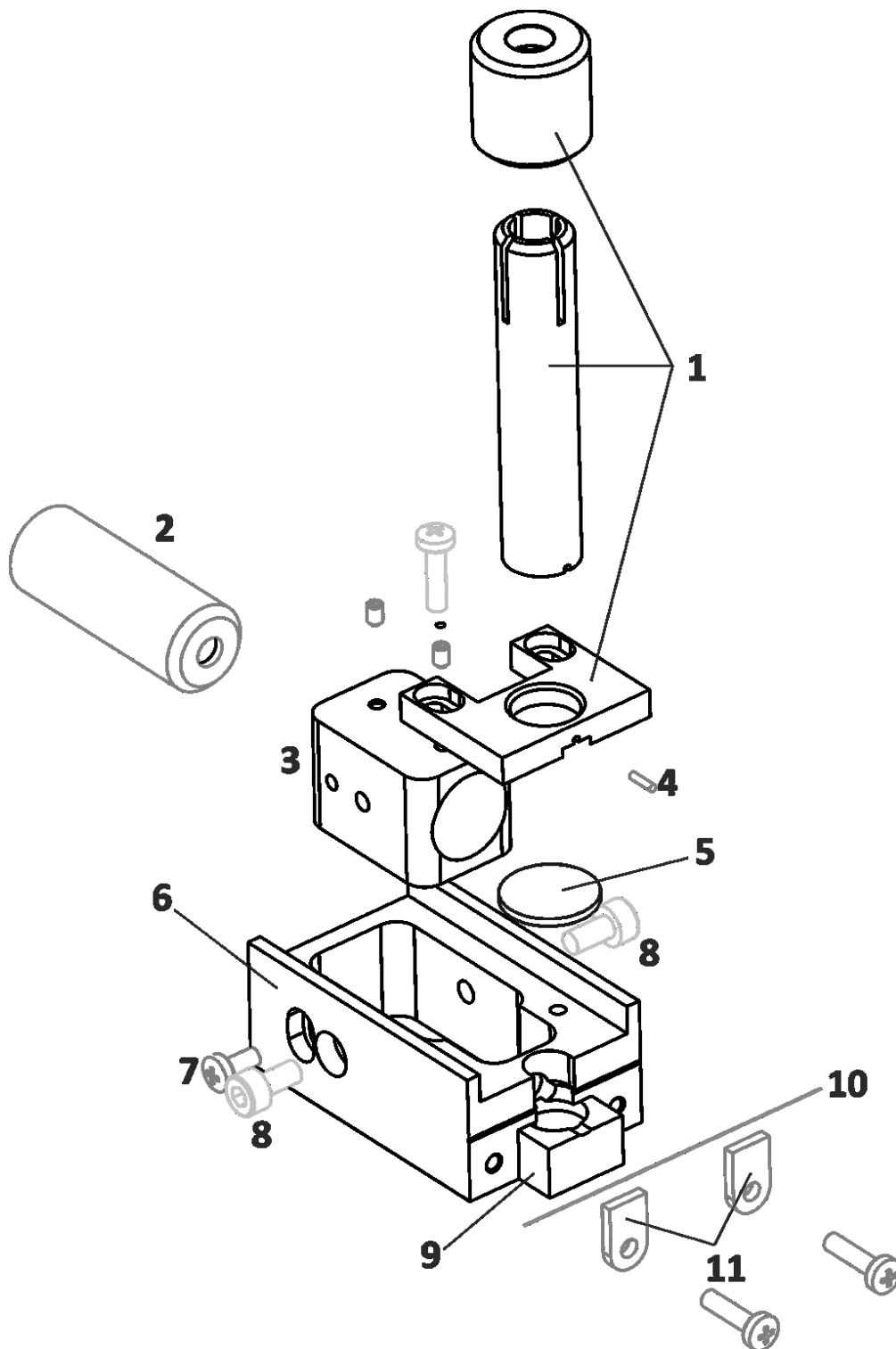


Abbildung 4.8: Explosionsansicht des zweiten Prototyps: 1 Glasfaserhalterung, 2 Diodenlaser, 3 Laserhalterung, 4 Abstandshalter, 5 Emissionsfilter, 6 Gehäuse, 7 Laserfixierschraube, 8 Laserdrehachse, 9 Photodiodenposition, 10 Kapillare, 11 Kapillarenfixierung

In Abbildung 4.8 sind die Fortschritte im Vergleich zur ersten Version des Detektionssystems deutlich zu erkennen. Dazu zählt der Emissionsfilter, welcher aus einem beschichteten Kunststoff besteht, wodurch er im Gegensatz zu einem klassischen Glasfilter mit einer Höhe von nur 1,1 mm sehr dünn ist und einen Durchmesser von 12,7 mm hat. Der Filter ist ein sogenannter Langpassfilter, der nur Licht der Wellenlänge >645 nm (*cut-on*-Wellenlänge) passieren lässt. Dadurch sollte es möglich sein, einen Großteil der Laserstrahlung mit der Wellenlänge 635 nm zu eliminieren. Damit der Filter nicht von der Glasfaser beschädigt wird, wird ein kleiner Stift als Abstandshalter eingesetzt. Dies ermöglicht, dass die Glasfaser möglichst nah an der Kapillare positioniert ist und dennoch eine Beschädigung des Filters ausgeschlossen werden kann. Eine weitere Neuerung ist die Laserpositioniereinheit. Diese Halterung erlaubt es, den Laser ± 5 mm auf seiner Achse zu kippen und somit den Laserstrahl auf die Kapillare auszurichten. Die dritte Weiterentwicklung zur vorherigen Ausführung der Detektionseinheit ist im vorderen Teil des Gehäuses zu finden. Durch eine leicht geänderte Anbringung der Kapillare kann unterhalb der Glasfaser eine Photodiode als Detektor angebracht werden.

Trotz der Neuerungen konnte die Größe des Messinggehäuses für das Detektionssystems sogar etwas verringert werden, sodass das Gehäuse 49 mm tief, 28 mm breit und 67,5 mm hoch ist.

4.5.3 Modellanalyt Oxazin-1

Für die Funktionsprüfung des neuen Systems wurde Oxazin-1 als Modellanalyt gewählt. Mit einer maximalen Anregungswellenlänge von 654 nm, die nahe an der Ausgangswellenlänge des Lasers von 635 nm liegt, ist es gut für die Charakterisierung des weiterentwickelten Detektionssystems geeignet. Die Abbildung 4.9 zeigt die Strukturformel des Oxazin-1.

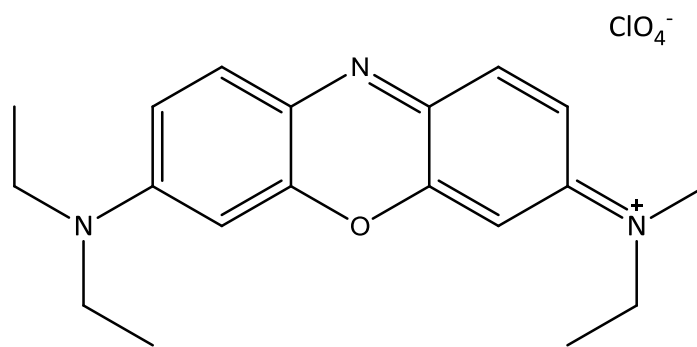


Abbildung 4.9: Strukturformel von Oxazin-1

Oxazine sind eine Unterklasse der Chinonimine, welche *p*-Benzo-chinonimin oder -diimin als Basis aufweisen. Diese Farbstoffe haben ein Anthracengerüst in welchem ein Kohlenstoffatom des zentralen Rings durch ein Stickstoffatom sowie ein weiteres durch ein zusätzliches Heteroatom wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel ersetzt wurde. Das Anregungs- und Emissionsspektrum von Oxazin-1 ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

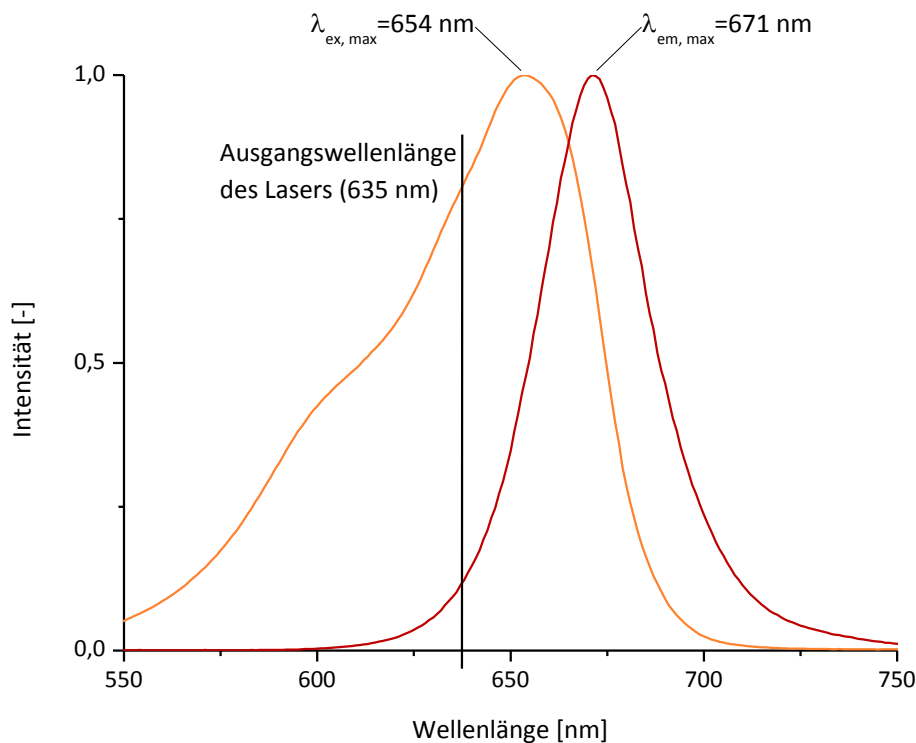


Abbildung 4.10: Normiertes Anregungs- und Emissionsspektrum von Oxazin-1.

Das Anregungsmaximum von Oxazin-1 liegt mit 654 nm relativ nah an der Ausgangswellenlänge des Lasers (635 nm) und ist somit besser geeignet als der Modellanalyt Carboxynaphthofluorescein. Es wird eine um etwa 27 % bessere Anregung des Analyten erreicht. Obgleich der *Stokes-Shift* des Oxazins-1 mit 17 nm kleiner ist als der des CNFs, ist die Emissionswellenlänge 17 nm weiter von der Laserwellenlänge entfernt. Wie aus den Versuchen mit dem ersten Prototyp hervorgeht, hat der Diodenlaser eine vergleichsweise schmalbandige Emission. Der CCD-Chip des Spektrometers kann jedoch schnell durch die hohe Photonendichte der Streustrahlung des Lasers überladen werden, wodurch ein Teil der Photonen auf die angrenzenden Pixel übergeht. Dieser Effekt verursacht ein verhältnismäßig starkes Rauschen in der Nähe der Laserwellenlänge,

d. h. je näher die Emission des Analyten an der Anregungswellenlänge ist, desto schlechter ist die Empfindlichkeit für diesen. Durch die Emission im längerwelligen Bereich ist das Oxazin-1 im Vergleich zum CNF besser als Modellanalyt geeignet.

4.5.4 Elektrophoretische Trennung des Modellanalyten Oxazin-1

Nach dem Einbau der Kapillare in die Kassette ist zunächst eine Ausrichtung des Lasers erforderlich. Dazu wurde die Kapillare in der CE mit einer Oxazin-1-Lösung (10^{-3} mol/L) in der CE hydrodynamisch gefüllt. Anschließend wurde die Kassette aus dem Kapillarelektrophoresegerät entnommen, da eine Positionierung des Lasers nur mit geöffneter Kassette außerhalb der CE möglich ist. Der Laserstrahl wurde manuell auf die maximale Intensität der emittierten Fluoreszenz am Spektrometer justiert.

Zur Konditionierung wurde die Kapillare für zehn Minuten mit 1 mol/L Natronlauge gespült um etwaige Analytreste zu entfernen. Anschließend wurde die Kapillare 30 Minuten lang mit dem Trennpuffer konditioniert. Als Elektrolytlösung wurde ein 100 mmol/L Boratpuffer mit einem pH-Wert von 8,4 genutzt (Herstellung s. Kapitel 3.2.3). Nach jeder Analyse wurde die Kapillare ebenfalls eine Minute lang mit Pufferlösung gespült.

Für die Tests des Detektionssystems unter Trennbedingungen wurden folgende Parameter verwendet:

Die Injektionszeit betrug 5 s bei einem Injektionsdruck von 50 mbar, dies entspricht 250 mbar·s. Die verwendete Kapillare hatte eine Länge von 30 cm (effektiv 15 cm) und einen inneren Durchmesser von 75 µm. Es wurde eine Spannung von 30 kV mit einem resultierenden Strom von etwa 77 µA angelegt. Als Messwellenlänge wurde 671 nm mit einer Bandbreite von 10 Pixeln gewählt. Der CCD-Chip wurde über den TE-Kühler auf -15 °C gekühlt. Die Integrationszeit des Spektrometers betrug 300 ms. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt.

4.5.5 Nachweisstärke des zweiten Prototypen

Um die Sensitivität des Aufbaus bewerten zu können, wurden Oxazin-1-Lösungen verschiedener Konzentration analysiert. Dazu wurde eine wässrige Oxazin-1-Stammlösung (10^{-3} mol/L) hergestellt, wovon ausgehend eine Reihe von 10^{-3} bis 10^{-6} mol/L mit jeweils zwei Unterteilungen von Faktor 1 und 5 je Dekade mit Wasser verdünnt wurde. Zwei dieser Elektropherogramme sind in der Abbildung 4.11 dargestellt.

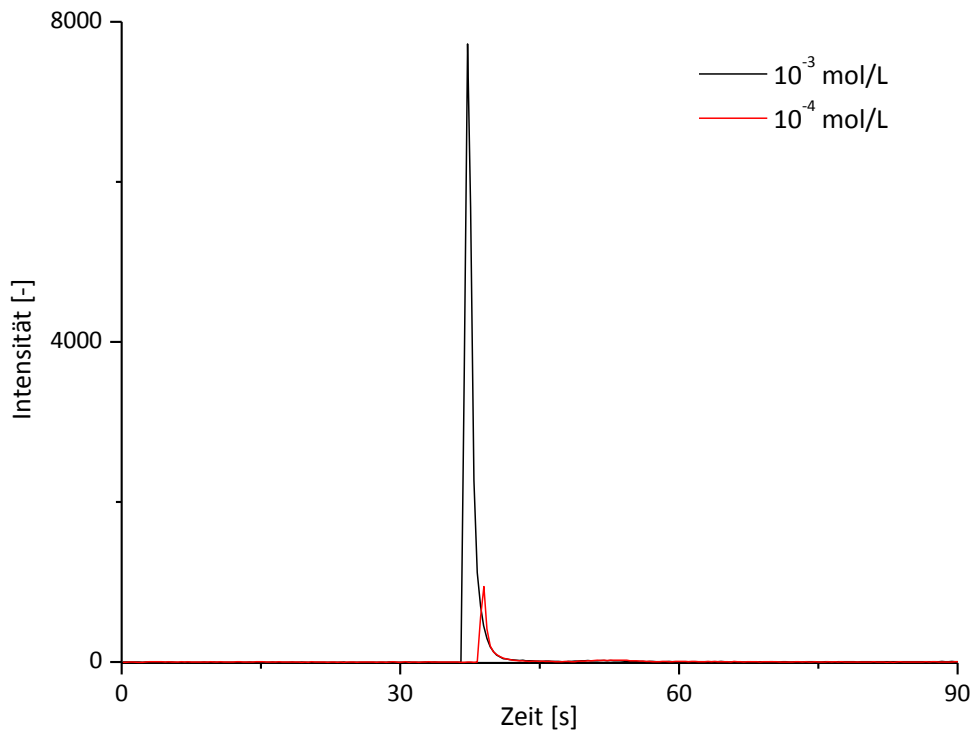


Abbildung 4.11: Elektropherogramme von Oxazin-1-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (10^{-3} mol/L und 10^{-4} mol/L)

Die Elektropherogramme in Abbildung 4.11 zeigen die ersten Messergebnisse unter Trennbedingungen für das neue Detektionssystem. Durch die kurze Kapillare ergibt sich für den Modellanalyten eine Migrationszeit von unter einer Minute. Allerdings ist eine Differenz von etwa 1,7 s zwischen den beiden Signalen zu beobachten. Ein Vergleich der beiden Signalfächen weist einen Unterschied von Faktor 9,5, welcher gut mit dem erwarteten Wert von 10 übereinstimmt. Die Nachweisgrenze kann aus den vorliegenden Messungen (Abbildung 4.11) abgeschätzt werden. Dazu wurde das Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. Als Rauschen wurde die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet. Da die Standardabweichung der Schwankung um einen Mittelwert nach oben und unten entspricht, wird

auf diese Weise ein objektiver Wert für das Rauschen erhalten. Für die Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L) kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von 250 angegeben werden. Mit der Bedingung $S/N = 3$ und der bekannten Konzentration kann die Nachweisgrenze für Oxazin-1 mit $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/L angegeben werden.

Somit ist die Nachweisstärke des zweiten Prototypen im Bereich eines handelsüblichen UV/Vis-Detektors anzusiedeln. Der Vorteil des LIF-Systems gegenüber einem UV/Vis-Detektor ist die Selektivität. Dennoch ist das Potential des Detektionssystems noch nicht ausgereizt.

4.5.6 Ergebnisse und Weiterentwicklung

Mit dieser Version des Detektionssystems konnten erste Erfolge in der Entwicklung eines sensitiven sowie selektiven und dennoch sehr kompakten sowie flexiblen Detektors erreicht werden. Es konnten erste Messungen unter Trennbedingungen durchgeführt werden, jedoch ist eine Verbesserung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erforderlich. Zudem eliminiert der Emissionsfilter einen Großteil des gestreuten Laserlichts. Dennoch ist die restliche Strahlung nicht zu vernachlässigen, da durch diese ein relativ starkes Rauschen im Bereich der emittierten Fluoreszenz entsteht (Abbildung 4.12).

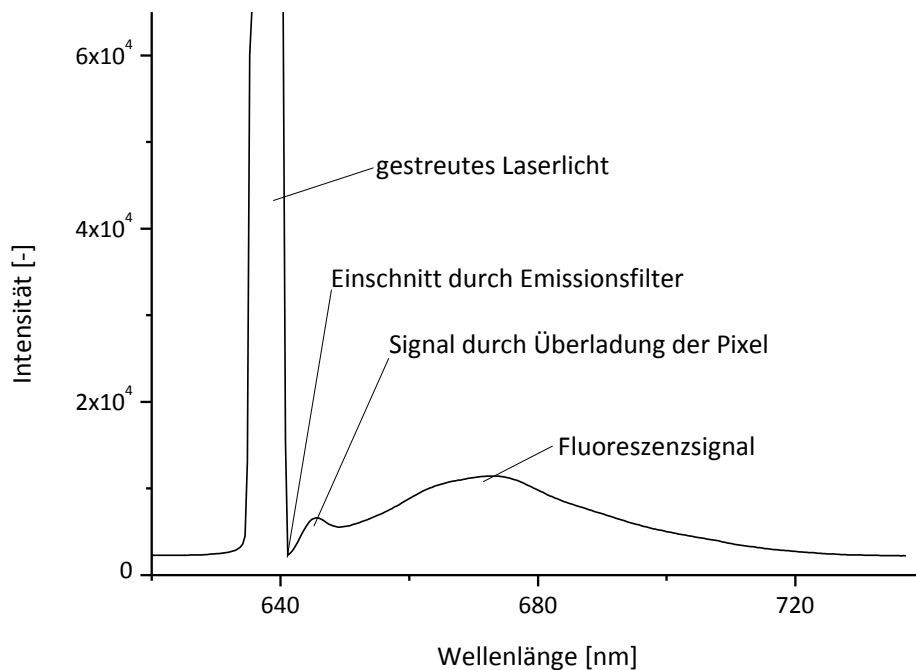


Abbildung 4.12: Spektrum einer mit Oxazin-1-Lösung (10^{-3} mol/L) gefüllten Kapillare

Wie in Abbildung 4.12 gezeigt ist, ist das auf den Detektor treffende Laserlicht intensiv genug um diesen zu überlasten. Ein Teil dieses Lichtes wird sogar auf benachbarte Pixel übertragen. Damit diese Störung verringert werden kann, sollen Filter mit einer größeren *cut-on*-Wellenlänge getestet werden und die Anzahl der eingebauten Filter erhöht werden.

Die kippbare Halterung des Lasergehäuses hat die Positionierung des Diodenlasers ermöglicht. Durch die Fokussierung des Laserstrahls leicht unterhalb des Mittelpunkts der Kapillare konnte die Streuung des Laserstrahls in Richtung der Glasfaser reduziert werden. Die Fokussierung des Strahls ist jedoch zu ungenau und der Brennpunkt mit etwa ein bis zwei Millimetern im Durchmesser zu groß. Eine weitere Linse könnte diese

Situation verbessern. Die Installation einer beweglichen Linsenkombination könnte zudem die manuelle Einstellung des Lasers überflüssig machen. Außerdem sollte nach einer Möglichkeit gesucht werden eine Kapillare mit eckigem Querschnitt einzusetzen und damit ihr Streuverhalten zu verbessern. Insgesamt soll die Empfindlichkeit des Detektionssystems deutlich verbessert werden. Im Vergleich zu UV/Vis-Detektoren sollte das LIF-System um einige Dekaden bessere Nachweisgrenzen liefern. Die Verwendung einer kleinen Sammellinse zwischen der Kapillare und der Glasfaser sollte den Anteil an detektierbarer Fluoreszenz vergrößern. Der Einsatz einer Linse für die emittierte Fluoreszenz erfordert jedoch eine veränderte Halterung der Glasfaser. Dies soll zusätzlich eine Positionierung in Richtung der z-Achse ermöglichen, da sonst die Öffnung der Glasfaser nicht genau im Brennpunkt der Linse installiert werden kann, wodurch der Vorteil der Bündelung des Fluoreszenzlichts ungenutzt bliebe.

Zusammenfassend konnten erste Messungen erfolgreich durchgeführt werden und eine Nachweisgrenze von etwa $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/L für Oxazin-1 erzielt werden. Allerdings gilt es diese zu verbessern, wozu die Streustrahlung minimiert und die detektierbare Fluoreszenz erhöht werden muss.

4.6 Dritter Prototyp

4.6.1 Einleitung

Die Erkenntnisse der Versuche mit der zweiten Version des Detektionssystems ermöglichten die Entwicklung einiger Verbesserungen für das dritte Modell. Dazu gehört die Erweiterung des Aufbaus um zwei Sammellinsen, zum einen für die Lenkung des Laserstrahls und zum anderen für die Fokussierung der Fluoreszenz in die Glasfaser. Im Zuge dessen wurde eine z-Achsen-Positionierung der Glasfaser in das System integriert und auf die Kippfunktion des Lasergehäuses verzichtet, um den Laserstrahl ausschließlich mittels Linse zu lenken. Diese Veränderungen sind in der Abbildung 4.13 dargestellt.

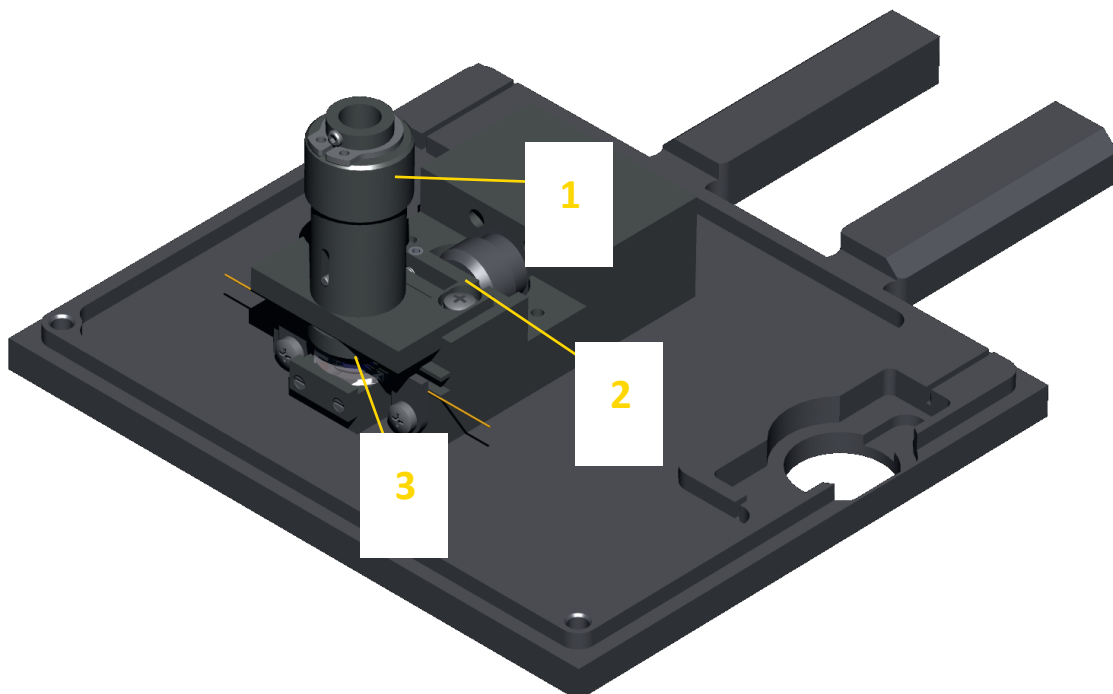


Abbildung 4.13: Dritter Prototyp eines kompakten, wellenlängenaufgelösten LIF-Systems (1 Glasfaserhalter mit z-Achsen-Positionierung, 2 Linse zur Lenkung des Laserstrahls, 3 Linse zur Fokussierung der Fluoreszenz)

4.6.2 Technische Verbesserungen

Im Vergleich zum zweiten Prototyp wurden drei wesentliche Änderungen gegenüber dem Vorgängermodell eingeführt. Dazu gehört eine entlang der z-Achse positionierbare Glasfaserhalterung, eine Sammellinse zur Fokussierung der Fluoreszenz und eine Linse zur Lenkung sowie weiteren Fokussierung des Laserstrahls. Zur besseren Darstellung der Linse zur Lenkung des Laserstrahls ist in Abbildung 4.14 eine rückseitige Ansicht des Systems gezeigt.

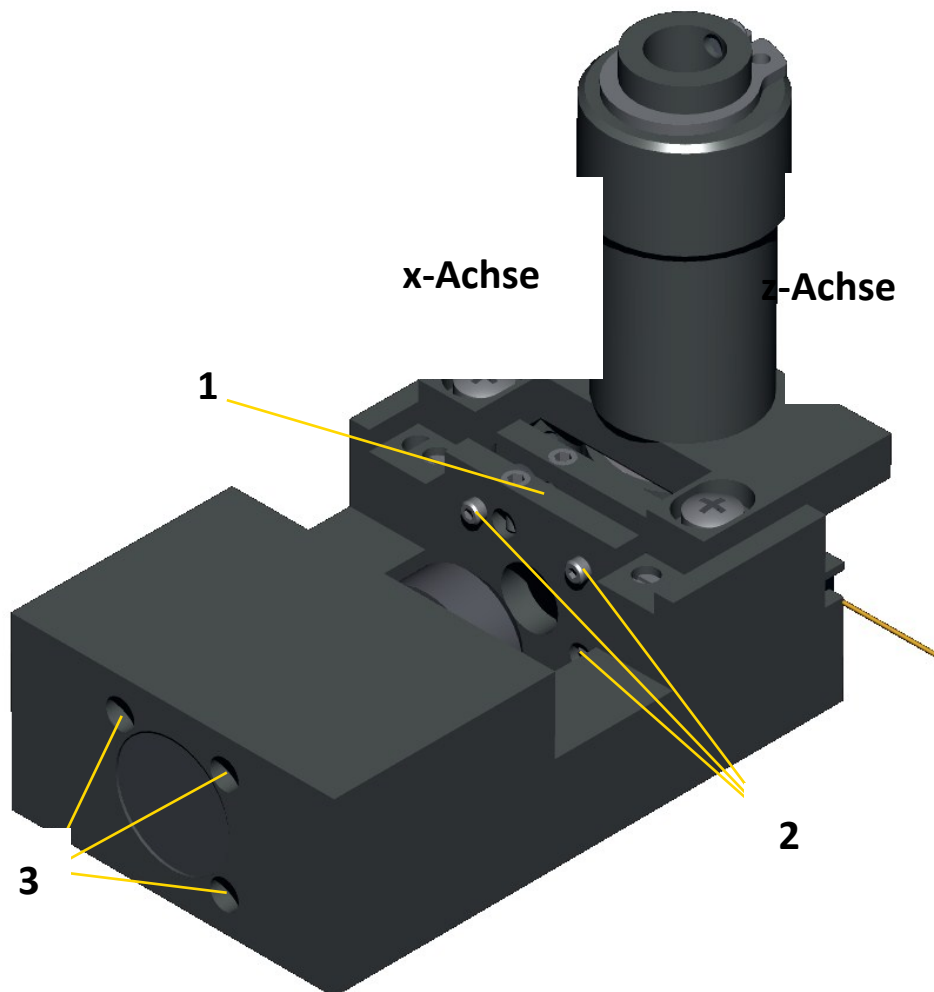


Abbildung 4.14: Dimetrische Projektion des kompletten Gehäuses: 1 Verstellbare Linsenhalterung, 2 Stellschrauben, 3 Öffnungen für Stellschrauben

Die verstellbare Linsenkombination zur Lenkung des Laserstrahls besteht, wie in Abbildung 4.14 skizziert, aus einem hinteren festinstallierten Rahmen und einer mittels drei Gewindestiften (2, Abb. 5.15) einstellbaren Linse (1, Abb. 5.15). Die Stifte können durch die dazugehörigen Öffnungen an der Rückseite (3, Abb. 5.15) erreicht werden und arbeiten gegen kleine Federn, welche ein Blockieren der Linsenfassung verhindern sollen. Die positionierbare Linse erlaubt die Einstellung des Laserbrennpunktes in einem Bereich von einem Millimeter um den Mittelpunkt. Überdies ermöglicht sie einen Brennpunkt mit einem kleineren Querschnitt. In der rückseitigen Ansicht ist auch die variable Glasfaserhalterung zu erkennen. Die Glasfaser kann präzise mittels einer Mikrometerschraubenkonstruktion in Richtung der z-Achse in einem Bereich von ± 5 mm um den berechneten Linsenbrennpunkt positioniert werden. Außerdem ist eine weniger präzise, manuelle Einstellmöglichkeit entlang der x-Achse angebracht. Mit diesen Optionen sollte es möglich sein den Eingang der Glasfaser in den Brennpunkt der Sammellinse zu positionieren. Eine vollständige Übersicht der Bauteile ist in der folgenden Explosionsansicht aufgeführt.

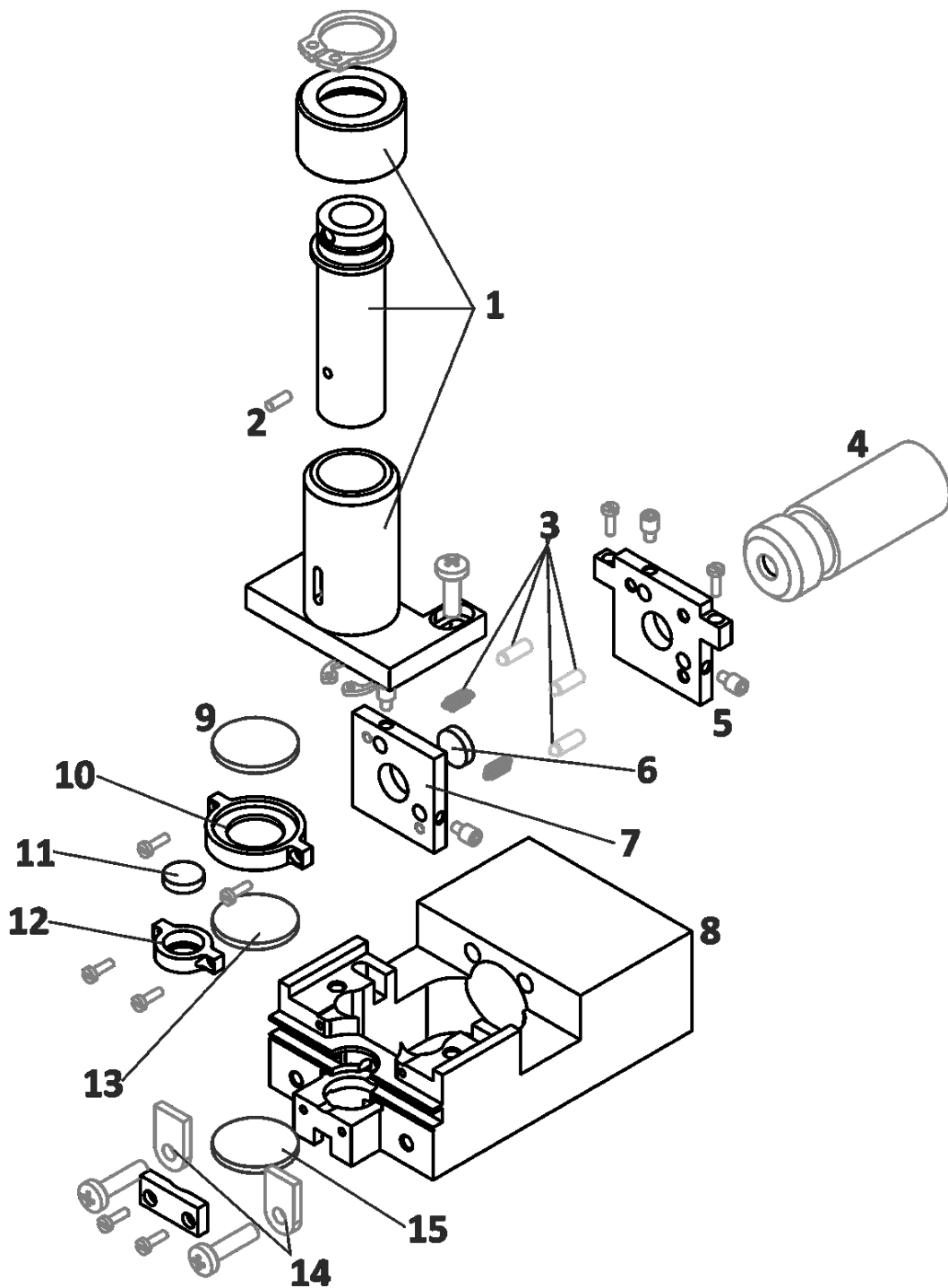


Abbildung 4.15: Explosionsansicht des dritten Prototyps: 1 Verstellbare Glasfaserhalterung, 2 Glasfaserfixierstift, 3 Gewindestifte und Federn des Linsensystems, 4 Diodenlaser, 5 Verstellbare Linsenhalterung, 6 Sammellinse, 7 Festinstallierte Linsenhalterung, 8 Gehäuse, 9 Emissionsfilter, 10 Filterhalter, 11 Sammellinse für die Fluoreszenz, 12 Linsenhalter, 13 Optionaler Emissionsfilter, 14 Kapillarenfixierung, 15 Emissionsfilter für die optionale Photodiode

Die wichtigste Weiterentwicklung dieses Systems sind die beiden Sammellinsen, die gut in Abbildung 4.15 zu erkennen sind. Es wurden bikonvexe Linsen aus N-BK7-Glas mit einem Durchmesser von 6 mm und einer Brennweite von 10 mm verwendet, da sie relativ kompakt sind und einen kurzen Arbeitsabstand zulassen. Eine Linse wurde direkt über der Kapillare angebracht um die emittierte Fluoreszenz zu fokussieren, während die andere in der neukonstruierten Linsenhalterung zur Lenkung des Laserstrahls installiert wurde. Dadurch konnte auf den Kippmechanismus verzichtet werden. Des Weiteren wurde die Filterhalterung weiterentwickelt, sie ist nun modular oberhalb der Sammellinse angebracht und kann einen zweiten optionalen Emissionsfilter aufnehmen. Mit der Verwendung eines zweiten Filters soll überprüft werden, ob die gestreute Strahlung weiter eingedämmt werden kann ohne die Fluoreszenz zu beeinträchtigen. Ein weiterer Filter wurde über der Photodiode eingebaut, da ansonsten aufgrund der hohen Intensität des gestreuten Laserlichts eine Messung nicht möglich ist.

Die Vielzahl an neuen Bauteilen und Einstellmöglichkeiten erforderte ein größeres Messinggehäuse. Mit einer Tiefe von 62 mm ist es 13 mm länger als der zweite Prototyp und mit einer Breite von 34 mm 6 mm breiter. Allerdings konnten durch Verstellung der Glasfaser in Richtung der z-Achse 16,5 mm an Höhe (Gesamthöhe 51 mm) eingespart werden.

4.6.3 Auswahl des Filters

Die zahlreichen Einstellungsmöglichkeiten des dritten Detektionssystems erforderten eine umfassendere Optimierung zahlreicher Parameter. Hierzu wurde eine Kapillare in die Kassette eingespannt und in der CE hydrodynamisch mit einer Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L) befüllt, sodass anschließend die Positionen der Glasfaser und der Sammellinse für den Laser auf die maximale Intensität für weitere Experimente eingestellt werden konnten. Um etwaige Analytreste zu entfernen wurde die Kapillare vor der Messung für 10 min mit 1 mol/L Natronlauge konditioniert. Anschließend wurde 30 min lang mit der Pufferlösung gespült.

Zunächst wurde die Leistungsfähigkeit eines zweiten Emissionsfilters geprüft. Dazu wurde die kapillarelektrophoretische Trennung aus Kapitel 4.5.4 mit einer Integrationszeit von 100 ms durchgeführt.

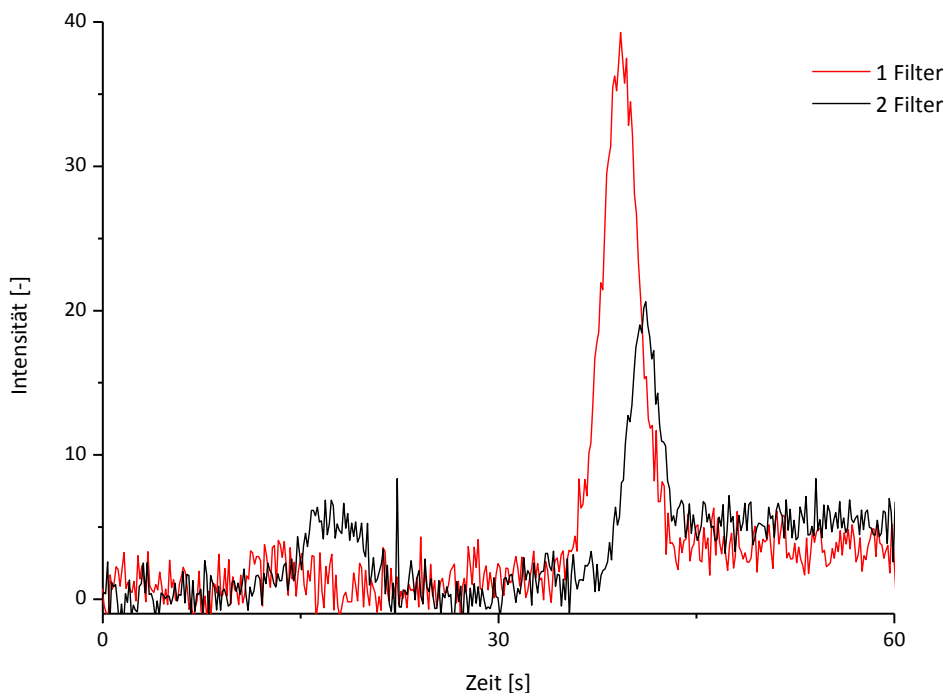


Abbildung 4.16: Elektropherogramm einer Oxazin-1-Lösung (10^{-7} mol/L) mit einem (rot) bzw. zwei (schwarz) installierten Emissionsfiltern

Abbildung 4.16 zeigt, dass das Rauschen mit zwei Emissionsfiltern etwas geringer ist als mit einem, allerdings ist auch die Gesamtintensität des Signals kleiner. Entscheidend für die Empfindlichkeit ist hier das Signal/Rausch-Verhältnis. Um dies zu bestimmen wurde als Rauschen die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet und in Relation zur Peakhöhe gesetzt. Es wurden jeweils Elektropherogramme einer Oxazin-1-Lösung (10^{-7} mol/L) verwendet. Für den Einsatz von einem Filter kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von 19 angegeben werden. Bei zwei eingebauten Emissionsfiltern wird ein Verhältnis von 12 erhalten. Es zeigt sich also, dass zwei Filter die Fluoreszenz zu sehr schwächen und die Verwendung eines Filters bessere Messergebnisse liefert. Aufgrund dieses Resultats wurde in allen nachfolgenden Messungen nur ein Langpassfilter eingebaut.

4.6.4 Optische Bank im Eigenbau

Mit zunehmender Komplexität des Aufbaus wurde es notwendig, einen Weg zu finden, die zahlreichen Parameters des Systems umfassend zu optimieren. Für diesen Zweck wurde eine individuelle optische Bank zusammengestellt.

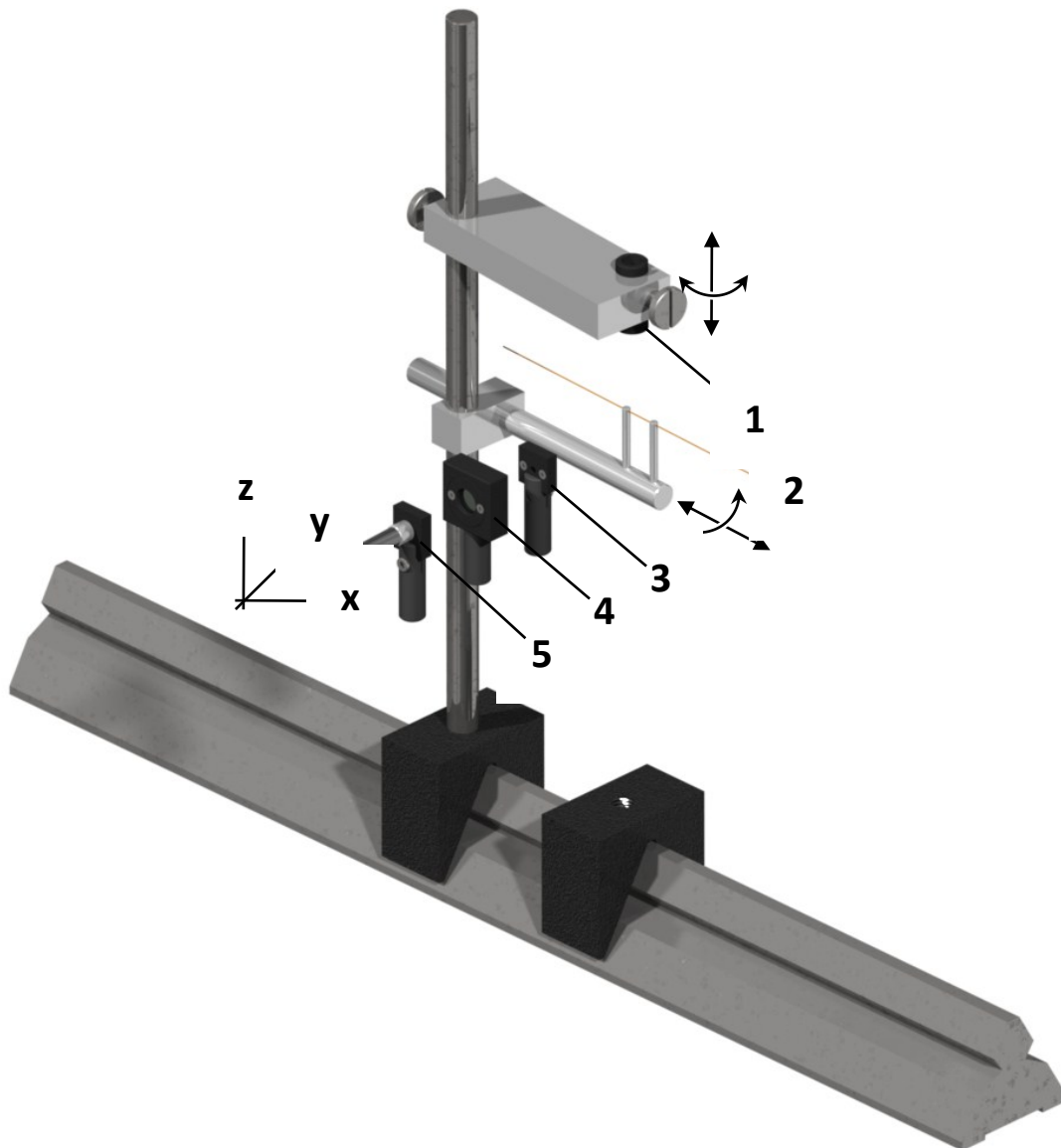


Abbildung 4.17: Individuell konstruierte optische Bank zur Optimierung des Detektionssystems (1 Diodenlaser, 2 Kapillare, 3 Sammellinse, 4 Emissionsfilter, 5 Glasfaser)

In Abbildung 4.17 ist die Zeichnung der optischen Bank dargestellt. Diese Bank bietet sogar mehr Optimierungsmöglichkeiten sowie eine größere Zahl an einstellbaren Freiheitsgraden als das Detektionssystem. Der Abstand des Lasers zur Kapillare sowie der Treffpunkt des Laserstrahls auf die Kapillare kann frei eingestellt werden. Die Halterung der Kapillare ist

ebenfalls variabel positionierbar. Sehr präzise kann die Konstruktion für die drei Detektionselemente Sammellinse, Emissionsfilter und Glasfaser justiert werden. Für diese drei Elemente kann der Abstand untereinander variiert werden, sowie die Position aller zusammen. Die drei Bauteile können mittels einer Konstruktion basierend auf dem Prinzip von Mikrometerschrauben gemeinsam und sehr präzise in allen drei Freiheitsgraden bewegt werden. Mit all diesen Einstellungsoptionen ist es möglich, den Brennpunkt des Laserstrahls auf die gewünschte Stelle zu fokussieren und die Abstände der Detektionselemente untereinander und relativ zur emittierten Fluoreszenz auf die maximale Intensität zu optimieren. Die optische Bank ermöglicht zudem eine schnelle und einfache Überprüfung baulicher Veränderungen für die Weiterentwicklung des LIF-Detektors. Dazu zählen unter anderem Filtervarianten, angepasste Kapillargeometrien sowie leistungsfähigere Linsen für den Laser.

4.6.5 Wahl der *cut-on*-Wellenlänge des Filters

Nachdem sich die Verwendung nur eines Filters als besonders geeignet für dieses Detektionssystem herausgestellt hat, sollte nun die Eigenschaft dieses Filters optimiert werden. Neben dem schon verwendeten Filter mit einer sogenannten *cut-on*-Wellenlänge von 645 nm, Licht oberhalb dieser Wellenlänge lässt der Filter passieren, wurde ein weiterer mit einer *cut-on*-Wellenlänge von 665 nm für den Test herangezogen. Für diesen Schritt wurde die Kapillare mit einer Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L) hydrodynamisch innerhalb der CE befüllt. Anschließend wurde die Kapillare aus der Kassette entnommen und in der optischen Bank (Abbildung 4.17)

installiert. Die vergleichsweise hohe Konzentration der Analytlösung wurde gewählt, damit sich, wie in Abbildung 4.18 gezeigt, die Fluoreszenz im Spektrum deutlich vom Streulicht unterscheidet.

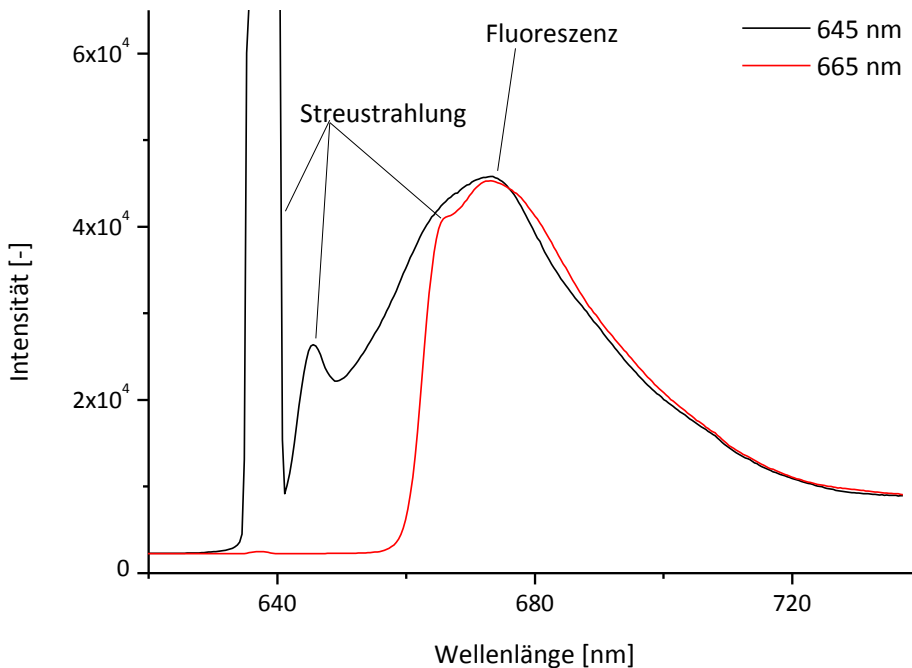


Abbildung 4.18: Spektrum einer mit Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L) gefüllten Kapillare unter Verwendung zwei verschiedener Filter (645 nm und 665 nm)

In den Spektren in Abbildung 4.18 ist die verbesserte Fluoreszenzdetektion bei Verwendung eines Filters, der längerwelliges Licht passieren lässt, gut zu erkennen. Es gelangt wesentlich weniger Streustrahlung zum Detektor, wodurch sich das Rauschen im Bereich der Fluoreszenz verringert. An der Schulter des Fluoreszenzsignals im roten Spektrum des 665 nm Filters ist festzustellen, dass dennoch Reststrahlung den Filter durchdringen kann. Deutlicher wird dies beim Betrachten des Spektrums einer mit Wasser gefüllten Kapillare (Abbildung 4.19).

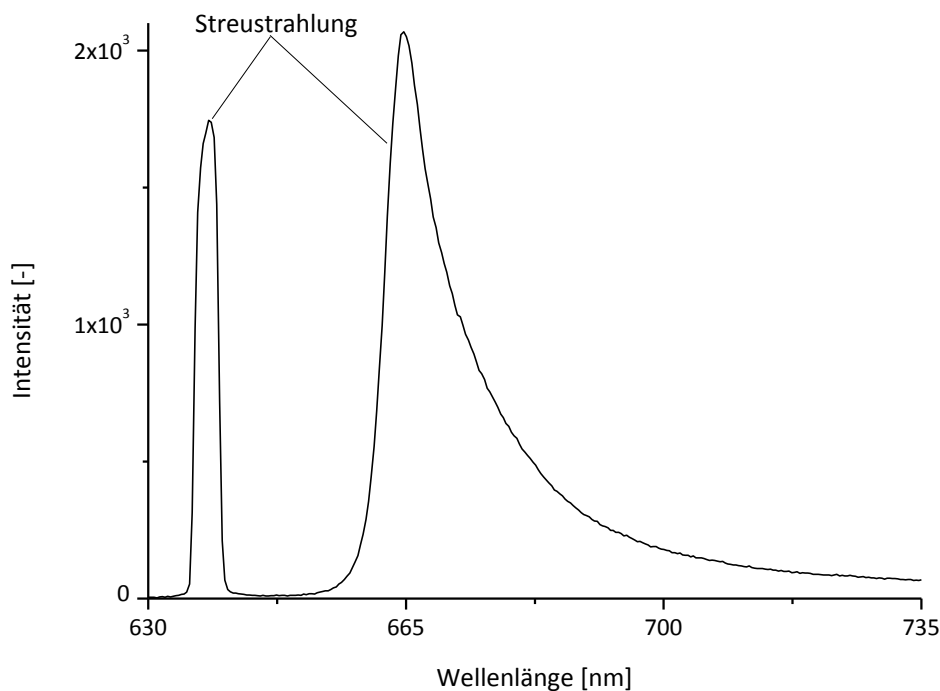


Abbildung 4.19: Spektrum einer wassergefüllten Kapillare

In Abbildung 4.19 ist die weiterhin vorhandene Streuung des Lasers zu sehen. Damit lässt sich auch die Schulter des Fluoreszenzsignals im Spektrum der Oxazin-1-Lösung gut erklären. Auffällig ist das fehlende Signal zwischen 642 nm und 653 nm. Das Signal um 635 nm kann eindeutig dem Laser zugeordnet werden und ist vermutlich Licht, welches direkt an der Kapillaroberfläche abgelenkt wird (Ramanstreuung). Strahlung, die an den Molekülen im Inneren der Kapillare gestreut wird, kann erst unter Energieverlust zum Detektor gelangen und ist in den längerwelligen Bereich des Spektrums verschoben (Rayleighstreuung). Die Form des Signals mit einem steilen Anstieg unterhalb von 665 nm und einem langsamen Abfall oberhalb passt gut zur Transmissionskurve des eingebauten Filters.

4.6.6 Quadratur des Kreises (Flache Kapillargeometrie)

Neben dem Ansatz das an der Kapillare gestreute Laserlicht mittels Filter zu eliminieren, gibt es die Möglichkeit die Streueigenschaften der Kapillare so zu verändern, dass weniger bzw. möglichst kein Licht in Richtung der Glasfaser reflektiert wird. Die geringste Streuung weist eine ebene Fläche auf, da an dieser nicht durchgelassenes Licht größtenteils reflektiert wird. Eine mechanische Begradigung der Glaskapillaren ist technisch nicht möglich, da diese mit 350 μm einen sehr geringen Durchmesser aufweisen und beim Abschleifen sehr leicht zerbrechen. Eine erfolgversprechendere Methode ist die Abtragung mittels energiereicher Laserpulse. Dazu wurde eine Laserablation verwendet. Dort wurde die Kapillare in einer gesondert angefertigten Vorrichtung fixiert und anschließend mit dem Laser beschossen. Es zeigte sich, dass eine Kapillare ohne Polyimidbeschichtung die Energie des Laserstrahls nicht abführen kann und direkt bei Beginn der Bestrahlung zerstört wird. Erfolgreicher hingegen war die Ablation einer Kapillare mit intakter Beschichtung, da diese die entstehende thermische Energie besser absorbieren und ableiten kann. Für diese Experimente wurde eine Kapillare mit einem inneren Durchmesser von 75 μm und einem Außendurchmesser von 350 μm verwendet. Die Laserablation (213 nm) arbeitete mit 100 % der Ausgangsleistung des Lasers, einer Pulsfrequenz von 20 Hz und einer Bewegungsgeschwindigkeit des Laserstrahls von 100 $\mu\text{m/s}$. Der Durchmesser des Laserstrahls betrug 200 μm .



Abbildung 4.20: Foto einer Kapillare unter dem Mikroskop

In Abbildung 4.20 ist das Foto einer Kapillare unter dem Mikroskop der Laserablation gezeigt. Der große äußere Durchmesser im Vergleich zum Inneren ist gut zu erkennen.

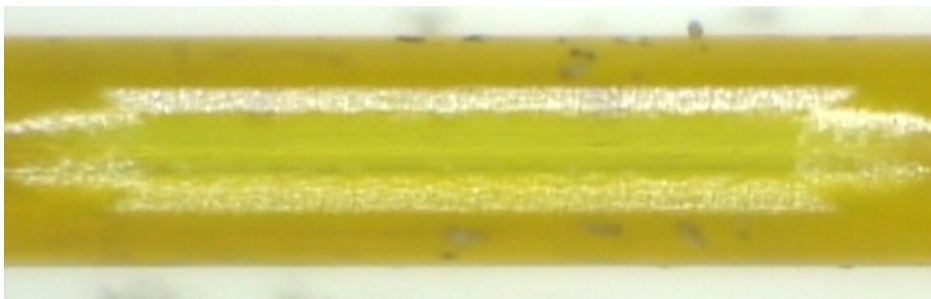


Abbildung 4.21: Foto einer Kapillare nach einseitigem Laserbeschuss

Abbildung 4.21 zeigt eine Fotografie, nachdem die Kapillare einseitig mit dem Laser beschossen wurde. Die Kapillare ist durch den Schutz der Beschichtung intakt geblieben. Damit bei der Detektion nicht nur das Laserlicht auf eine ebene Fläche trifft, sondern auch die Fluoreszenz besser gebündelt werden kann, wurde die Kapillare um 90° gedreht und erneut beschossen (Abbildung 4.22).



Abbildung 4.22: Fotografie einer Kapillare nach zweimaligem Beschuss

Abbildung 4.22 zeigt ein Foto der Kapillare nach Ablation von zwei Seiten im 90° Winkel. Auch nach dem zweiten Beschuss ist die Kapillare weiterhin intakt. Am oberen Rand ist die Abtragung von der Fläche der Kapillare gut zu erkennen. Durch diese Abtragung konnte die ursprüngliche runde Oberfläche abgeflacht und so das Ziel einer ebenen Oberfläche für die Ein- bzw. Auskopplung des Lichts erreicht werden.

Nach erfolgreicher Präparierung der Kapillare wurde diese in der CE mit einer Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L) befüllt und in der optischen Bank (Abbildung 4.17) fixiert. Zum Vergleich wurden eine Kapillare mit unversehrter und eine mit auf herkömmlichem Wege durch Verbrennung entfernter Polyimidbeschichtung (Abbildung 4.23) getestet.

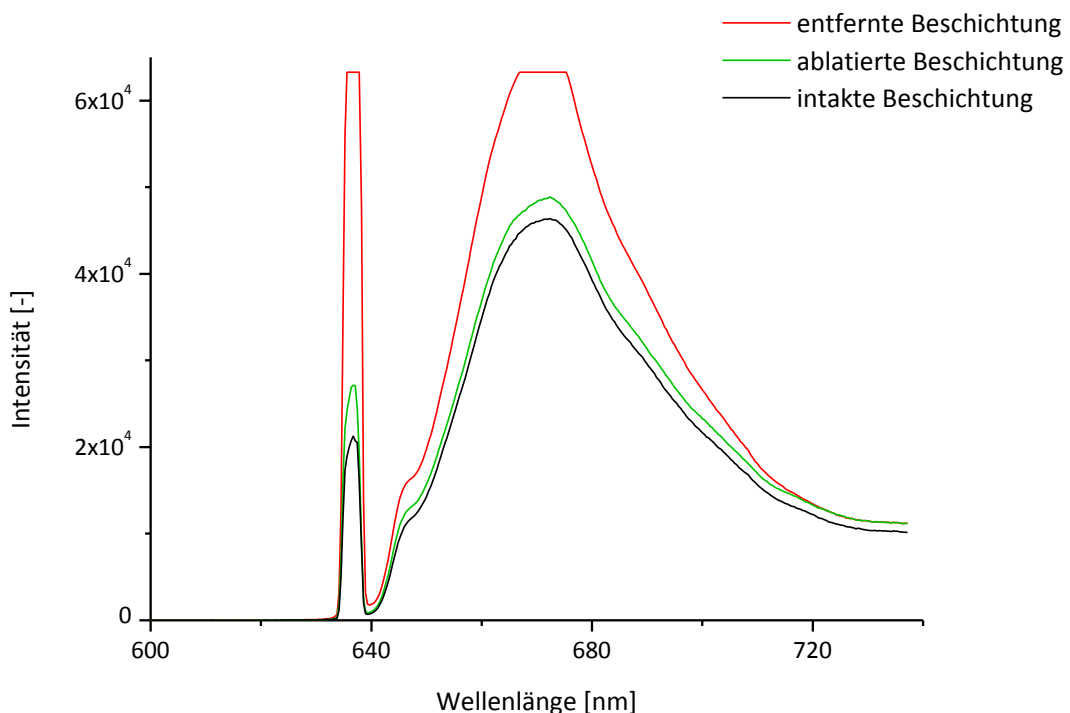


Abbildung 4.23: Spektren mit Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L) gefüllten Kapillaren mit entfernter, ablatierter und intakter Beschichtung

Wie in Abbildung 4.23 dargestellt, konnte durch Ablation der Kapillare eine Verringerung der gestreuten Laserstrahlung auf weniger als ein Drittel des ursprünglichen Wertes erreicht werden. Ein unerwartet gutes Fluoreszenzsignal wurde für die Kapillare mit unversehrter Beschichtung erhalten, die Beschichtung weist eine sehr hohe Durchlässigkeit für rote bzw. nahinfrarote Strahlung auf. Ein großes Problem ist jedoch die Ausrichtung der mittels Laserablation optimierten Kapillare. Die abgeflachte Stelle der Kapillare weist eine sehr kleine Fläche von nur $200\ \mu\text{m} \times 2\ \text{cm}$ auf. Somit ist es sehr schwierig, diese an die richtige Position zu bringen.

Die Positionierung ist praktisch nicht reproduzierbar und zudem ist der Unterschied zur Kapillare mit vollständig entfernter Beschichtung marginal. Daher wurden bei weiteren Versuchen Kapillaren mit herkömmlichen Detektionsfenstern verwendet. Für den roten Spektralbereich liefert eine Kapillare mit vollständiger Beschichtung eine ähnlich gute Verminderung der Streuung, allerdings ist die Positionierung bei dieser problemlos reproduzierbar.

4.6.7 Linsenvariation am Laser

Weiteres Verbesserungspotential birgt die serienmäßige Linse des Lasers. Die vom Hersteller eingebaute Linse ist nicht für eine Fokussierung auf sehr kurze Abstände von wenigen Zentimetern ausgelegt. Damit ein Wechsel der vorinstallierten Linsen möglich war, musste zunächst ein

Einsatz konstruiert werden, der es erlaubt, Laser verschiedener Hersteller mit individuellen Linsen auszustatten.

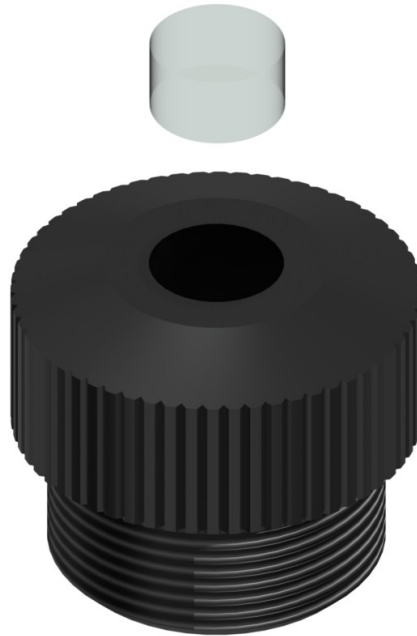


Abbildung 4.24: Individuell hergestellter Linseneinsatz für den Diodenlaser der Firma Roithner

Abbildung 4.24 zeigt einen der speziell gebauten Linseneinsätze für Diodenlaser der Firma Roithner. Insgesamt wurden sechs unterschiedliche Linsen verglichen, wozu drei Kollimatoren der Firma Philips (Nr. 2, 3 und 6), eine asphärische Linse der Firma Edmund Optics (Nr. 5) und die GS-8019A-Linse der Firma Roithner (Nr. 4) sowie die Originallinse gehörten (Nr. 1, vgl. Tabelle 4.3). Der Vergleich wurde an der optischen Bank (Abbildung 4.17) durchgeführt. Hierzu wurde eine Kapillare mittels CE mit einer Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L) befüllt und in den dafür vorgesehenen Halter an der Bank fixiert. Anschließend wurden der Laser und die Detektionseinheit (Linse, Filter, Glasfaser) auf die maximale

Fluoreszenzintensität eingestellt. Für jede Linse wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 4.3: Eigenschaften sowie die Nummerierung der getesteten Linsen

Nr.		numerische Apertur (NA)	Brennweite (f) [mm]	optimaler Kapillarabstand [cm]
1	Originallinse	unbekannt	unbekannt	3,5
2	Philips-Kollimator	0,12	18,24	- / -
3	Philips-Kollimator	0,2	10	5,5
4	GS-8019A	0,3	8	1,3
5	Asphärische Linse	0,3	6,2	2,4
6	Philips-Kollimator	0,4	4,62	2,2

In der Tabelle 4.3 sind die numerische Apertur (NA), die Brennweite (f), der experimentell festgestellte optimale Abstand des Lasers zur Kapillare und die verwendete Nummerierung aufgeführt. Die Parameter der Originallinse (Nr. 1) sind unbekannt, können aber zwischen denen der asphärischen Linse der Firma Edmund Optics (Nr. 5) und dem Philips-Kollimator (Nr. 3) mit einer numerischen Apertur von 0,2 anhand der gewonnenen Daten eingeordnet werden. Der Abstand der Linsen zur Laserdiode betrug in allen Fällen etwa 1 cm, mit Ausnahme der GS-8019A-Linse der Firma Roithner (Nr. 4). Für diese wurde ein verlängerter Linseneinsatz verwendet, sodass hier der Abstand zur Laserdiode etwa 2 cm betrug und die Distanz zur Kapillare entsprechend kürzer war, um eine Fokussierung zu ermöglichen. Die durchgeführten Messungen sind in der Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Vergleich sechs verschiedener Laserlinsen mit der Standardabweichung (SD) und der relativen Standardabweichung (RSD) der durchgeführten Dreifachbestimmung

Nr.		Intensität [-]	SD [-]	RSD [%]
1	Originallinse	46414	3935	8,5
2	Philips-Kollimator (NA=0,12)	- / -	- / -	- / -
3	Philips-Kollimator (NA=0,2)	42805	3133	7,3
4	GS-8019A	51548	3108	6,0
5	Asphärische Linse	62440	1477	2,4
6	Philips-Kollimator (NA=0,4)	38377	3484	9,1

Wie in der Tabelle 4.4 aufgeführt ist, konnten für den Philips-Kollimator mit einer numerischen Apertur von 0,12 (Nr. 2) keine Messungen durchgeführt werden. Der notwendige Abstand zur Fokussierung des Laserstrahls war größer als 30 cm und konnte somit nicht an der optischen Bank eingestellt werden. Eine derart lange Strecke ist zudem nicht mit einem kompakten Detektionssystem vereinbar. Zur besseren Übersicht des Vergleichs wurden die Daten in einem Balkendiagramm zusammengefasst (Abbildung 4.25).

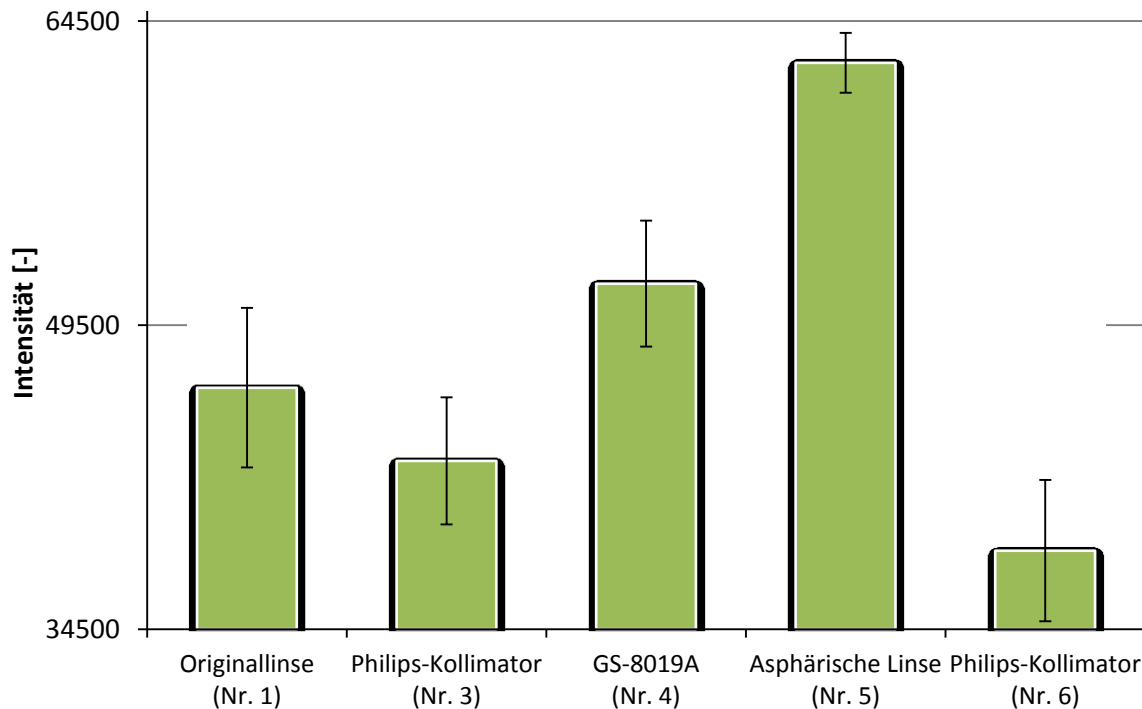


Abbildung 4.25: Vergleich verschiedener Laserlinsen mit Standardabweichungen für eine Oxazin-1-Lösung (10^{-4} mol/L)

In dem Balkendiagramm in Abbildung 4.25 ist gut zu sehen, dass für die asphärische Linse (Nr. 5) die höchste Intensität mit der kleinsten relativen Standardabweichung erreicht wurde. Allgemein ist ein Trend zu höheren Intensitäten bei Verwendung von Linsen mit größeren numerischen Aperturen, mit einem Maximum bei einer Apertur von 0,3, zu beobachten. Die kleine Standardabweichung der Intensitäten bei Messungen mit der asphärischen Linse (Nr. 5) liegt vermutlich an der Antireflexionsbeschichtung, welche für einen Wellenlängenbereich von 600 bis 1050 nm optimiert ist. Diese Linse der Firma Edmund Optics ist eine kompakte, gepresste Linse, die speziell für Laser und Messsysteme hergestellt wird und im Durchschnitt eine Reflexion von weniger als 0,4 % über den gesamten Wellenlängenbereich der Beschichtung aufweist. Der

Oberflächenradius einer asphärischen Linse ändert sich in Abhängigkeit vom Abstand zur optischen Achse, wodurch die sphärische Aberration korrigiert werden kann. Die sphärische Aberration beschreibt den Schärfefehler bei parallel einfallenden Lichtstrahlen, welche nach der Linse nicht in einem Punkt zusammenlaufen, da sie nicht die gleiche Schnittweite haben. Außerdem können andere Aberrationen gegenüber einer normalen sphärischen Linse deutlich verringert werden, wodurch sich bessere optische Eigenschaften ergeben.

Für alle folgenden Messungen wurde somit die asphärische Laserlinse der Firma Edmund Optics (Nr. 5) verwendet, da mit ihr im Vergleich zur ursprünglich eingebauten Linse um über ein Drittel höhere Intensitäten bei kleineren Standardabweichungen erreicht werden und der Abstand zwischen dem Laser und der Kapillare um 11 mm auf 24 mm verringert werden kann, wodurch sich ein kompakterer und robusterer Aufbau des Detektionssystem ergibt.

4.6.8 Optimierung der Glasfaser

Um die Leistungsfähigkeit des Detektionssystems weiter zu optimieren, sollte neben den bisher gezeigten Komponenten auch die mitgelieferte Glasfaser des Spektrometers verbessert werden. Diese ist als einfacher Stahlzylinder mit einem Durchmesser von 6 mm, in dem der 400 µm Glaskern eingefasst ist, konstruiert (Abbildung 4.26).

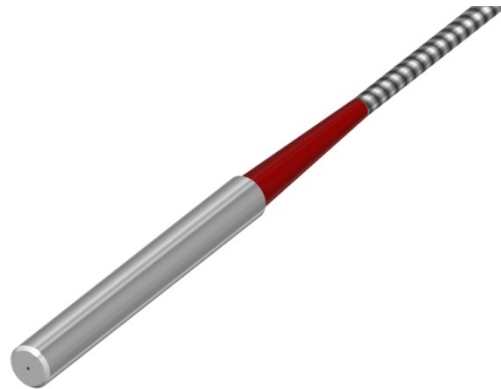


Abbildung 4.26: Glasfaser des Kompaktspektrometers

Die Geometrie dieser Glasfaser ist für eine direkte und flexible Lichtaufnahme an der Probe ausgelegt und somit nicht als stationäres Bauteil in einem Detektionssystem geeignet. Um das Detektionssystem für übliche Glasfaserausführungen kompatibel zu machen und eine höhere Robustheit zu erlangen, sollte eine Glasfaser mit einem SMA 905-Anschluss verwendet werden. Der SMA 905-Anschluss (Abbildung 4.27) ist genormt und weit verbreitet, sodass ein Wechsel der Glasfaser schnell und einfach möglich ist.

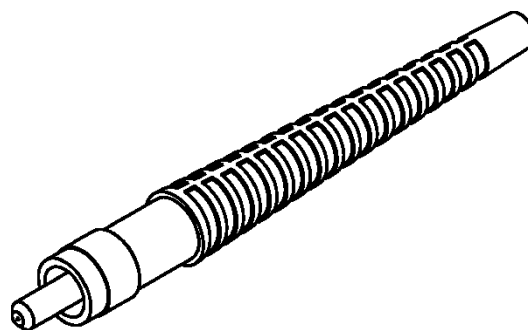


Abbildung 4.27: Glasfaser mit SMA 905-Anschluss

Zusätzlich soll eine Glasfaser mit einem größeren Innendurchmesser verwendet werden, um den Einfluss auf die Empfindlichkeit des Systems zu untersuchen. Dazu wurde neben der Glasfaser mit einem

Innendurchmesser von 400 μm ebenfalls ein Innendurchmesser von 600 μm gewählt.

Die Vergleichsexperimente wurden an der optischen Bank (Abbildung 4.17) durchgeführt. Hierzu wurde eine Kapillare mittels CE mit einer Oxazin-1-Lösung ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) befüllt und in den dafür vorgesehen Halter an der Bank fixiert. Anschließend wurden der Laser und die Detektionseinheit (Linse, Filter, Glasfaser) auf die maximale Fluoreszenzintensität eingestellt. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt.

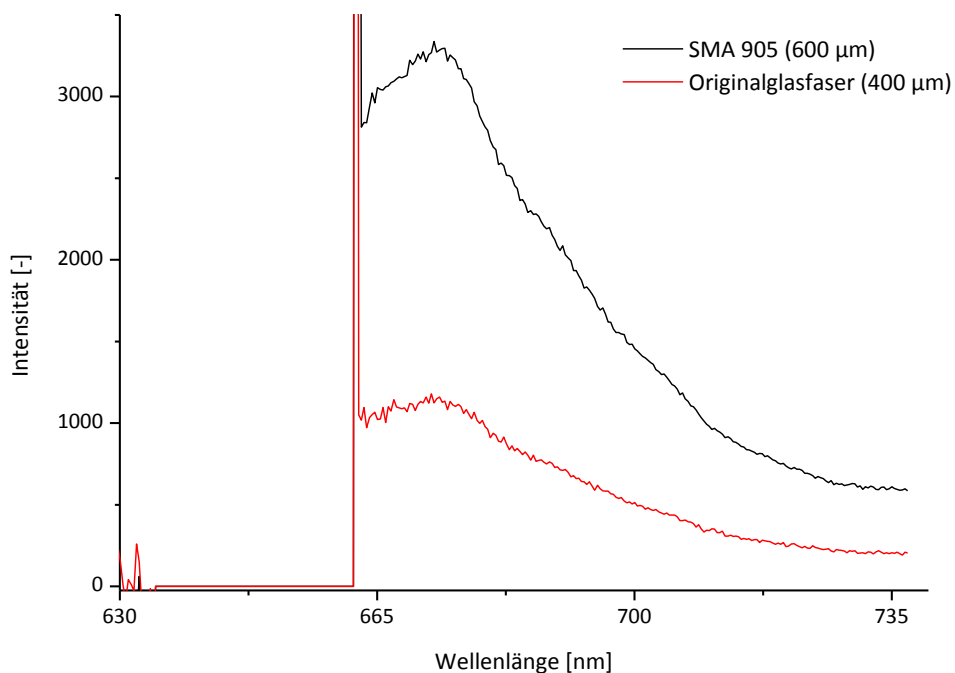


Abbildung 4.28: Spektrum einer mit Oxazin-1-Lösung ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) gefüllten Kapillare unter Verwendung zwei verschiedener Glasfasern (400 μm und 600 μm)

In Abbildung 4.28 sind zwei Spektren, die unter Verwendung unterschiedlicher Glasfasern aufgenommen wurden, dargestellt. Im

Vergleich zur ursprünglichen Faser wurde mit der 600 μm -Glasfaser beinahe eine Verdreifachung der Intensität erreicht. Um zu zeigen, dass auch unter Trennbedingungen diese Verbesserung zu beobachten ist, wurde die kapillarelektrophoretische Trennung aus Kapitel 4.5.4 mit einer Oxazin-1-Lösung ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/L) durchgeführt. Während einer Trennung befindet sich wesentlich weniger Analytlösung in der Kapillare als bei der Optimierung an der optischen Bank, die Probenlösung ist zudem durch die elektrophoretische Trennung zu einer schmalen Bande komprimiert, sodass die Fluoreszenz aus einem kleineren Volumen emittiert wird. Dies würde bedeuten, dass der Vorteil des größeren Glasfaserdurchmessers unter Trennbedingungen nicht zum Tragen kommen könnte.

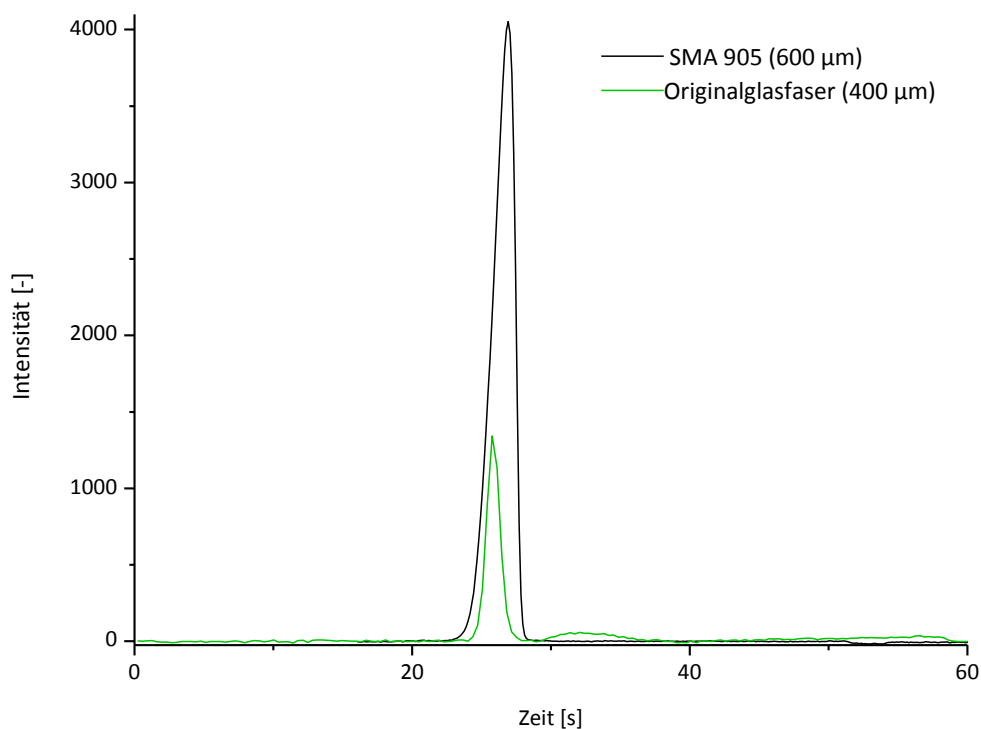


Abbildung 4.29: Elektropherogramm einer Oxazin-1-Lösung ($5 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $\lambda_{\text{ex}}=635$ nm, $\lambda_{\text{em}}=671$ nm, Bandbreite=10 Pixel) mit der Originalglasfaser (400 μm) bzw. der mit SMA 905-Anschluss (600 μm)

Die beiden Elektropherogramme in Abbildung 4.29 belegen, dass die Intensitätserhöhung auch für elektrophoretische Trennungen beobachtet werden kann. Interessant ist vor allem die Intensitätszunahme des Signals um beinahe 200 %. Dies lässt sich zum einen durch den um 200 μm größeren Durchmesser der Glasfaser erklären. Dadurch wächst die Querschnittsfläche um den Faktor 2,2, sodass bei einem Brennpunktradius $>300 \mu\text{m}$ mehr Fluoreszenzlicht ins Spektrometer gelangt. Zum anderen ist die Einkopplung des Lichts in eine breitere Faser einfacher, da auf diese besser fokussiert werden kann.

Für alle folgenden Messungen wurde die Glasfaser mit SMA 905-Anschluss verwendet, da durch den größeren Durchmesser eine höhere Sensitivität erreicht wird und der genormte Anschluss jederzeit einen einfachen Wechsel der Glasfaser erlaubt.

4.6.9 Bandbreitenoptimierung

Nach den technischen Optimierungsschritten des Aufbaus sind die instrumentellen Parameter, wie der Kapillardurchmesser und die Bandbreite, zu charakterisieren, bevor die analytischen Leistungsdaten (Nachweisgrenze, linear dynamischer Arbeitsbereich) bestimmt werden können. Zur Optimierung der Bandbreite des Spektrometers, also des Wellenlängenbereiches, von dem in der Software des Spektrometers ein Mittelwert gebildet wird, wurde die Oxazin-1-Trennung aus Kapitel 4.5.4 (10^{-7} mol/L , Dreifachbestimmung) für unterschiedliche Bandbreiten (3, 5, 10, 15 und 20 Pixel) durchgeführt. Die Mittelwerte der

integrierten Signalflächen und deren Standardabweichungen sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Vergleich verschiedener Bandbreiten mit der Standardabweichung (SD) bzw. relativen Standardabweichung (RSD) der durchgeführten Dreifachbestimmung

Bandbreite [Pixel]	Fläche [-]	SD [-]	RSD [%]
3	203,3	1,7	0,8
5	224,0	8,8	3,9
10	210,5	11,1	5,3
15	199,3	7,7	3,8
20	198,2	4,1	2,1

In Tabelle 3.2 ist der zu erwartende Trend von abnehmender Signalintensität bei größeren Bandbreiten zu sehen. Bei Verwendung größerer Bandbreiten wird zunehmend über Wellenlängen, die nicht in der Nähe der maximalen Fluoreszenzemission sind, der Mittelwert gebildet. Dadurch wird das Signal kleiner, im gleichen oder stärkeren Maße sollte allerdings auch das Rauschen geringer werden und so ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis resultieren.

Um dies zu bestimmen wurde für jede Messung als Rauschen die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem drifffreien Bereich berechnet und in Relation zur Signalhöhe gesetzt. Die Mittelwerte des Rauschens sowie der Peakhöhe und das ermittelte Signal/Rausch-Verhältnis sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Vergleich des Signal/Rausch-Verhältnisses (S/N) verschiedener Bandbreiten

Bandbreite [Pixel]	Rauschen [-]	Signalhöhe [-]	S/N [-]
3	2,24	53,5	23,9
5	1,59	50,5	31,7
10	1,07	47,9	44,6
15	0,86	49,7	57,6
20	0,85	47,9	56,6

Tabelle 4.6 belegt die Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses bei Vergrößerung der Bandbreite. Das Maximum liegt bei einer Bandbreite von 15 Pixeln. Die Bandbreite von 20 Pixeln entspricht etwa 6 nm, sodass in diesem Fall der Mittelwert über den Bereich von 665 nm bis 677 nm gebildet wird. Der Bereich um 665 nm weist ein erhöhtes Rauschen durch die Streustrahlung des Lasers auf (vergl. Abbildung 4.19), wodurch sich das gesamte Signal/Rausch-Verhältnis verschlechtert und sich so ein Verhältnismaximum bei einer Bandbreite von 15 ergibt. Auf eine verfeinerte Optimierung der Bandbreite wurde verzichtet, weil der Unterschied des Signal/Rausch-Verhältnisses zwischen den Bandbreiten 15 und 20 Pixeln nur etwa 2 % beträgt. Für eine genaue Optimierung der Bandbreite wäre eine Änderung des Parameters nach der Messung vorteilhaft. Auf diese Weise könnte leichter zwischen Abweichungen durch statistische Verteilung der einzelnen Messungen und jenen durch die geänderte Bandbreite unterschieden werden. Auch schränkt die symmetrische Bandbreite die Flexibilität bei der Bandbreitenauswahl ein, besser wäre eine unabhängige Einstellung der beiden Grenzen zur Mittelwertbildung.

Alle folgenden Messungen wurden mit einer Bandbreite von 15 Pixeln durchgeführt, da diese Einstellung das beste Signal/Rausch-Verhältnis zeigt.

4.6.10 Optimierung des Kapillardurchmessers

Zur Optimierung des Innendurchmessers der Kapillare wurde die Oxazin-1-Trennung aus Kapitel 4.5.4 ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/L, Dreifachbestimmung) mit unterschiedlichen Kapillardurchmessern (50, 75, 100 und 150 μm) durchgeführt. Als Länge der Kapillare wurden 60 cm (effektiv 45 cm) gewählt, um auch komplexere Trennungen mit langer Trennzeit zu simulieren. Die Mittelwerte der Signalthöhen und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind in Abbildung 4.30 zusammengefasst.

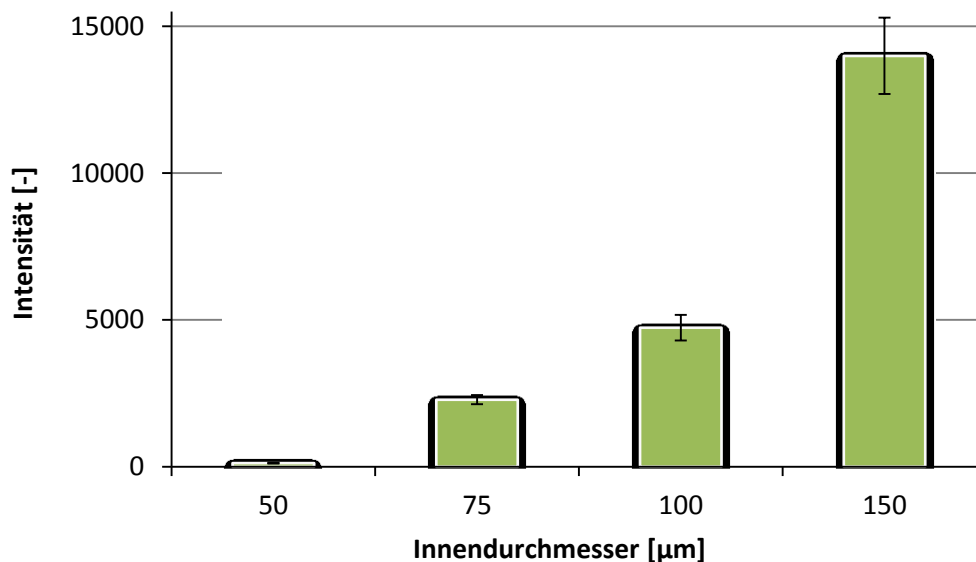


Abbildung 4.30: Signalthöhen und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken) des Vergleichs verschiedener Kapillarinnendurchmesser mittels einer elektrophoretischen Oxazin-1-Trennung ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/L, $\lambda_{\text{ex}}=635$ nm, $\lambda_{\text{em}}=671$ nm, Bandbreite=15 Pixel)

Anhand des Balkendiagramms in Abbildung 4.30 ist gut zu sehen, dass mit Vergrößerung des Kapillarinneendurchmessers eine Signalerhöhung einhergeht. Diese Zunahme kann auf zwei Faktoren zurückgeführt werden. Zum einen ist bei gleichbleibendem Injektionsdruck und gleichbleibender Injektionszeit das Injektionsvolumen der Probe in breiteren Kapillaren größer, wodurch ein stärkeres Fluoreszenzsignal resultiert. Zum anderen ist es einfacher, den Laserstrahl in breitere Kapillaren zu fokussieren und es wird so eine bessere Anregung erreicht. Ein Problem stellt jedoch der Verlust an Auflösung, der mit einem größeren Kapillardurchmesser einhergeht, dar. Ab einem Durchmesser von 100 μm kann Peaktailing beobachtet werden (Abbildung 4.31).

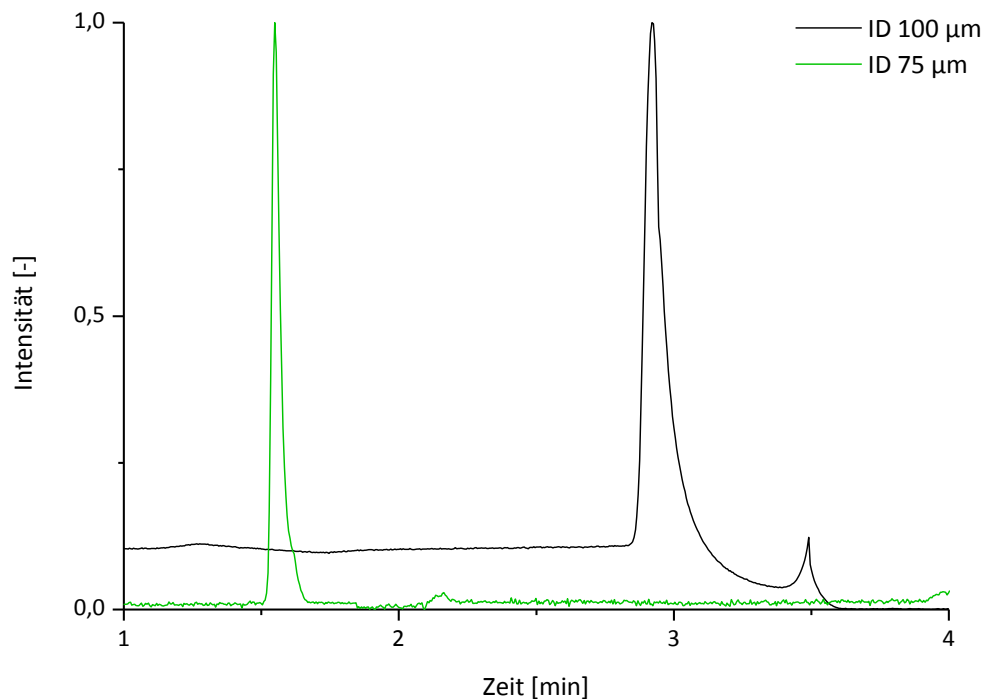


Abbildung 4.31: Normierte Elektropherogramme einer Oxazin-1-Lösung ($2 \cdot 10^{-6}$ mol/L) mit zwei verschiedenen Kapillarinneendurchmessern (75 μm , 100 μm)

Die Elektropherogramme in Abbildung 4.31 zeigen die Unterschiede zwischen den beiden Innendurchmessern 75 μm und 100 μm bezüglich

der Trennqualität. Im Vergleich zur 75 µm-Kapillare geht die Verwendung einer 100 µm-Kapillare mit einer Verdopplung der Migrationszeit des Modellanalyten einher. Zudem kann eine Verbreiterung des Signals beobachtet werden. Während bei Verwendung der schmaleren Kapillare das Signal lediglich eine Breite von 8,7 s aufweist, ist das Signal bei Verwendung der breiteren Kapillare 19 s breit. Dies bedingt einen deutlichen Verlust an analytischer Auflösung. Zudem ist bei der 100 µm-Kapillare eine Absenkung der Basislinie nach dem Signal und ein insgesamt höheres Untergrundsignal zu beobachten.

Zwar kann mit größeren Kapillarinneindurchmessern eine verbesserte Sensitivität erreicht werden, jedoch nur mit Verlust an analytischer Trennqualität. Daher wurden für alle folgenden Messungen Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 75 µm verwendet, da mit diesen eine sehr gute Signalschärfe, kurze Analysenzeiten und eine akzeptable Empfindlichkeit erzielt werden.

4.6.11 Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und linear dynamischer Bereich

Für die Charakterisierung des dritten Prototypen wurde Oxazin-1 als Modellanalyt verwendet. Zur Bestimmung des linearen Bereichs wurde eine Verdünnungsreihe des Oxazin-1 von 10^{-8} mol/L bis 10^{-4} mol/L mit jeweils drei Unterteilungen von Faktor 1, 2 und 5 je Dekade erstellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Trennparameter der Kapillarelektrophorese und des Kompaktspektrometers können

Kapitel 4.5.4 entnommen werden. Zusätzlich wurden die technischen Optimierungen des Systems übernommen: Es wurde ein Emissionsfilter mit einer *cut-on*-Wellenlänge von 665 nm und eine runde Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75 μm verwendet. Außerdem wurde die asphärische Linse für den Laser und die breitere Glasfaser (600 μm) mit einem SMA 905-Anschluss eingebaut. Die Bandbreite des Spektrometers wurde auf 15 Pixel eingestellt.

Als Nachweisgrenze ($S/N=3$) konnte für Oxazin-1 die Probenkonzentration $2 \cdot 10^{-8}$ mol/L bestimmt werden. Als Bestimmungsgrenze ($S/N=10$) wurde eine Probenkonzentration von $6,7 \cdot 10^{-8}$ mol/L erhalten. Elektropherogramme von Oxazin-1-Lösung mit Konzentrationen nahe an der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze sind in Abbildung 4.32 gezeigt.

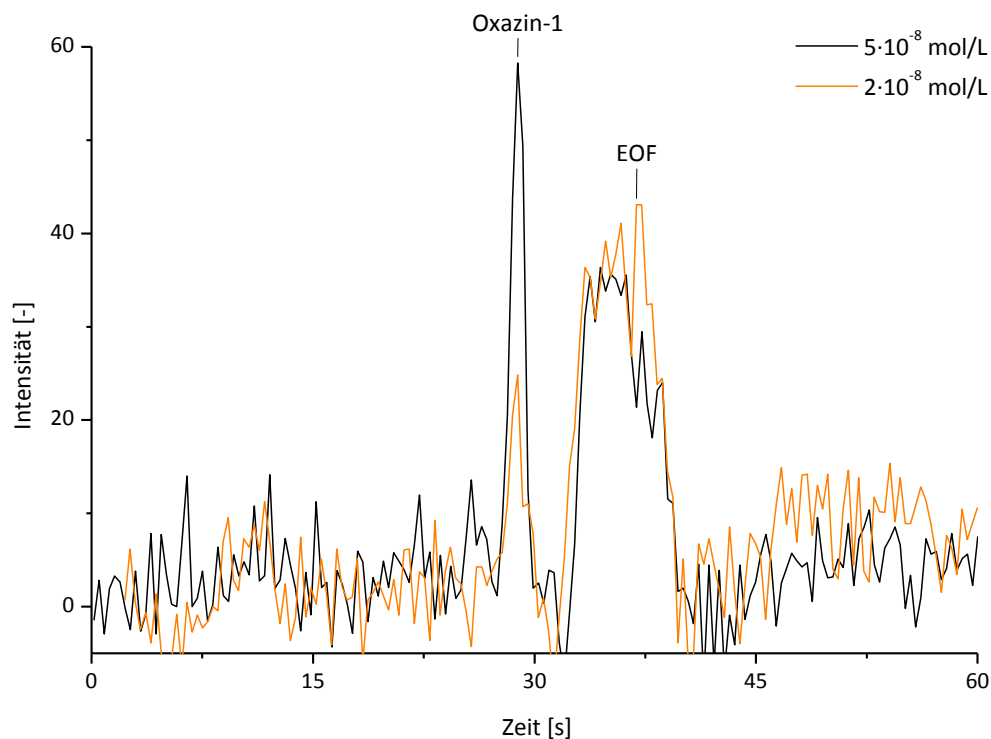


Abbildung 4.32: Elektropherogramme von Oxazin-1-Lösungen mit Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze ($2 \cdot 10^{-8}$ mol/L) bzw. der Bestimmungsgrenze ($5 \cdot 10^{-8}$ mol/L, $\lambda_{\text{ex}}=635$ nm, $\lambda_{\text{em}}=671$ nm)

Für die Bestimmung des linearen dynamischen Bereichs wurde eine Kalibrierreihe der Oxazin-1-Lösungen erstellt. Die Abbildung 4.33 zeigt die erhaltene Kalibriergerade in einer doppeltlogarithmischen Auftragung.

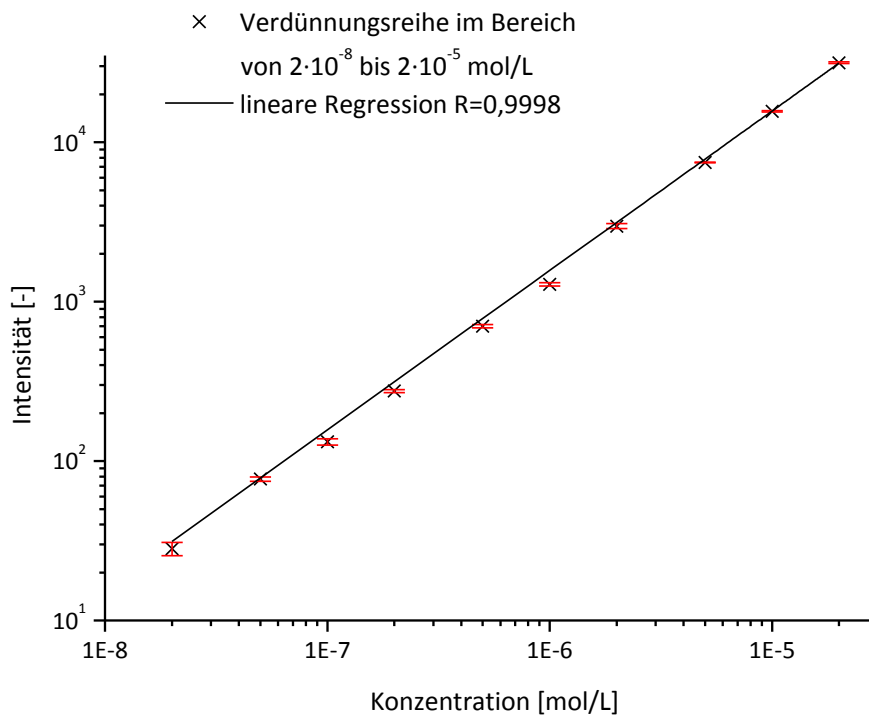


Abbildung 4.33: Linearer dynamischer Bereich in doppeltlogarithmischer Auftragung mit den Standardabweichungen (Fehlerbalken)

Anhand der Messwerte wurde eine lineare Regression durchgeführt. Im Bereich von $2 \cdot 10^{-8}$ mol/L bis $2 \cdot 10^{-5}$ mol/L wurde ein Regressionskoeffizient von $R^2=0,9998$ erhalten. Somit erstreckt sich der lineare dynamische Bereich über drei Dekaden.

4.6.12 Modelltrennung

Die entwickelte Detektionseinheit wurde ebenfalls mit einer einfachen Mischung der vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe Oxazin-1 und

Carboxynaphthofluorescein sowie Nilblau erprobt. Die Strukturformel von Nilblau ist in Abbildung 4.34 gezeigt.

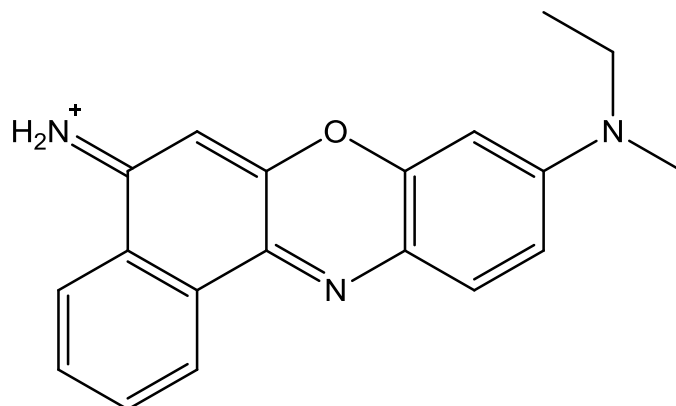


Abbildung 4.34: Strukturformel von Nilblau

Die Fluoreszenz von Nilblau ist stark vom Lösungsmittel und dessen pH-Wert abhängig. Bei den verwendeten Bedingungen ist die maximale Emissionswellenlänge 676 nm und die Anregungswellenlänge 585 nm. Aufgrund des großen Unterschieds von 50 nm zwischen der Anregungswellenlänge und der Laserwellenlänge konnte das Nilblau deutlich weniger sensitiv detektiert werden.

Vor den Messungen wurde der Laserstrahl über die Linse und die Position der Glasfaser außerhalb der CE auf die maximale Intensität eingestellt. Danach wurde die Kapillare für zehn Minuten mit 1 mol/L Natronlauge konditioniert und anschließend 30 Minuten lang mit Pufferlösung gespült.

Die Injektionszeit der Probenlösung betrug 4 s bei einem Injektionsdruck von 50 mbar, dies entspricht 200 mbar·s. Die verwendete Kapillare hatte eine Länge von 40 cm (effektiv 25 cm) und einen inneren Durchmesser von 75 μm . Es wurde ein konstanter Strom von 30 μA mit einer

resultierenden Spannung von etwa 25 kV angelegt. Als Messwellenlänge wurde 673 nm mit einer Bandbreite von 15 Pixeln gewählt. Der CCD-Chip wurde über den TE-Kühler auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Die Integrationszeit des Spektrometers betrug 300 ms und vor jeder Messung wurde der spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt.

Nach jeder Trennung wurde die Kapillare eine Minute lang mit Pufferlösung gespült. Es wurde ein 100 mmol/L Boratpuffer mit einem pH-Wert von 8,4 genutzt (Herstellung s. Kapitel 3.2.3).

Mit den verwendeten Parametern konnte eine schnelle Trennung der drei Analyten entwickelt werden, dabei sind jedoch Oxazin-1 und Nilblau nicht basisliniengetrennt (Abbildung 4.35).

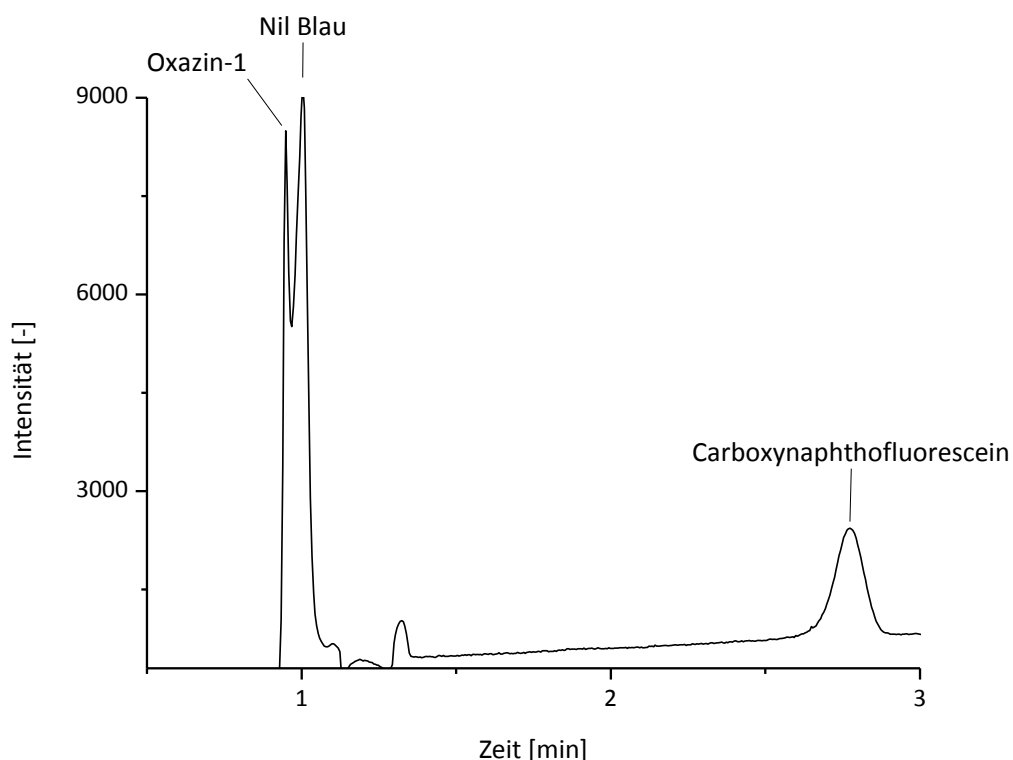


Abbildung 4.35: Elektropherogramm einer Mischung aus Oxazin-1 ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/L), Nilblau (10^{-5} mol/L) und Carboxynaphthofluorescein ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/L)

Das Elektropherogramm in Abbildung 4.35 zeigt die Trennung der drei Analyten Oxazin-1 ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/L), Nilblau (10^{-5} mol/L) und Carboxynaphthofluorescein ($5 \cdot 10^{-7}$ mol/L). Mit Ausnahme des Nilblaus konnte eine gute Sensitivität erzielt werden. Die Zuordnung der Migrationszeiten kann entweder per Einzelmessung erfolgen oder durch das Auswerten der aufgezeichneten Spektren (Abbildung 4.36). Das erste Signal mit einer Migrationszeit von 0,95 min entspricht dem Oxazin-1, das Zweite mit einer Migrationszeit von 1 min dem Nilblau und der Peak bei 2,8 min kann Carboxynaphthofluorescein zugeordnet werden.

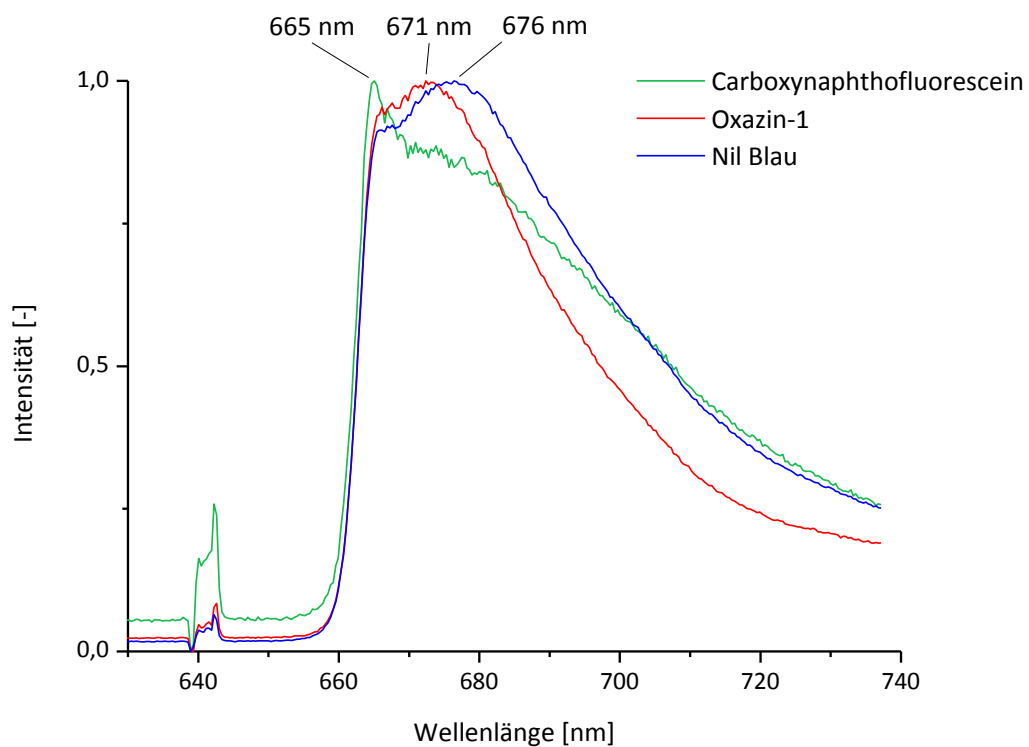


Abbildung 4.36: Normierte Spektren von Carboxynaphthofluorescein, Oxazin-1 und Nilblau

Die Identifizierung der Analyten über die Spektren in Abbildung 4.36 kann eindeutig erfolgen. Oxazin-1 und Nilblau weisen charakteristische

Emissionsmaxima mit 671 nm und 676 nm auf. Das Emissionsmaximum von Carboxynaphthofluorescein liegt bei 654 nm und kann mit dem verwendeten Filter nicht detektiert werden, deshalb ist hier eine maximale Emission von 665 nm zu beobachten, was der *cut-on*-Wellenlänge des Filters entspricht.

Mit dieser Modelltrennung können bereits die Vorteile des Detektionssystems unter Beweis gestellt werden. Es können Analyten im Vergleich zum UV/Vis-Detektor deutlich empfindlicher detektiert werden. Ebenfalls ist eine schnelle und eindeutige Identifizierung der Signale über deren Fluoreszenzspektren möglich.

4.6.13 Fazit und Ausblick

Die dritte Version des kompakten Detektionssystems erreicht gute Nachweis- ($2 \cdot 10^{-8}$ mol/L) und Bestimmungsgrenzen ($6,7 \cdot 10^{-8}$ mol/L) für Oxazin-1. Der lineare dynamische Bereich erstreckt sich über drei Dekaden. Die Anwendbarkeit wurde mit einer einfachen Trennung und Identifizierung von drei Modellanalyten aufgezeigt.

Während einer intensiven Nutzung des LIF-Systems trat jedoch ein konzeptioneller Entwicklungsfehler auf. Sollte die Kapillarkassette nicht vollständig geschlossen sein, kann die Hochspannung der CE die Strecke zwischen Elektrode und dem Metallgehäuse des Detektionssystems überbrücken. Die meistverwendete Spannung von 15-30 kV kann eine Strecke von etwa 1,5-3 cm überwinden. Das Potential gelangt vom Gehäuse in den Laser, in welchem die Diode augenblicklich zerstört wird.

Da eine komplette Abschirmung der Lasereinheit nur sehr schwer umsetzbar ist, sollte bei der Weiterentwicklung des Systems das Gehäuse vollständig aus Kunststoff gefertigt werden, um so ein Überschlagen der Spannung zu verhindern.

Experimente mit einer Photodiode als Detektor waren nicht erfolgreich. Das gestreute Laserlicht war trotz Filter zu stark, um ohne Wellenlängenauflösung vom Signal unterschieden zu werden. Der Einbau einer kleinen Optik wie bei der Glasfaser könnte dies vermutlich verbessern. Eine Fokussierung auf das Kompaktspektrometer als alleiniger Detektor würde jedoch die Optimierung der Konstruktion für diese Detektion vereinfachen.

Durch die Einführung der asphärischen Linse zur Fokussierung des Laserstrahls und die damit verbundene Verkürzung des optimalen Abstands zwischen Kapillare und Laser auf 2,4 cm kann auf ein variables Linsensystem zur Lenkung des Laserstrahls verzichtet werden. Dafür sollte eine Möglichkeit zur besseren Positionierung des Lasers entlang der z- und x-Achse konstruiert werden.

Als nicht ausreichend hat sich die Einstellmöglichkeit des Glasfaserhalters herausgestellt. Die variable Positionierung in Richtung der z-Achse erlaubt es zwar, die Glasfaser auf die Ebene des Brennpunkts der Fluoreszenzsammellinse zu bringen, eine Möglichkeit, die Faser in x- und y-Richtung zu verstellen ist jedoch ebenfalls nötig. Die manuelle Einstellung entlang der x-Achse erwies sich als zu ungenau.

Eine weitere Verkleinerung des Systems könnte durch das Ersetzen der bikonvexen Sammellinse über der Kapillare durch eine kleine Kugellinse erlangt werden. Kugellinsen haben eine sehr hohe Brechkraft, sodass der Abstand zur Glasfaser deutlich verringert werden könnte.

Um die Vorteile der Wellenlängenauflösung vollständig auszunutzen, ist zudem eine individuell angepasste Software notwendig. Das Einlesen aller Spektren einer Messung wäre für eine ausführliche Auswertung der Daten sehr hilfreich. Aus solch einem Datensatz ist eine dreidimensionale Darstellung der Messwerte möglich. Die Integration über einen frei wählbaren Wellenlängenbereich zur Elektropherogrammerstellung würde die Nachweisstärke verbessern, da nach der Aufzeichnung der Messungen der optimale Integrationsbereich gewählt werden könnte.

4.7 Vierter Prototyp

4.7.1 Einleitung

Bei der Entwicklung der vierten Version des Detektionssystems konnte auf die umfassende Erfahrung der drei vorherigen Aufbauten und der Experimente an der optischen Bank zurückgegriffen werden. So hatte es sich herausgestellt, dass eine Neukonstruktion des gesamten Systems unerlässlich ist, weil das bisherige Metallgehäuse dazu führen kann, dass die Laserdiode durch einen Überschlag der Hochspannung zerstört wird. Um den Laser zu isolieren, wurde das Gehäuse des neuen Systems aus Polyetheretherketon (PEEK) gefertigt. Es zeigte sich auch, dass eine

Positionierung der Glasfaser in x-, y- und z-Richtung notwendig ist, um ein Maximum der durch die Linse fokussierten Fluoreszenz zu detektieren. In Zusammenhang mit dieser Entwicklung wurde zudem die Halterung der Glasfaser auf den normierten SMA 905-Anschluss ausgelegt. Ebenso ist die Fokussierung des Laserstrahls durch eine leistungsstarke Linse kompakter und effizienter als ein Linsensystem. Im Austausch für eine variable Linse muss indes der Laser eine Möglichkeit zur Positionierung erhalten. Zudem konnte eine flexible Auswahl der Anregungswellenlänge des Lasers kostengünstig eingeführt werden. Die Neukonstruktion ist in Abbildung 4.37 gezeigt.

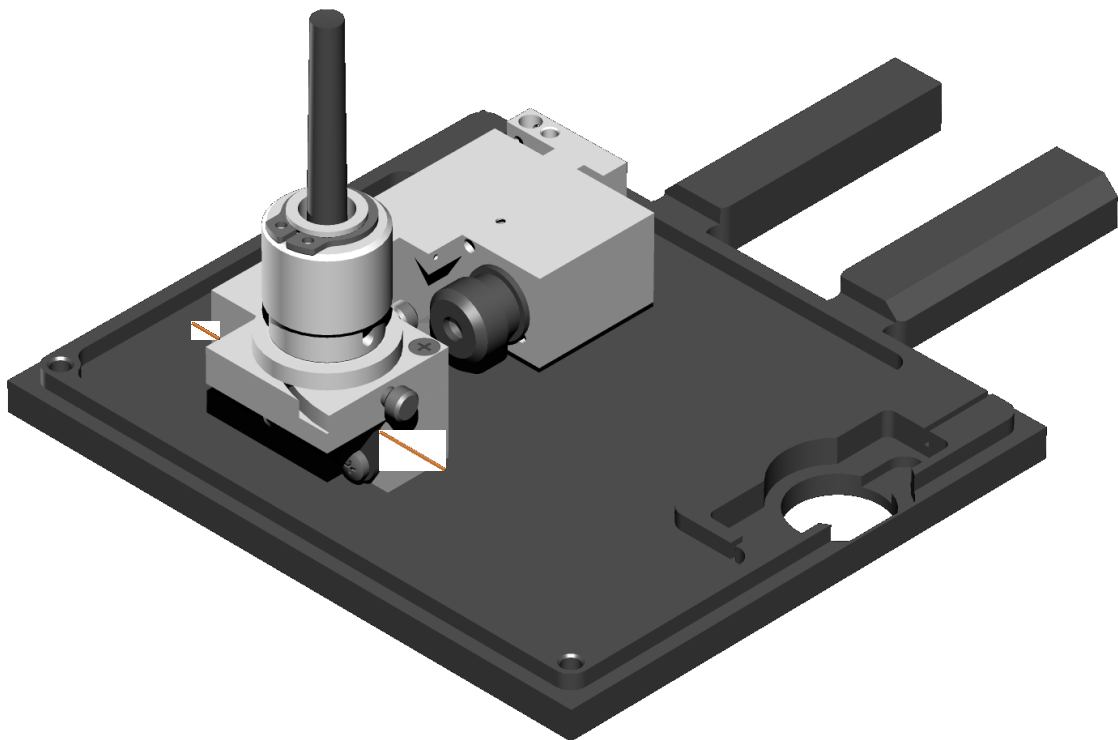


Abbildung 4.37: Vierter Prototyp eines kompakten, wellenlängenaufgelösten LIF-Systems

4.7.2 Technische Änderungen

Die größte Veränderung wurde an der Glasfaserhalterung vollzogen. Die bereits vorhandene Einstellmöglichkeit entlang der z-Achse wurde durch eine kleine Plattform ergänzt, wodurch eine Ausrichtung in x- und y-Richtung möglich ist. Dabei befindet sich die Glasfaser in einem Zylinder, der über zwei Schrauben gegen eine Blattfeder frei positioniert werden kann. Bereits in den Zylinder integriert sind der Emissionsfilter und die Kugellinse aus Quarz ($\varnothing=4$ mm). Diese Anordnung ermöglicht die Ausrichtung des kompletten optischen Systems aus Linse, Filter und Glasfaser, wobei sich die drei Elemente stets zentriert übereinander befinden. Dadurch kann die Position mit der geringsten Streustrahlung und maximaler Fluoreszenz gefunden werden.

Eine weitere Entwicklung betrifft die Laserhalterung. Durch den Einsatz einer asphärischen Linse konnte auf eine variable Linsenkomination verzichtet, der Abstand zur Kapillare verringert und stattdessen die Positioniermöglichkeit des Lasers erweitert werden. Dieser kann nun entlang der x-Achse verschoben und über einen Kippmechanismus gegen eine Feder in z-Richtung eingestellt werden. Diese Variabilität ermöglicht es, die maximale Photonendichte in die Kapillare einzubringen. Außerdem kann der Laserstrahl auf eine minimale Streuung in Richtung der Glasfaser justiert werden. Zur besseren Übersicht der Veränderungen ist das LIF-System in Abbildung 4.38 von der Rückseite abgebildet.

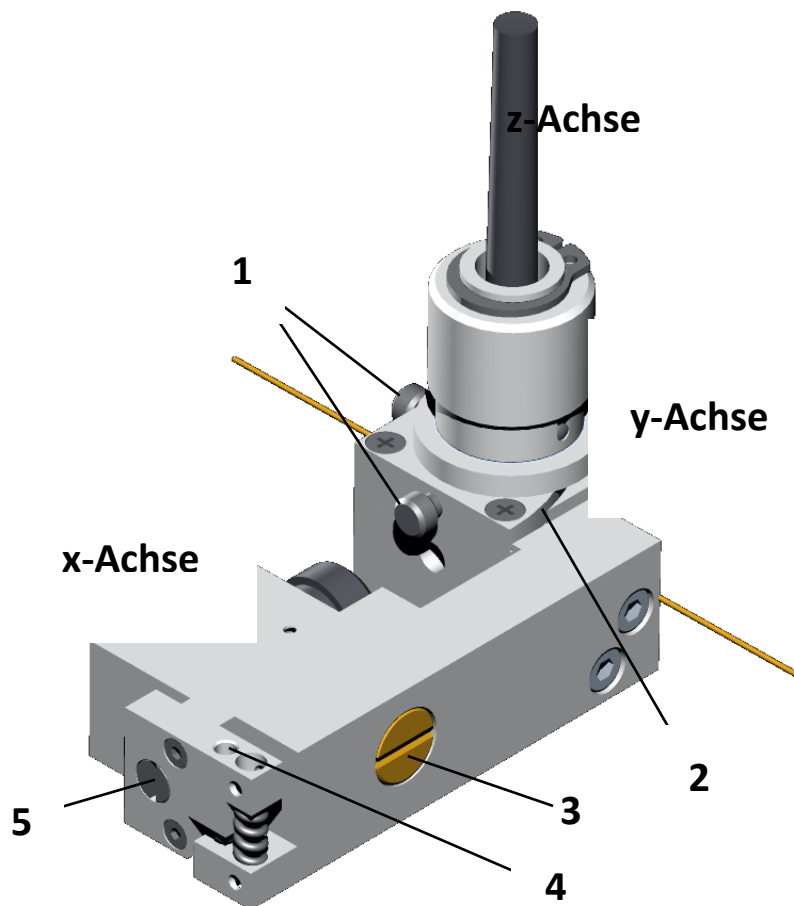


Abbildung 4.38: Dimetrische Projektion des kompletten Gehäuses: 1 Stellschrauben des Glasfaserhalters für x- bzw. y-Verstellung, 2 Blattfeder, 3 Kippachse des Lasers, 4 Stellschraube des Laserkipmechanismus, 5 Verstellung des Lasers in x-Richtung

Die Glasfaserhalterung kann, wie in Abbildung 4.38 dargestellt, über zwei Stellschrauben in x- bzw. y-Richtung über einen Bereich von jeweils ± 5 mm justiert werden. Die Verstellung entlang der z-Achse ist analog zur vorherigen Version angebracht. Der Diodenlaser ist in einer eigenen Einheit, die auch zur besseren Isolation dient, untergebracht. Die Lasereinheit kann an dessen Achse in z-Richtung um $\pm 2,5$ mm gekippt und entlang der x-Achse in einem Bereich von 10 mm verschoben werden. Eine vollständige Übersicht der Bauteile ist in der folgenden Explosionsansicht aufgeführt.

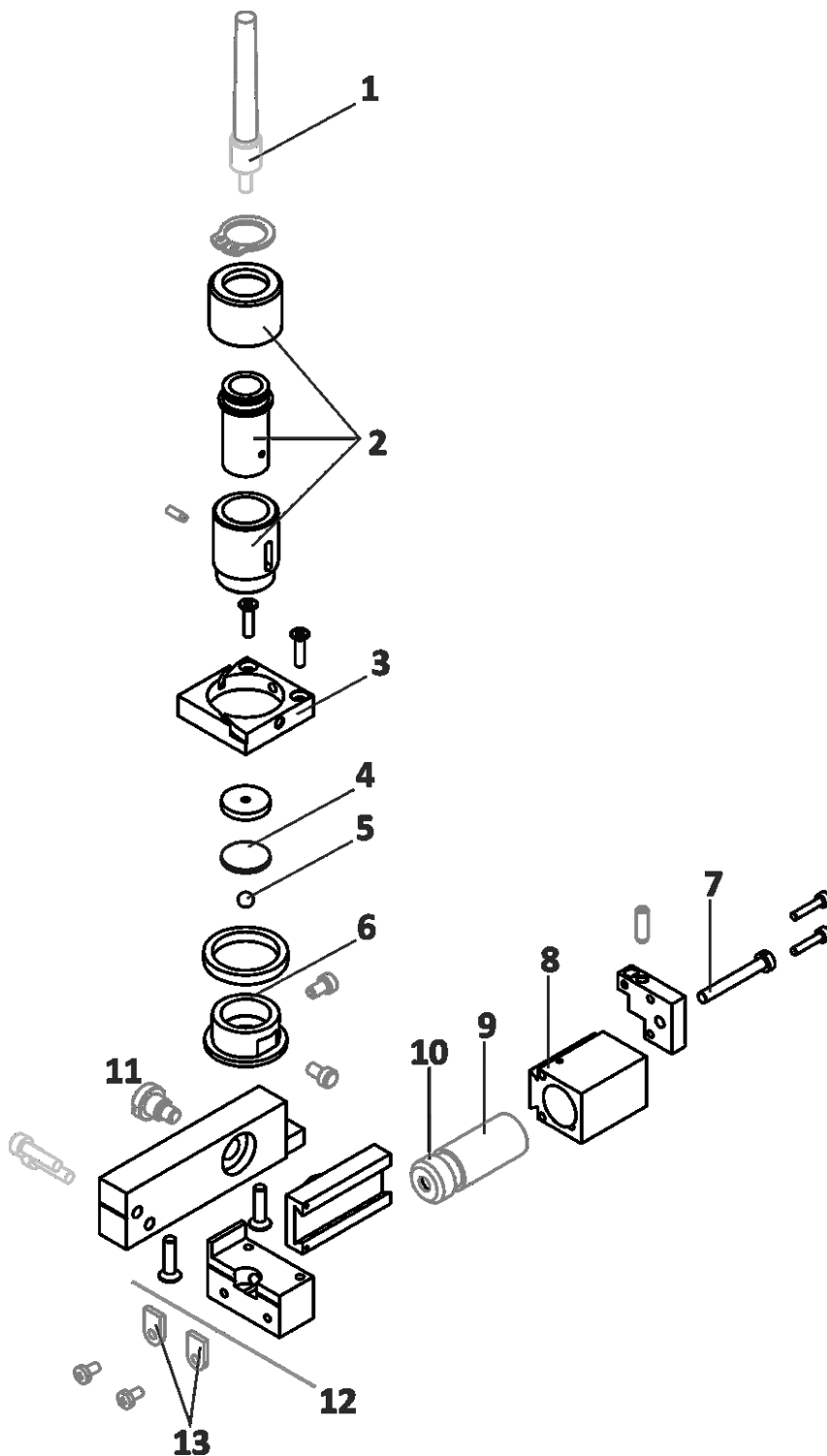


Abbildung 4.39: Explosionsansicht des vierten Prototyps: 1 Glasfaser, 2 Glasfaserhalterung, 3 x- und y-Rahmen, 4 Emissionsfilter, 5 Kugellinse, 6 Zylinder für Glasfaser, Filter und Linse, 7 Laserstellschraube in x-Richtung, 8 Lasereinheit, 9 Diodenlaser, 10 Laserlinsenhalter mit asphärischer Linse, 11 Laserkipkachse, 12 Kapillare, 13 Kapillarenfixierung

Der Einbau dieser umfassenden Einstellmöglichkeiten und das neue Material macht diesen Aufbau mit insgesamt 79 mm um 17 mm länger als die Vorversion. Die Breite ist mit 36,5 mm etwa gleich geblieben. Es konnten jedoch durch die Verwendung der Kugellinse und durch den Verzicht auf eine Photodiodeinheit 6 mm in der Höhe eingespart werden, sodass das System nur noch 45 mm hoch ist. Als Gehäusematerial wurde PEEK wegen seiner sehr guten Isolationseigenschaften und der hohen Beständigkeit gegen mechanische, thermische und chemische Einflüsse gewählt. Zudem sollten im Gegensatz zum Metallgehäuse nun keine Überschlüsse der Hochspannung mehr zu beobachten sein.

4.7.3 Lasergehäuse im Eigenbau

Für eine breite Anwendbarkeit des LIF-System ist es wichtig, eine hohe Flexibilität bezüglich der Anregungswellenlänge möglichst kostengünstig realisieren zu können. Aktuell sind Diodenlaser die günstigste Laservariante. Allerdings weisen die kommerziell erhältlichen Laser unterschiedliche Bauformen und Größen auf. Daher wurde in diesem System ein eigens konstruiertes Lasergehäuse eingesetzt. Dieses Gehäuse ist für Laserdioden mit der genormten Bauform TO 5,6, was einem Basisdurchmesser von 5,6 mm entspricht, ausgelegt. Eine Zeichnung der TO 5,6-Bauform ist in Abbildung 4.40 dargestellt und das Lasergehäuse ist mit allen Bauteilen in Abbildung 4.41 gezeigt.

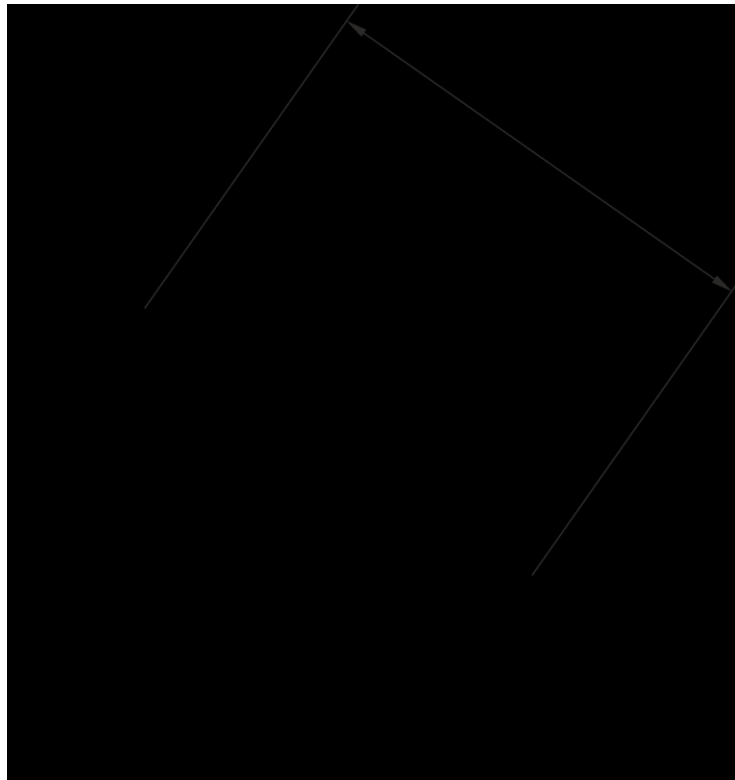


Abbildung 4.40: Zeichnung einer Diode mit der Bauform TO 5,6 (alle Maße in mm)

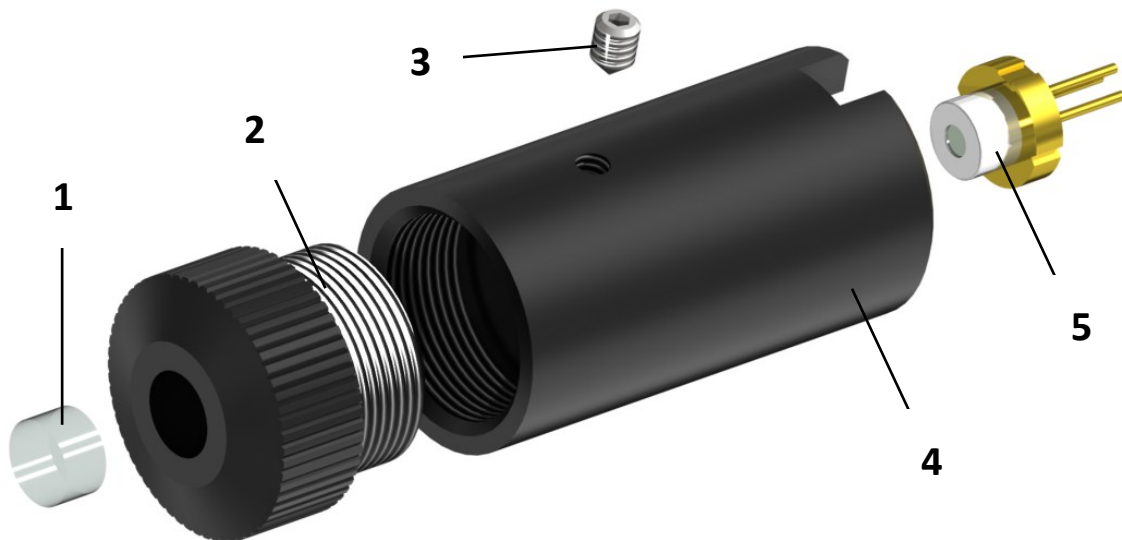


Abbildung 4.41: Selbstkonstruiertes Diodenlasergehäuse (1 Asphärische Linse, 2 Linsenhalter, 3 Fixierschraube der Laserdiode, 4 Gehäuse, 5 Laserdiode)

Das Lasergehäuse besteht aus Kupfer, um die Abwärme der Diode bestmöglich abzuleiten. Es hat einen Durchmesser von 12,2 mm und ist 22,5 mm lang. Auf diese Weise können alle kommerziell verfügbaren Laserdioden als Anregungsquelle verwendet werden. Die Laserdioden sind günstig zu erwerben, da sie als Massenware in optischen Laufwerken oder der Informationstechnologie verwendet werden. Nach der Ausstattung mit einem entsprechenden Treiber ist der selbstkonstruierte Laser einsatzbereit. Für durchschnittlich 30 € konnten diverse Laserdioden erworben werden, sodass vom blauen Bereich (405 nm und 445 nm) über den grünen Bereich (532 nm) bis in den roten bzw. infraroten Bereich (635 nm, 658 nm und 980 nm) ein großer Teil der sichtbaren Anregungswellenlängen abgedeckt wird.

4.7.4 Anregungsenergie in Korrelation zur emittierten Fluoreszenz

Mit dem selbstkonstruierten Gehäuse für Diodenlaser ist außer unterschiedlichsten Wellenlängen auch eine größere Vielfalt an Dioden mit höherer optischer Ausgangsleistung verfügbar geworden. Die kleinen Diodenlaser sind in der Regel nur mit geringen optischen Ausgangsleistungen von wenigen mW kommerziell erhältlich, da Diodenlaser mit hohen Ausgangsleistungen nur selten eine breite Verwendung finden.

Die emittierte Fluoreszenz ist direkt proportional zur eingestrahnten Anregungsenergie. Deshalb ist ein deutlicher Intensitätsgewinn bei der Verwendung eines Lasers zur Fluoreszenzanregung im Vergleich zur

klassischen Lampenanregung mit beispielsweise einer Xenon-Bogenlampe zu beobachten. Allerdings konnten zwei Effekte beobachtet werden, die die Linearität dieser Korrelation einschränken. Zum einen tritt ein *Photobleaching* auf, wobei Moleküle ihre Fluoreszenzeigenschaft bei länger andauernder und intensiver Bestrahlung durch die photochemische Zersetzung der Analyten verlieren. Eine hohe Photonendichte kann also die Fluoreszenz schon nach wenigen Sekunden auslöschen. Zum anderen gibt es eine Sättigung der Fluoreszenzemission. Bei sehr hohen Anregungsenergien findet keine Erhöhung der emittierten Fluoreszenz bei Zunahme der eingestrahlten Energie statt.

Um zu überprüfen, ob bei den verfügbaren Laserdioden die Korrelation zwischen Anregungsenergie und emittierter Fluoreszenz weiterhin besteht, wurden vier Dioden mit unterschiedlichen Ausgangsleistungen (7 mW, 20 mW, 35 mW und 80 mW) der Wellenlänge 635 nm verglichen. Dazu wurde die Oxazin-1-Trennung aus Kapitel 4.5.4 mit einer 60 cm langen Kapillare (45 cm effektiv) und einem konstanten Strom (25 μ A) mit einer Oxazin-1-Lösung (10^{-7} mol/L) für die verschiedenen Laserdioden durchgeführt. Elektropherogramme dieser Messungen sind in Abbildung 4.42 dargestellt.

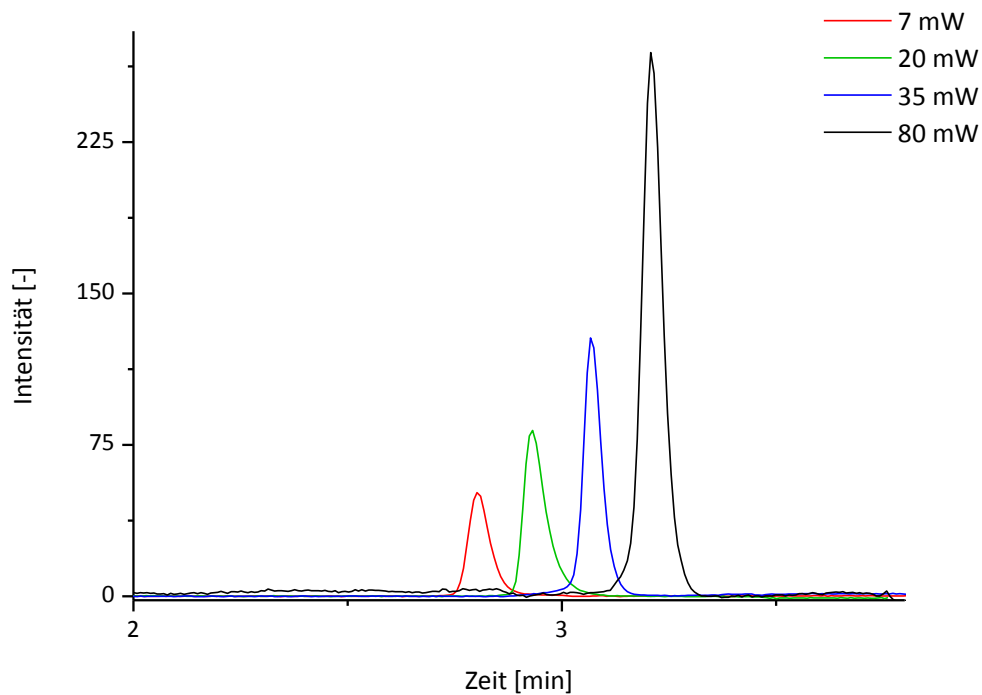


Abbildung 4.42: Elektropherogramme in versetzter Anordnung einer Oxazin-1-Lösung (10^{-7} mol/L) mit Laserdioden unterschiedlicher Ausgangsleistung als Anregungsquelle

Beim Vergleich der vier Elektropherogramme in Abbildung 4.42 ist eine Intensitätszunahme des Signals von der schwächsten Diode (7 mW) bis zur stärksten (80 mW) gut zu erkennen. Zur besseren Beurteilung der Proportionalität wurden die Signalflächen und die Signalthöhen gegen die optische Ausgangsleistung der Anregungsquellen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4.43).

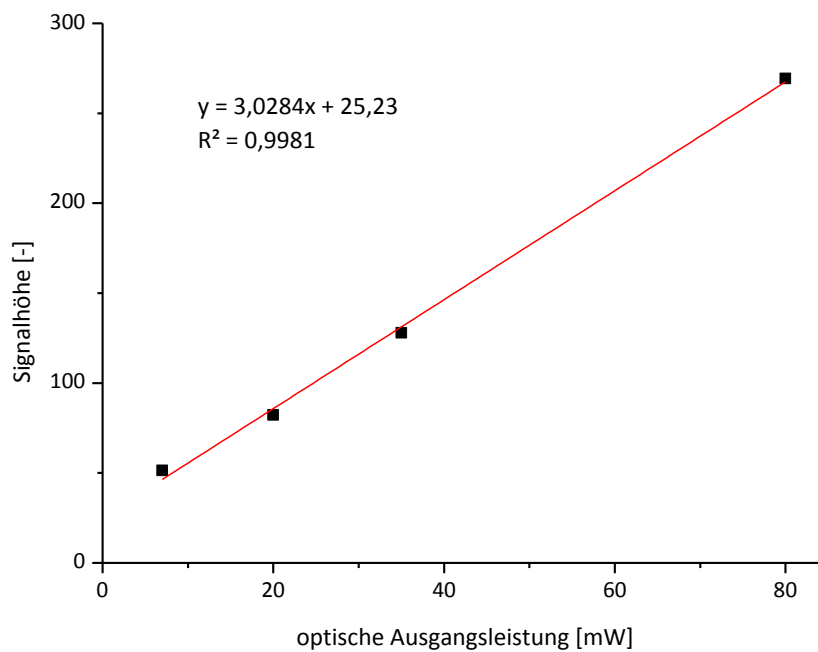
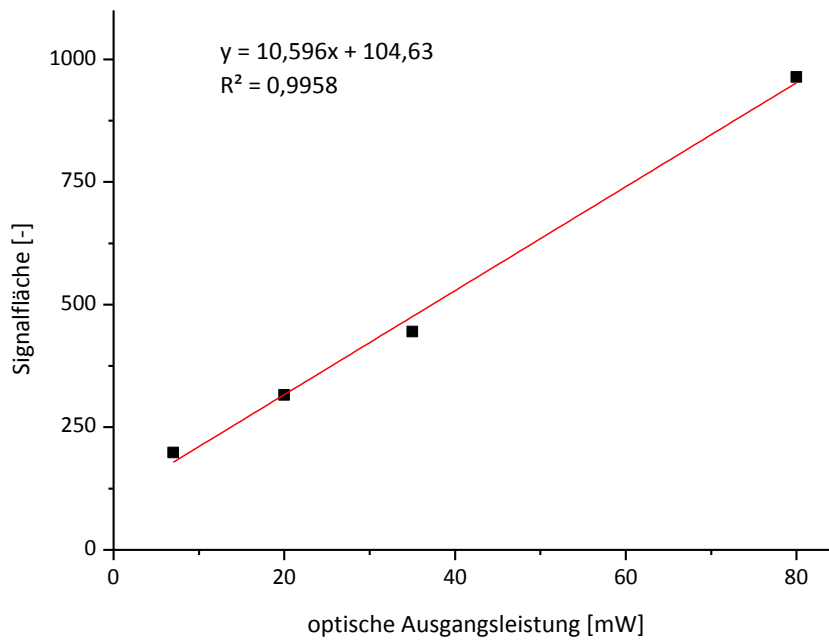


Abbildung 4.43: Optische Ausgangsleistung der Laserdioden aufgetragen gegen die Signalfläche (oben) und die Signalthöhe (unten) der Elektropherogramme aus Abbildung 4.42

Sowohl bei der Auftragung der Signalfläche ($R^2=0,9958$) gegen die Ausgangsleistung der Dioden als auch bei der Signalhöhe ($R^2=0,9981$) ist eine lineare Abhängigkeit zu beobachten. Bei den verwendeten Bedingungen ist fast bis in den dreistelligen Milliwattbereich keine Sättigung der Fluoreszenz vorhanden, da auch bei den hohen optischen Ausgangsleistungen kein Abflachen des Graphen zu erkennen ist. Unter Trennbedingungen ist die Verweildauer der Analyten im Detektor sehr kurz, sodass kein *Photobleaching* auftreten kann.

Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass Laserdioden mit sehr hohen optischen Ausgangsleistungen von über 80 mW verwendet werden können, um eine höhere Nachweisstärke des Systems zu erreichen. Kostengünstig und kommerziell erhältlich sind blau-violette Dioden (405 nm), welche in Blu-ray-Laufwerken verwendet werden. Diese Laserdioden haben eine sehr hohe optische Ausgangsleistung von 100 mW, wodurch eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit erzielt werden kann.

4.7.5 Analytische Leistungsfähigkeit für rote Laser

Vor dem Durchführen weiterer Optimierungsschritte wurde die analytische Leistungsfähigkeit des Systems im roten Wellenlängenbereich bestimmt. Dazu wurde die Modellanalyse des Oxazin-1 für unterschiedliche Konzentrationen mit den Geräteparametern aus Kapitel 4.5.4 durchgeführt. Es wurde eine 50 cm lange Kapillare (effektiv 35 cm) und eine 35 mW Diode (635 nm) als Anregungsquelle verwendet. Die

Analyse wurde bei einem konstanten Strom von $25 \mu\text{A}$ durchgeführt. Vor Beginn der Messungen wurde das Detektionssystem auf die maximale Fluoreszenzintensität ausgerichtet. Dafür wurde die Kapillare in der CE mit einer Oxazin-Lösung (10^{-5} mol/L) befüllt. Anschließend wurden die Glasfaserhalterung in x-, y- und z-Richtung und die Lasereinheit entlang der x-Achse sowie der z-Achse auf eine möglichst hohe Fluoreszenzintensität eingestellt. Vor der Durchführung der Trennung wurde die Kapillare mit Natronlauge (1 mol/L , 10 min) und Boratpuffer (100 mmol/L , $\text{pH}=9$, 30 min) konditioniert um das Oxazin-1 vollständig aus der Kapillare zu entfernen. Elektropherogramme der Oxazin-1-Lösungen sind in Abbildung 4.44 dargestellt.

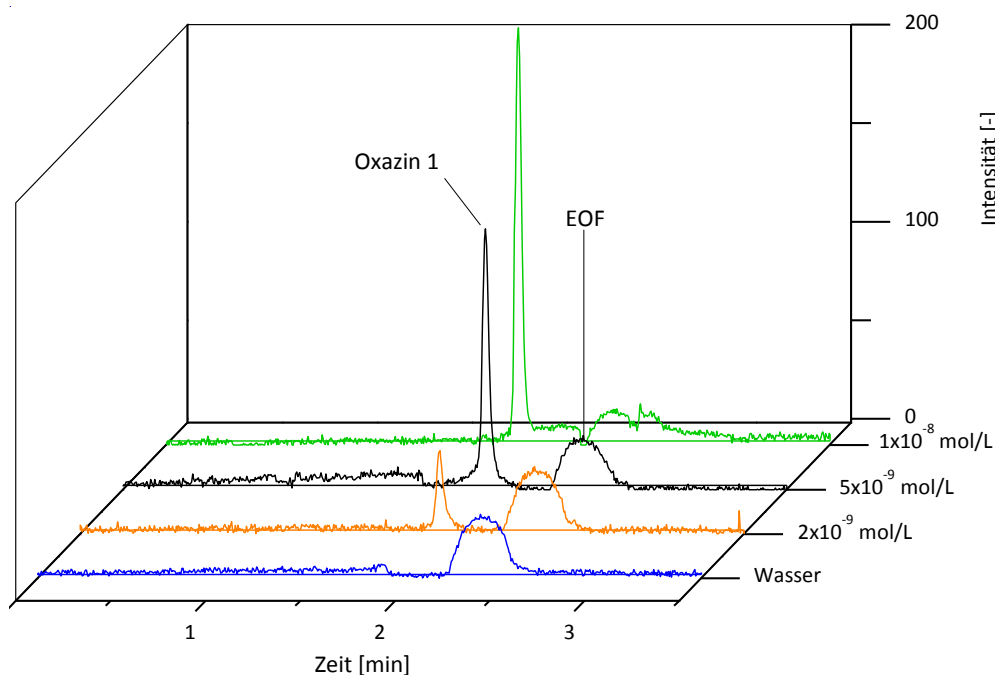


Abbildung 4.44: Elektropherogramme von Oxazin-1-Lösungen mit Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$, $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$ sowie $1 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$

Diese Experimente zeigen eine gute analytische Leistungsfähigkeit des Detektionssystems. Im Vergleich zum dritten Prototypen kann eine

deutliche Verbesserung der Nachweisstärke beobachtet werden. Zur besseren Quantifizierung wurde die Nachweisgrenze aus den vorliegenden Messungen (Abbildung 4.44) abgeschätzt. Dazu wurde das Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. Als Rauschen wurde die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem drifffreien Bereich berechnet. Für die Oxazin-1-Lösung ($2 \cdot 10^{-9}$ mol/L) kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von >16 angegeben werden. Mit der Bedingung $S/N = 3$ und der bekannten Konzentration von $2 \cdot 10^{-9}$ mol/L kann die Nachweisgrenze für Oxazin-1 mit etwa $4 \cdot 10^{-10}$ mol/L abgeschätzt werden. Dies entspricht einer um Faktor 50 niedrigeren Nachweisgrenze zum Vorgängermodell. Diese Verbesserung wurde durch die Erweiterung der Justierbarkeit der Glasfaser und des Lasers, der höheren Anregungsenergie und der stärkeren Bündelung der Fluoreszenz durch die Kugellinse erreicht.

Eine weitere Steigerung der Sensitivität soll durch den Einsatz leistungsstarker 405 nm-Laserdioden mit einer optischen Ausgangsleistung von 100 mW erlangt werden, womit ebenfalls die Flexibilität des Detektionssystems unter Beweis gestellt werden kann. Durch die weite Verbreitung von Blu-ray-Laufwerken sind die eingebauten Laserdioden für unter 30 € kommerziell verfügbar geworden.

4.7.6 Modellanalyt Coumarin 343

Moleküle, die im blauen Spektralbereich eine Fluoreszenz aufweisen, zeigen in der Regel einen größeren *Stokes-Shift* als Moleküle mit Fluoreszenzeigenschaften im roten Bereich. Dadurch kann mit einer

Anregungswellenlänge von 405 nm eine Vielzahl an Fluoreszenzfarbstoffen analysiert werden. Um einen Modellanalyten mit möglichst hoher Emission zu finden, wurden einige Farbstoffe miteinander verglichen. Als Anregungsquelle wurde dabei ein 405 nm-Laser mit einer optischen Ausgangsleistung von 100 mW sowie ein Emissionsfilter mit einer *cut-on*-Wellenlänge von 435 nm verwendet. Für den Vergleich wurde jeweils eine Lösung (10^{-5} mol/L bzw. 10^{-4} mol/L) des Moleküls in die Kapillare gepumpt und anschließend außerhalb der CE das System auf die maximale Signalintensität justiert. Es wurden Coumarin 343, Coumarin 30, Fluorescein, 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben, Rhodamin 110 sowie Acridinorange miteinander verglichen. Die dabei aufgenommenen Spektren sind in Abbildung 4.45 gezeigt.

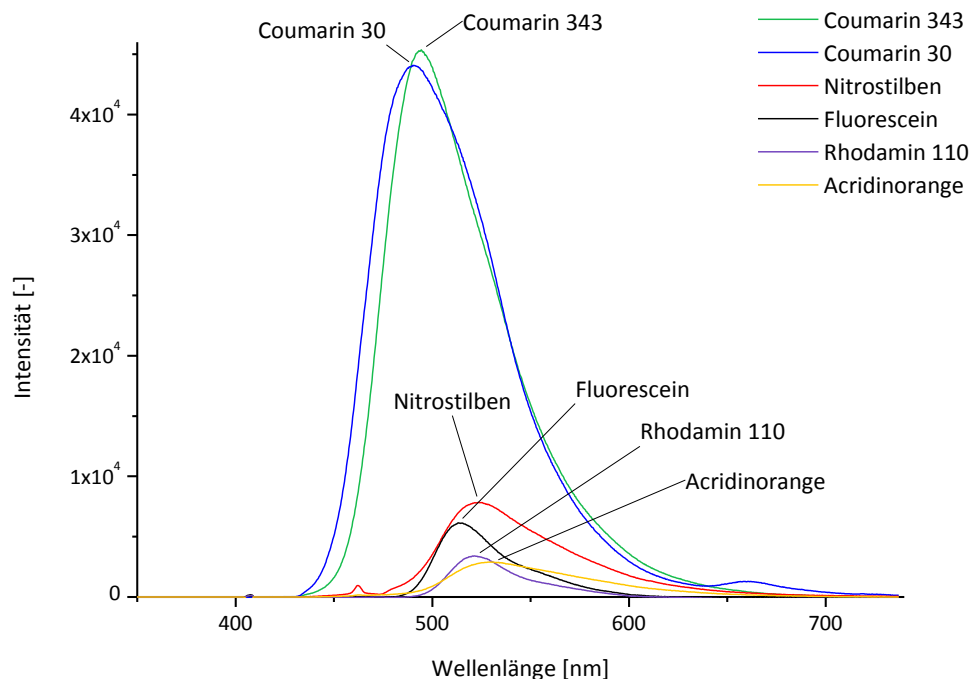


Abbildung 4.45: Fluoreszenz-emissionspektren ($\lambda_{\text{ex}}=405$ nm) von Coumarin 343, Coumarin 30, Fluorescein, 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben, Rhodamin 110 (jeweils 10^{-5} mol/L) sowie Acridineorange (10^{-4} mol/L)

Wie im Vergleich der Fluoreszenzspektren zu sehen ist, weisen die beiden Coumarine mit Abstand die höchste Intensität auf. Als Modellanalyt wurde daher das Coumarin 343 gewählt, da es eine etwas höhere Fluoreszenzintensität mit einem leicht größeren *Stokes-Shift* zeigt. Die Strukturformel von Coumarin 343 ist in Abbildung 4.46 gezeigt.

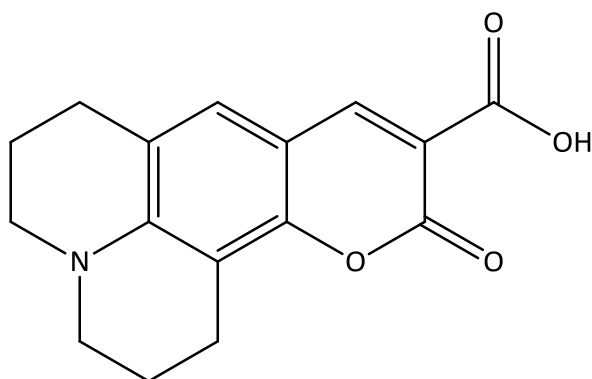


Abbildung 4.46: Strukturformel von Coumarin 343

Ein Anregungs- und Emissionsspektrum von Coumarin 343 ist in Abbildung 4.47 dargestellt. Die beiden Spektren wurden in Acetonitril aufgenommen.

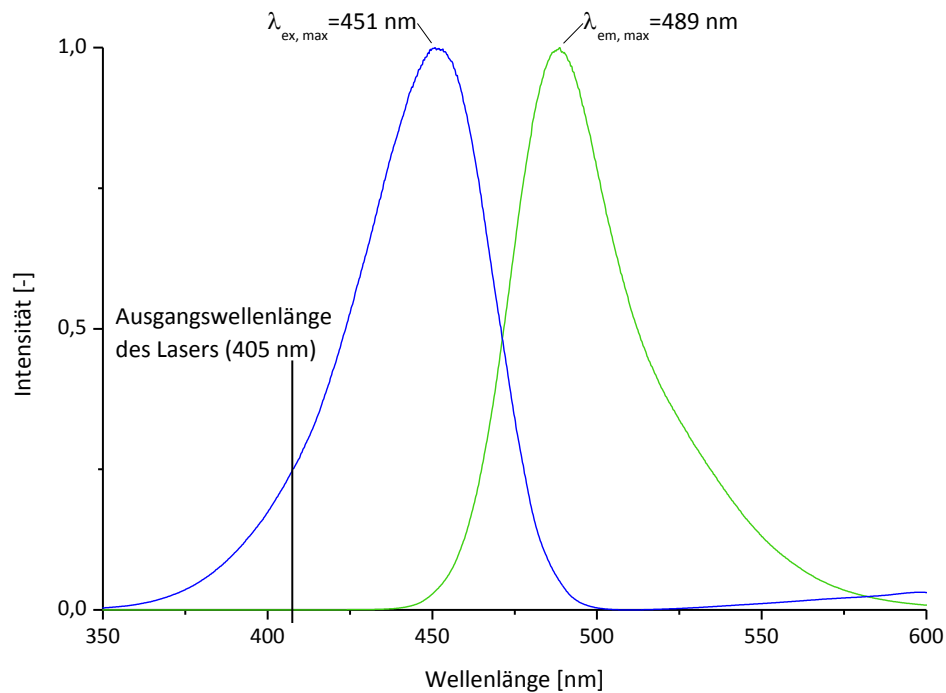


Abbildung 4.47: Normiertes Anregungs- und Emissionsspektrum von Coumarin 343

Cumarinderivate wie das Coumarin 343, werden aufgrund ihrer hohen Quantenausbeute als Lasermedium in Farbstofflasern eingesetzt. Das Absorptionsmaximum von Coumarin 343 liegt bei 451 nm und das Emissionsmaximum bei 489 nm, somit weist es einen *Stokes-Shift* von 48 nm auf. Durch den recht großen Abstand von 46 nm zwischen der maximalen Absorptionswellenlänge des Analyten und der Wellenlänge des Lasers resultiert ein Abstand der Laserwellenlänge zur maximalen Emissionswellenlänge von 84 nm. Durch diesen großen spektralen Abstand und den verwendeten Emissionsfilter sollte das vom Laser verursachte Rauschen sehr gering ausfallen.

4.7.7 Beschichtung der Laserlinse

Die bisher verwendete asphärische Linse zur Fokussierung des Laserstrahls ist durch die aufgebraute Beschichtung auf die Verwendung eines Lasers in einem Spektralbereich zwischen 600 nm und 1050 nm optimiert. Da die blaue Diode mit 405 nm weit außerhalb dieses Bereichs liegt, gilt es zu untersuchen, ob der Einsatz einer anders beschichteten Linse einen Empfindlichkeitsvorteil erbringt. Für diesen Vergleich wurde eine Linse mit identischen optischen Eigenschaften, welche jedoch eine Antireflektionsbeschichtung für den Bereich 400-600 nm aufweist, herangezogen.

Um die beiden Linsen vergleichen zu können wurde eine Kapillare (ID=75 μm , L=30cm) in das Detektionssystem eingebaut und in der CE mit einer Coumarin 343-Lösung (10^{-5} mol/L) befüllt. Anschließend wurden die Position der Glasfaser und des Lasers auf die maximale Intensität eingestellt. Für jede Linse wurde der Vorgang drei Mal wiederholt. Es wurde die 405 nm-Diode (100 mW) als Anregungsquelle verwendet und die Spektren wurden mit einer Integrationszeit von 100 ms aufgenommen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst und in Abbildung 4.48 graphisch dargestellt.

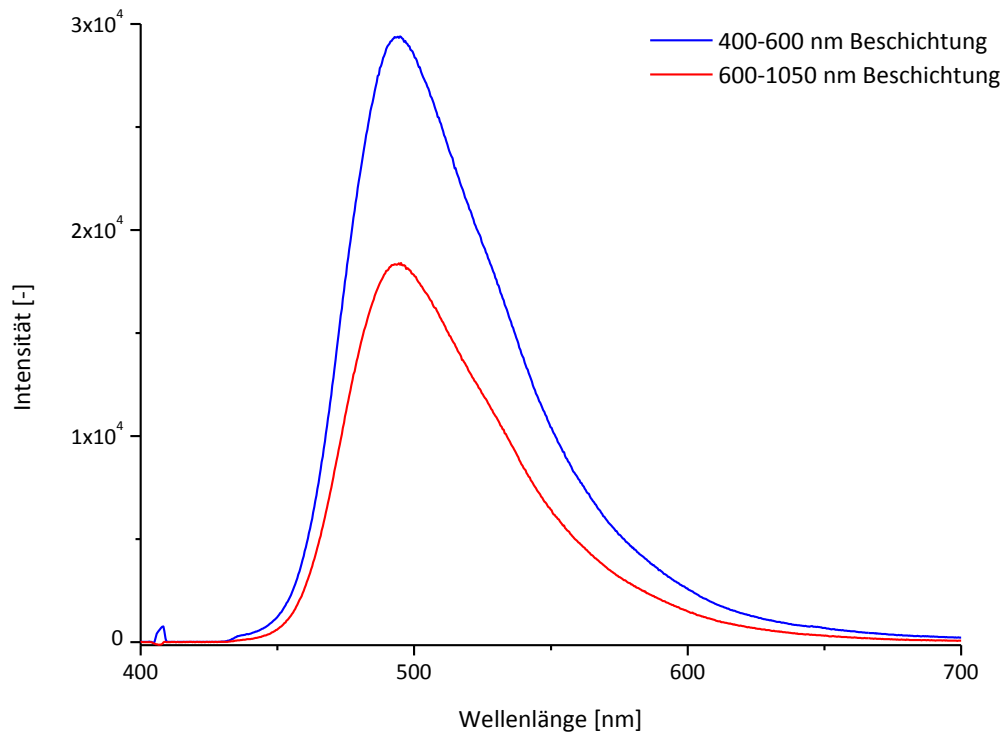


Abbildung 4.48: Zwei Spektren einer Coumarin 343-Lösung (10^{-5} mol/L) mit zwei verschiedenen beschichteten Laserlinsen aufgenommen

Tabelle 4.7: Asphärische Linsen mit unterschiedlicher Beschichtung im Vergleich

Beschichtung [nm]	400-600	600-1050
	28869	18456
Signalhöhe [-]	29112	18331
	29459	21306
Mittelwert [-]	29147	19364
Verhältnis [-]	1,5	1

Wie in Tabelle 4.7 zu sehen, kann mit der passenden Antirefleksionsbeschichtung eine Erhöhung der Intensität um etwa 50 % erzielt werden. In einer grafischen Gegenüberstellung zweier repräsentativer Spektren in Abbildung 4.48 ist der Unterschied ebenfalls sehr deutlich zu erkennen. Zu beobachten ist außerdem, dass die Streustrahlung des Lasers beinahe vollständig eliminiert werden konnte

und die restliche Strahlung außerhalb des Fluoreszenzspektrums von Coumarin 343 liegt.

Aufgrund dieses Ergebnisses wird in allen nachfolgenden Messungen immer eine Linse mit der zur Wellenlänge der verwendeten Laserdiode optimalen Antireflektionsbeschichtung verwendet.

4.7.8 Elektrophoretische Trennung des Modellanalyten Coumarin 343

Für die nachfolgenden Optimierungsschritte des vierten Prototypen wurde eine einfache elektrophoretische Trennung des Modellanalyten Coumarin 343 entwickelt. Die Parameter der CE und des Kompaktspektrometers sind im Folgenden zusammengefasst.

Nach der Ausrichtung des Lasers, wobei die Kapillare eingespannt und mit Coumarin 343-Lösung (10^{-7} mol/L) in der CE gefüllt wurde, wurde anschließend der Laser manuell auf die maximale Intensität der Fluoreszenz eingestellt. Die Kapillare wurde anschließend vor der Trennung mit Natronlauge (1 mol/L, 10 min) und mit Pufferlösung (30 min) konditioniert, um Analytreste zu entfernen.

Die Injektionszeit betrug 8 s bei einem Injektionsdruck von 50 mbar, dies entspricht 400 mbar·s. Die verwendete Kapillare hatte eine Länge von 60 cm (effektiv 45 cm) und einen inneren Durchmesser von 75 μ m. Es wurde ein konstanter Strom von 40 μ A mit einer resultierenden Spannung von etwa 14 kV angelegt. Als Messwellenlänge wurde 494 nm mit einer Bandbreite von 15 Pixeln gewählt. Der CCD-Chip wurde über den TE-

Kühler auf -15 °C gekühlt. Die Integrationszeit des Spektrometers betrug 300 ms und vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt. Als Anregungsquelle wurde die 405 nm-Laserdiode eingesetzt, die eine nominelle optische Ausgangsleistung von 100 mW hat und mit 80 mA (entspricht etwa 6,6 V) betrieben wurde.

Nach jeder Trennung mit einer Dauer von fünf Minuten wurde die Kapillare eine Minute lang mit Puffer gespült. Als Elektrolytlösung wurde ein 100 mmol/L Boratpuffer mit einem pH-Wert von 9 genutzt (Herstellung s. Abschnitt 3.2.3).

4.7.9 Quadratische Kapillare

Wie schon in Abschnitt 4.6.6 beschrieben ist die runde Geometrie der Kapillare ein Grund für die relativ starke Streuung des Laserstrahls an dieser. Eine Kapillare mit zwei ebenen Außenflächen und kreisförmigen Innengeometrie konnte zwar erfolgreich hergestellt werden, jedoch war die Ausrichtung der Kapillare mit zwei 200 μm breiten Flächen sehr diffizil. Aufgrund des weiterhin runden Innendurchmessers konnte auch bei optimaler Ausrichtung keine wesentliche Verminderung der Streuung beobachtet werden. Seit diesen Experimenten hat sich durch die kommerzielle Verfügbarkeit einer Kapillare mit komplett quadratischer Geometrie eine weitere Möglichkeit ergeben, die gestreute Strahlung des Lasers zu minimieren. Die verbesserten Eigenschaften der quadratischen Kapillare bezüglich der Streuung eines kollimierten Lichtstrahls sind in Abbildung 4.49 verdeutlicht.

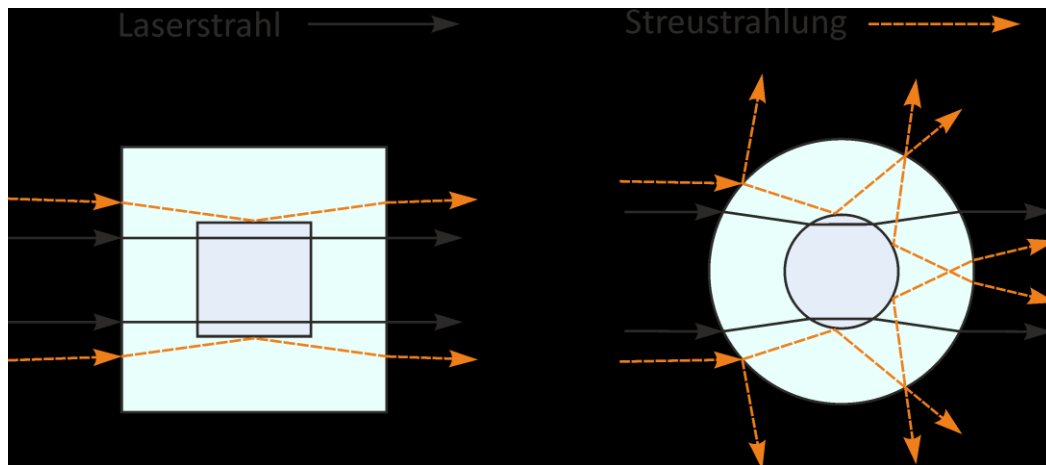


Abbildung 4.49: Streuung an einer Kapillare mit quadratischer (links) und runder Geometrie (rechts)

In der schematischen Darstellung der Streuung an den beiden Kapillargeometrien ist gut zu erkennen, dass bei einer runden Geometrie deutlich mehr Licht gestreut wird, welches in unterschiedlichen Winkeln von der Kapillare abgelenkt wird. Außerdem hat eine quadratische Kapillare bei gleichem Durchmesser ein um 27 % größeres Volumen im Detektionsbereich, sodass eine größere Menge an Analyt gleichzeitig angeregt werden kann. Zum Vergleich der beiden Geometrien bezüglich ihrer Trenn- sowie Detektionseigenschaften wurde jeweils die Modelltrennung mit einer Coumarin 343-Lösung ($2 \cdot 10^{-10}$ mol/L) aus Abschnitt 4.7.8 durchgeführt. Elektropherogramme dieser Messungen sind in Abbildung 4.50 gezeigt.

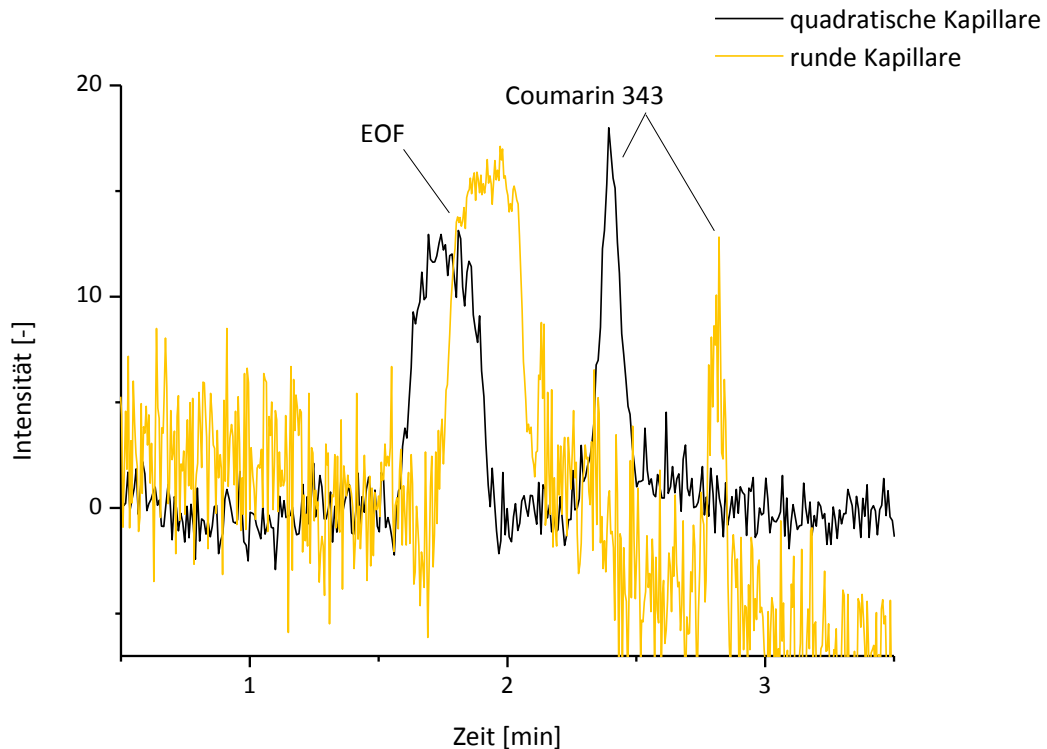


Abbildung 4.50: Mit einer runden bzw. mit einer quadratischen Kapillare (ID=75 μm) aufgenommene Elektropherogramme einer Coumarin 343-Lösung ($2 \cdot 10^{-10}$ mol/L)

Der Vergleich der beiden Elektropherogramme zeigt deutlich das verringerte Rauschen sowie eine stabile Basislinie bei der Verwendung einer Kapillare mit quadratischer Geometrie. Auf die Trenneigenschaften hat die Geometrie der Kapillare kaum einen Einfluss, lediglich die Migrationszeit des Coumarins ist etwas geringer. Zur Quantifizierung der Verbesserung gegenüber einer runden Kapillare wurde das Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. Als Rauschen wurde die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet. Für die runde Kapillargeometrie kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3,17 und für die quadratische von 8,31 angegeben werden. Es konnte also eine Verbesserung der Nachweistärke um den Faktor 2,6 erreicht werden.

Aufgrund dieser Verbesserung wird in allen nachfolgenden Messungen eine quadratische Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75 μm verwendet.

4.7.10 Variation der Integrationszeit

Wie in Abschnitt 4.6.11 gezeigt, konnten bereits mit dem dritten Prototypen gute Nachweisgrenzen erzielt werden, die bei diesem Prototypen noch weiter verbessert werden konnten (vgl. Abschnitt 4.7.5). Allerdings konnte bisher nur ein linear dynamischer Bereich von drei Dekaden erreicht werden. Ein Ansatzpunkt um diesen Bereich zu vergrößern ist die Integrationszeit des Spektrometers. Bisher wurden meist Integrationszeiten von 300 ms verwendet, damit auch die schmalen Signale einer elektrophoretischen Trennung mit ausreichend Punkten (20-30) dargestellt werden können und somit eine reproduzierbare Auswertung möglich ist. Die Software des Spektrometers bietet die Möglichkeit einer Mittelwertbildung über eine bestimmte Anzahl an Spektren. So könnte die Integrationszeit der einzelnen Spektren herunergesetzt werden, wodurch die detektierte Signalintensität ebenfalls geringer wird. Bei Halbierung der Integrationszeit ist die Signalthöhe ebenfalls halbiert. Durch eine Heraufsetzung der gebildeten Mittelwerte sollte sich jedoch das Signal/Rausch-Verhältnis nicht verschlechtern, da die Gesamtaufnahmezeit eines Spektrums etwa gleich bleibt. Dies führt zu einer Vergrößerung des dynamischen Bereichs, da das Limit des Detektors erst bei höheren Konzentrationen erreicht wird. Dazu soll das Signal/Rausch-Verhältnis von unterschiedlichen Mittelwert- und

Integrationszeitkombinationen mit einer Gesamtaufnahmezeit von etwa 400 ms untersucht werden. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung der Modelltrennung aus Abschnitt 4.7.8 mit einer Coumarin 343-Lösung (10^{-10} mol/L) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tabelle 4.8: Vergleich verschiedener Mittelwert- und Integrationszeitkombinationen

	Signalhöhe [-]	2·SD	S/N
4·100 ms	12,03	2,05	5,88
5·80 ms	10,27	1,73	5,92
6·67 ms	9,28	1,51	6,16
7·57 ms	8,53	1,10	7,73
13·31 ms	4,27	0,54	7,87
27·15 ms	2,28	0,28	8,09
40·10 ms	1,64	0,19	8,51

Für die Berechnung der Signal/Rausch-Verhältnisse wurde als Rauschen die doppelte Standardabweichung (SD) der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet. In Tabelle 4.8 ist ein Trend zu besseren S/N bei kürzeren Integrationszeiten und häufigerer Mittelwertbildung zu beobachten. Das beste Signal/Rausch-Verhältnis kann bei der Kombination 40·10 ms angegeben werden, es ist etwa 44 % besser als das der 4·100 ms Kombination. Eine graphische Zusammenfassung der einzelnen Elektropherogramme für die jeweiligen Integrationszeiten ist in Abbildung 4.51 gezeigt.

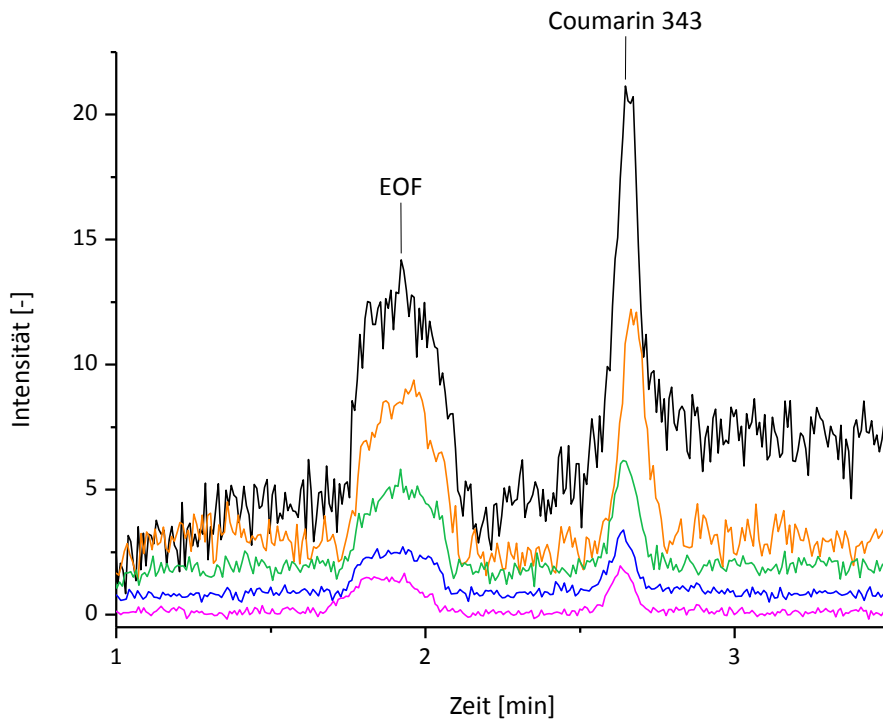


Abbildung 4.51: Elektropherogramme unterschiedlicher Mittelwert/Integrationszeitkombinationen einer Coumarin 343-Lösung (10^{-10} mol/L)

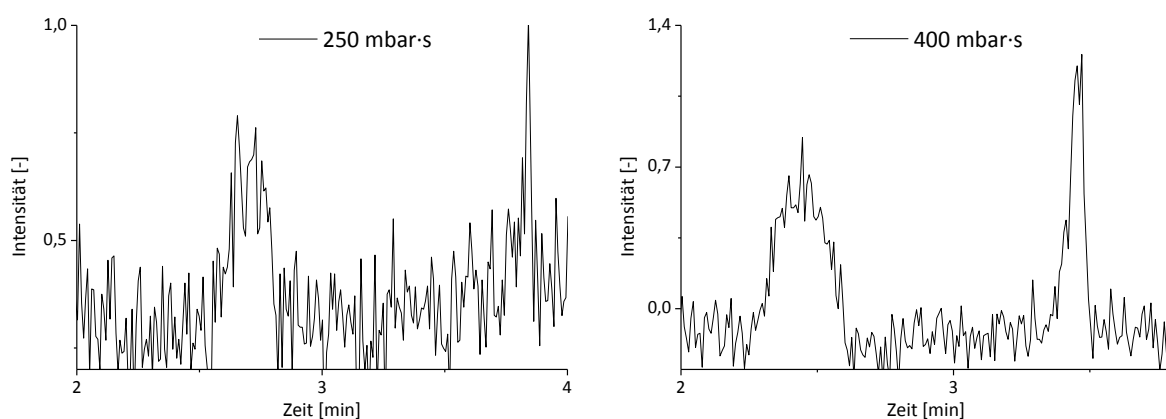
In Abbildung 4.51 ist die Abnahme der Signalhöhe sowie der Basislinie bei kürzeren Integrationszeiten zu sehen. Durch eine Reduzierung der Integrationszeit von 300 ms auf 10 ms sollte sich der lineare dynamische Bereich um über eine Dekade vergrößern. Auch sind die Peaks schmaler, sodass eine geringe Verbesserung der Auflösung zu beobachten ist. Kürzere Integrationszeiten konnten nicht angewendet werden, da diese durch die Leistungsfähigkeit der Computerhardware limitiert war.

Für die folgenden Messungen wird eine Mittelwert-Integrationszeitkombination von 40·10 ms genutzt, da mit dieser eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnis sowie eine Vergrößerung des linearen dynamischen Bereichs erreicht wird.

4.7.11 Optimierung der Injektionszeit

Um die Nachweisstärke des CE-LIF-Systems zu maximieren, sollten auch die CE-Parameter optimiert werden. Einen großen Einfluss auf die Sensitivität der Detektion hat dabei die injizierte Probenmenge. Je mehr Probe injiziert wird, desto größer ist auch das detektierte Signal. Allerdings ist die Injektionsmenge begrenzt, da zu große Volumina eine lange Probenzone in der Kapillare bilden und so die Auflösung herabgesetzt wird.

Als Grundlage soll die elektrophoretische Trennung einer Coumarin 343-Lösung (10^{-10} mol/L) aus Abschnitt 4.7.8 dienen. Dabei werden die bisherigen Optimierungen (quadratische Kapillare und 40·10 ms Integrationszeit) verwendet. Diese Analyse wird für vier verschiedene Injektionszeit/-druck-Kombinationen (5·50 mbar·s, 8·50 mbar·s, 10·50 mbar·s und 15·50 mbar·s) durchgeführt. Elektropherogramme dieser Messungen sind in Abbildung 4.52 gezeigt.



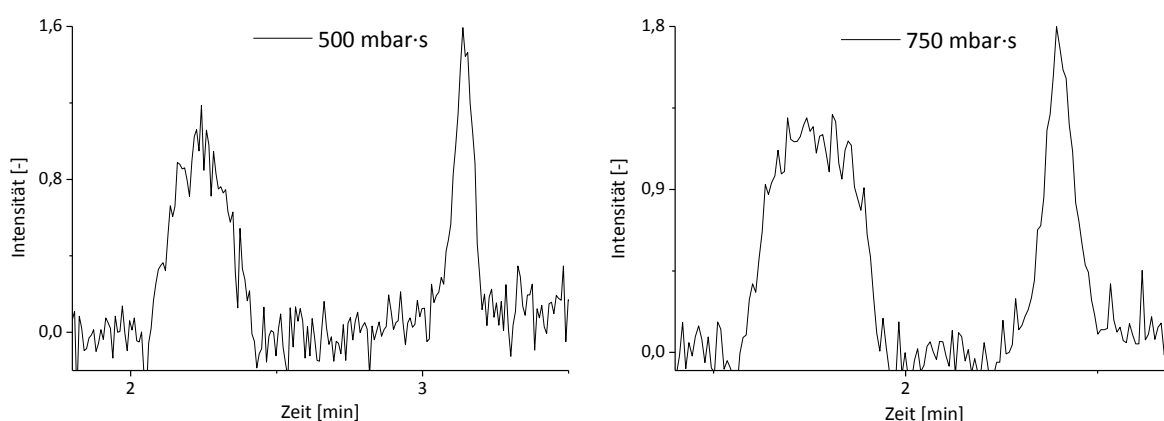


Abbildung 4.52: Elektropherogramme einer Coumarin 343-Lösung (10^{-10} mol/L) mit vier verschiedener Injektionsvolumina (250 mbar·s, 400 mbar·s, 500 mbar·s und 750 mbar·s)

Der Vergleich der Elektropherogramme zeigt, dass größere Injektionsvolumina zu einer Erhöhung des Signals führen. Bei der Injektion von 250 mbar·s zeigt sich ein sehr schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis, während bei 750 mbar·s der Peak deutlich breiter wird. Für eine genaue Auswertung werden die Signal/Rausch-Verhältnisse bestimmt, dazu wird die doppelte Standardabweichung (SD) als Rauschen berechnet (Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Signal/Rausch-Verhältnis unterschiedlicher Injektionsvolumina

	250 mbar·s	400 mbar·s	500 mbar·s	750 mbar·s
Signalhöhe [-]	0,68	1,31	1,57	1,67
2·SD [-]	0,19	0,20	0,18	0,19
S/N [-]	3,57	6,68	8,72	8,85

In der Tabelle 4.9 ist zu sehen, dass bei einer Injektionszeit/-druck-Kombination von 500 mbar·s ein optimaler Kompromiss zwischen Nachweisstärke und Auflösung vorliegt. Im Vergleich zu 250 mbar·s ist das S/N doppelt so gut und etwa gleich mit dem S/N bei 750 mbar·s. Außerdem ist fast keine Peakverbreiterung zu beobachten.

Aufgrund dieser Verbesserung der Nachweisstärke ohne Verlust an Auflösung wird in den folgenden Messungen eine Injektionszeit von 10 s mit einem Injektionsdruck von 50 mbar verwendet.

4.7.12 Specana – Datenanalyse für die Analytik

Für die bisherigen Messungen wurde ausschließlich die Software des Spektrometerherstellers zur Datenaufzeichnung verwendet. Diese ist allerdings nicht für zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen ausgelegt, sondern hauptsächlich für die Fluoreszenzspektroskopie. Es kann zwar eine Detektionswellenlänge mit variabler Bandbreite für zeitaufgelöste Messungen eingestellt werden, der volle Informationsgehalt der 2,5 Spektren/s wird jedoch nicht ausgenutzt. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Michael Kießhauer eine umfangreichere Software (Specana) für das entwickelte LIF-Detektionssystem programmiert. Ziel war es, eine Software zu entwickeln, die die große Zahl (>>100) an Spektren einlesen und dreidimensional darstellen kann. Außerdem soll eine Integration über einen frei wählbaren Wellenlängenbereich zur Erstellung von Elektropherogrammen möglich, sowie eine mathematische Glättungsfunktion zur Rauschreduzierung integriert sein.

Die Bedienungsoberfläche der mit diesen Anforderungen programmierten Specana-Software ist in den Abbildungen 4.53-4.57 gezeigt.

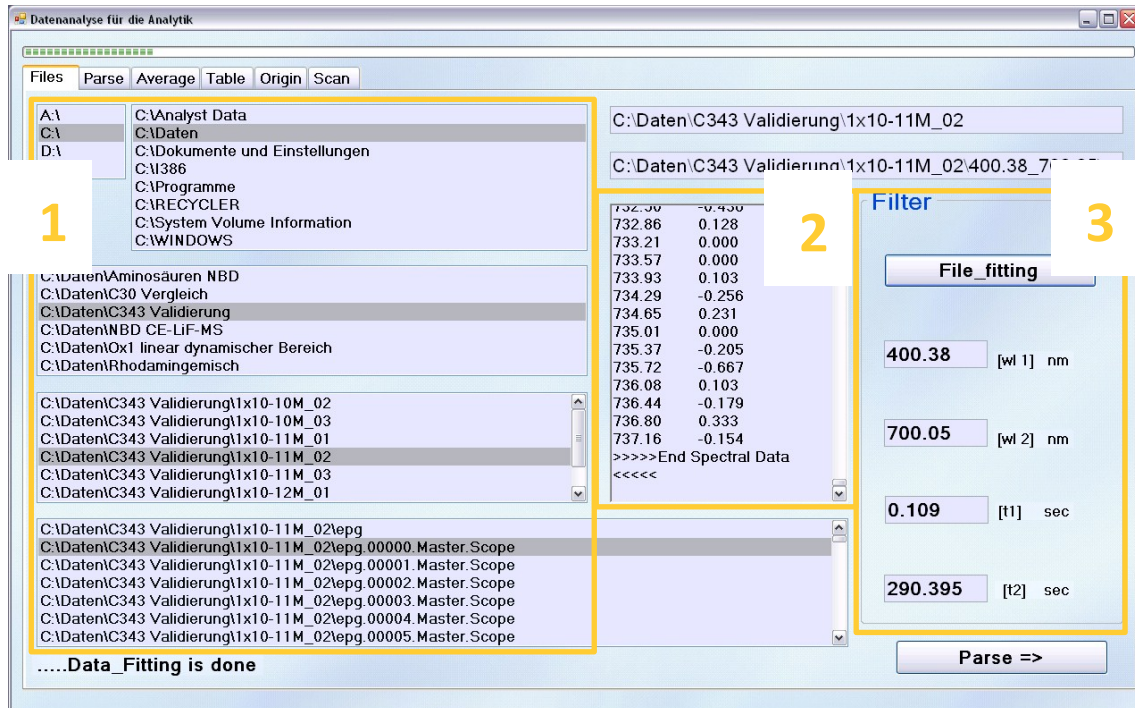


Abbildung 4.53: Oberfläche zu Auswahl und Anpassung der Spektren in der Specana-Software (1 Datenauswahl, 2 Spektrenvorschau, 3 Filter zur Eingrenzung des auszuwertenden Bereiches)

In der Abbildung 4.53 ist das Startfenster von Specana dargestellt. Es können die auszuwertenden Spektren (1 in Abbildung 4.53) ausgewählt werden. Die Spektrenrohdaten werden währenddessen im mittleren Fenster (2 in Abbildung 4.53) als Vorschau gezeigt, sodass eine schnelle und unkomplizierte Möglichkeit besteht, die aufgezeichneten Daten zu sichten. Bevor die Spektren eingelesen werden, kann im rechten Fenster (3 in Abbildung 4.53) der auszuwertende Datensatz eingegrenzt werden, um eine schnelle Auswertung mit geringerem Ressourcenverbrauch zu gewährleisten. Dabei ist es möglich, den Wellenlängenbereich zu begrenzen, da beispielsweise unterhalb der *cut-on*-Wellenlänge des Filters

keine Fluoreszenz detektiert wird. Es kann ebenso eine zeitlicher Ausschnitt zur Auswertung ausgewählt werden. Sobald die Daten ausgewählt und die Filter gesetzt sind, können die Spektren mittels der Funktion „*File_fitting*“ angepasst werden. Hierbei wird die spektrale Information ohne Kopf- und Fußzeile sowie den herausgefilterten Bereich der Spektren erfasst und in einem neuen Datensatz gespeichert. Die bereinigten Daten können nun im „*Parse*“-Fenster eingelesen werden (Abbildung 4.54).

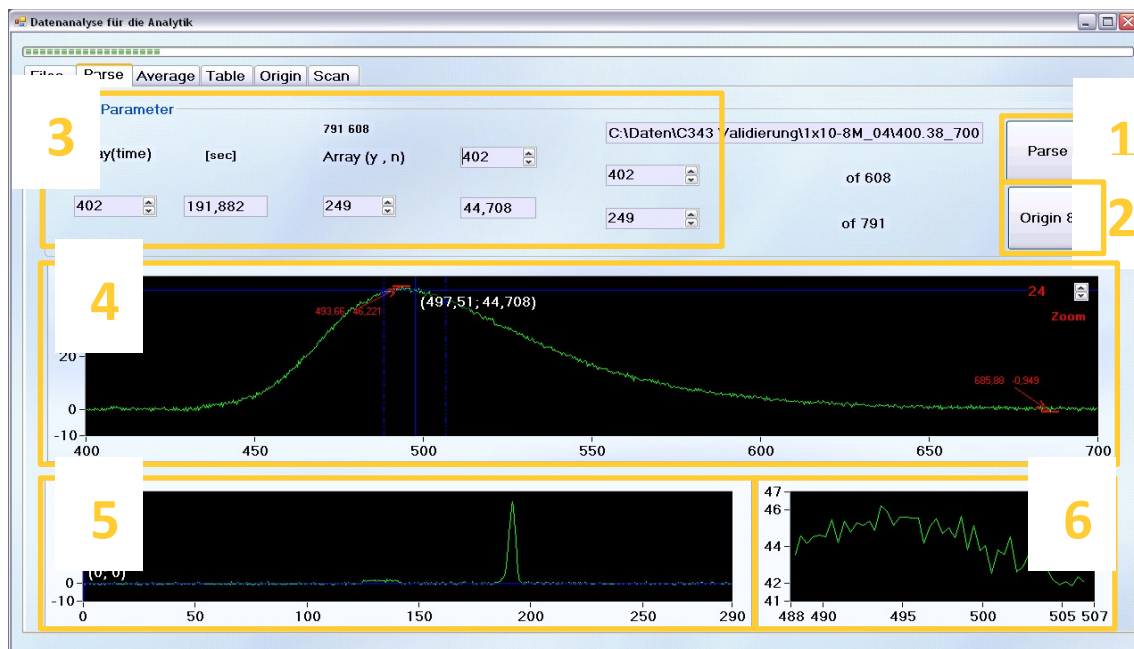


Abbildung 4.54: Oberfläche zum Einlesen der Spektren mit Integrationsfunktion (1 Array-Erstellung, 2 Weitergabe der Daten an „Origin 8.5“, 3 Durchsichtmöglichkeit des Datensatzes, 4 Darstellung ausgewählter Spektren, 5 Elektropherogrammvorschau, 6 Vergrößerung des integrierten Bereichs)

Das Fenster zum Einlesen der angepassten Spektren ist in der Abbildung 4.54 gezeigt. Die mit der Funktion „*File_fitting*“ erstellten Spektren können mittels „*Parse*“ (1 in Abb. 4.54) eingelesen und in einem virtuellen Verzeichnis, einem sogenannten Array, abgelegt werden. Dieser Datensatz

kann vollständig als Matrix an die Software „Origin 8.5“ weitergegeben werden (2 in Abb. 4.54), um diese dann dreidimensional darstellen zu können. In dieser Darstellung können Zeit, Intensität und Wellenlänge gegeneinander aufgetragen werden, sodass die gesamte Informationsmenge gleichzeitig zugänglich ist. Das so erstellte Array kann in allen Einzelheiten über die Steuerung der Parameter wie Wellenlänge, Zeit sowie Spektrennummer (3 in Abb. 4.54), betrachtet werden und das entsprechende Spektrum wird im mittleren Fenster (4 in Abb. 4.54) angezeigt. In diesem Fenster kann auch der zu integrierende Wellenlängenbereich gewählt werden, sodass schnell und einfach eine Elektropherogramm- und Chromatogrammvorschau im unteren Fenster (5 in Abb. 4.54) dargestellt werden kann. Der aktuell integrierte, spektrale Bereich wird rechts unten (6 in Abb. 4.54) angezeigt. Auf diese Weise ist es möglich, jederzeit die gesamten spektralen Daten sowie den zeitlichen Verlauf über einen ausgewählten Wellenlängenbereich anzusehen. Der virtuell gespeicherte Datensatz kann anschließend im „Average“-Fenster weiter ausgewertet werden (Abbildung 4.55).

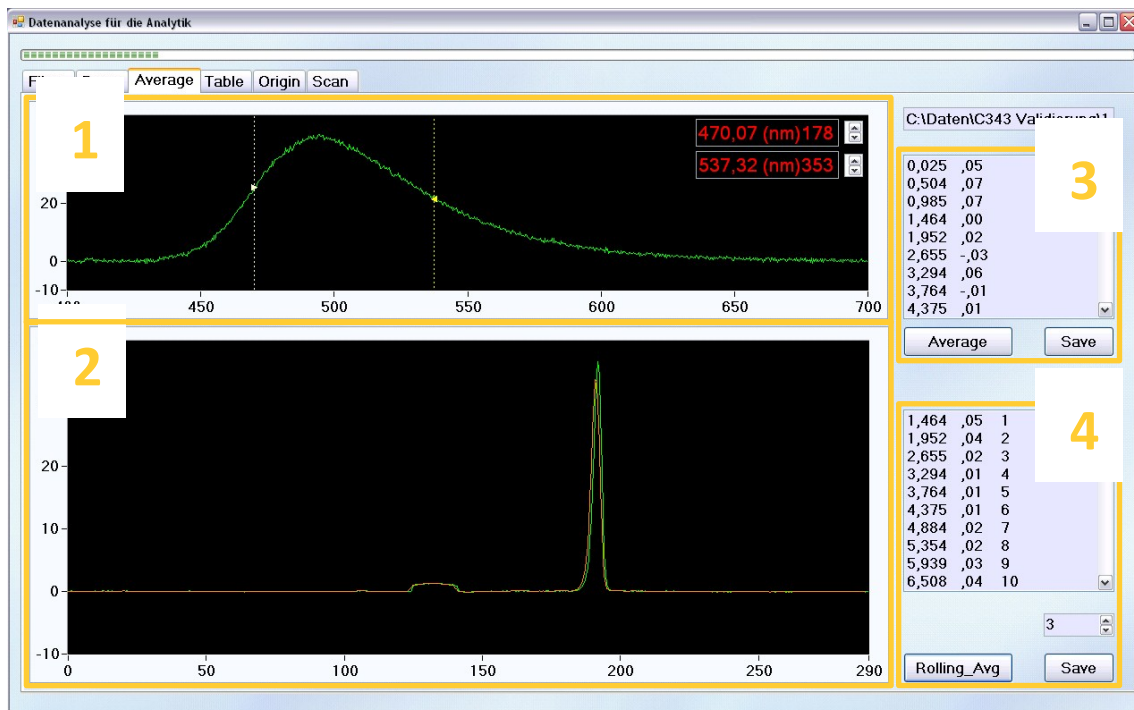


Abbildung 4.55: Oberfläche zur Erstellung eines Zeit-Intensitäts-Diagramms und zur Glättung mittels des gleitenden Mittelwertes (1 Spektrum zur Erstellung der Integrationsgrenzen, 2 Erstelltes (Rohdaten in 3) und geglättetes Elektropherogramm bzw. Chromatogramm (Rohdaten in 4 mit Einstellung des gleitenden Mittelwertes))

Im „Average“-Fenster in Abbildung 4.55 können Elektropherogramme bzw. Chromatogramme über einen frei wählbaren Integrationsbereich berechnet werden. Abbildung 4.55 1 zeigt dabei ein gewähltes Spektrum an, in dem die beiden voneinander unabhängigen Integrationsgrenzen gesetzt werden können. Die Rohdaten des resultierenden Zeit-Intensitäts-Diagramms werden in Abbildung 4.55 2 angezeigt und können gespeichert werden. Eine graphische Darstellung der Daten befindet sich in Abbildung 4.55 3, in welchem auch das geglättete Diagramm angezeigt wird. Eine Glättung zur Verbesserung der Nachweisstärke kann in Abbildung 4.55 4 erfolgen und das resultierende Diagramm gespeichert werden. Als Glättungsfunktion wird ein zentrierter gleitender Mittelwert kalkuliert,

wodurch die vorhandene Variation verringert wird. Beispielhaft ist in Gleichung 1 der zentrierte gleitende Mittelwert der Ordnung 3 dargestellt.

$$\bar{y}_2 = \frac{y_1 + y_2 + y_3}{3}, \bar{y}_3 = \frac{y_2 + y_3 + y_4}{3}, \bar{y}_4 = \frac{y_3 + y_4 + y_5}{3}, \dots \quad [1]$$

Auf diese Weise kann das Rauschen mit einem vernachlässigbaren Verlust an Informationen gemindert werden. Bei diesem Verfahren liegt für die ersten und letzten Reihenwerte kein gleitender Durchschnitt vor, da über diese kein Mittelwert gebildet werden kann.

The screenshot shows a software window titled 'Datenanalyse für die Analytik'. The 'Table' tab is active, displaying a grid of numerical data. The grid has 10 columns and 31 rows. The values in the grid are as follows:

516,7	517,09	517,47	517,85	518,23	518,62	519	519,38	519,76	520,15
5	5	6	5	6	6	6	6	6	6
10	10	10	10	10	10	11	10	10	11
16	16	19	17	16	18	18	19	17	20
28	28	30	29	30	30	30	32	31	33
46	47	48	49	49	50	51	54	51	53
71	73	75	75	76	78	79	82	81	84
108	111	113	114	116	119	121	122	123	128
152	158	161	163	166	170	173	175	177	180
208	212	218	221	224	230	232	237	238	244
270	275	283	287	292	295	301	307	311	316
331	338	347	352	358	366	371	378	383	391
387	394	402	411	419	426	433	441	445	453
428	440	449	457	465	474	481	489	496	502
453	465	473	482	491	501	509	519	524	533
458	468	480	486	496	507	515	525	531	538
443	453	461	471	479	490	496	504	513	521
408	419	427	435	443	451	459	465	473	480
363	372	381	387	393	401	405	414	420	427
309	316	322	327	333	340	347	351	356	362
252	258	264	269	274	279	282	289	290	296
199	205	209	213	215	219	224	228	230	234
155	159	162	165	166	170	172	177	178	181
116	119	123	124	127	129	131	133	134	138
87	89	92	93	94	98	98	100	101	103
65	67	70	71	70	72	73	76	76	76
50	51	53	53	55	55	55	58	57	58
39	38	41	41	41	42	43	44	44	45
31	31	32	32	33	33	35	34	34	36

On the right side of the window, there are control elements: a 'Fill Table' button, a 'Row Index' input field with the value '14', and a 'Col Index' input field with the value '101'.

Abbildung 4.56: Tabellenansicht des gesamten Arrays

In Abbildung 4.56 ist das „Table“-Fenster von Specana abgebildet. In diesem Fenster ist eine Tabellenansicht des gesamten, virtuellen Arrays integriert. Mit dieser Übersicht ist es möglich, den Datensatz schnell zu

überblicken. Eine weitere Funktion zur Erhöhung der Übersichtlichkeit ist das „Scan“-Fenster (Abbildung 4.57).

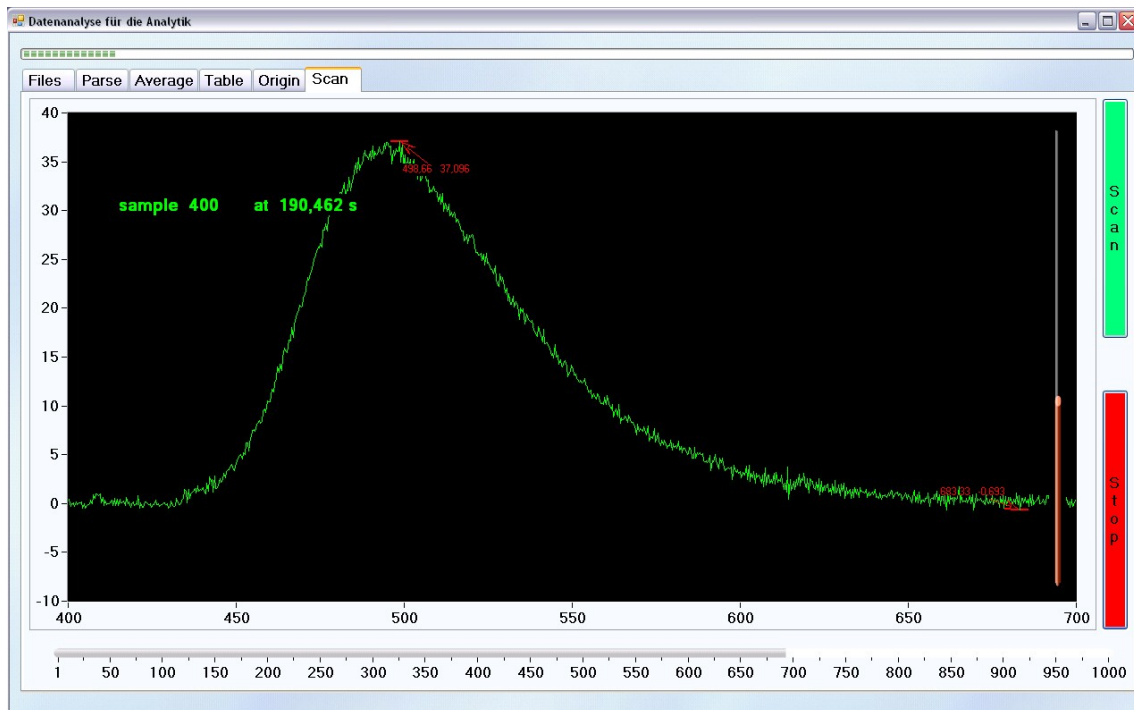


Abbildung 4.57: Oberfläche zur Schnelldurchsicht der aufgenommenen Spektren

Die „Scan“-Funktion in Abbildung 4.57 stellt eine komfortable Möglichkeit dar, die aufgenommenen Spektren mit erhöhter Geschwindigkeit durchzusehen. Auf diese Weise kann die Analyse nachvollzogen oder es können charakteristische Spektren gesucht werden.

Zusammenfassend ist es gelungen, eine Software zu entwickeln, die die hohe Informationsdichte der wellenlängenaufgelösten Detektion optimal ausnutzen kann. Die Specana-Software hat umfassende Möglichkeiten, die aufgenommenen Datensätze auszuwerten und zu betrachten. So können die Datensätze der Spektren angepasst werden. Aus dem reduzierten Datensatz kann anschließend ein dreidimensionales Array erstellt werden.

Dieses kann mittels „Origin“ oder über die integrierten Funktionen von Specana durchgesehen werden. Eine wichtige Funktion ist die Integration über einen frei wählbaren spektralen Bereich zur Erstellung von Elektropherogrammen bzw. Chromatogrammen, sowie die mathematische Glättung der Diagramme mittels gleitenden Mittelwerts.

Mit Hilfe dieser umfassenden Software ist es gelungen die Leistungsfähigkeit des LIF-Systems weiter zu verbessern. Deshalb sollen die Softwareparameter „Integrationsgrenzen“ und „gleitender Mittelwert“ optimiert werden, sodass die analytische Leistungsfähigkeit für die CE-LIF-Analyse quantifiziert werden kann.

4.7.13 Optimierung der Integrationsgrenzen

Zum Erreichen der bestmöglichen Nachweisgrenze kann die entwickelte Software Specana einen wertvollen Beitrag leisten. Der Integrationsbereich zur Erstellung von Elektropherogrammen mit dem besten Signal/Rausch-Verhältnis soll optimiert werden.

Zur Bestimmung des optimalen Signal/Rausch-Verhältnisses wird die elektrophoretische Trennung einer Coumarin 343-Lösung (10^{-11} mol/L) aus Abschnitt 4.7.8 verwendet. Dabei werden die bisher optimierten Werte (quadratische Kapillare, 40·10 ms Integrationszeit und eine Injektionszeit von 10 s mit einem Injektionsdruck von 50 mbar) eingesetzt. Die Einstellung der Integrationsgrenzen richtet sich am Fluoreszenzspektrum des Coumarins 343 aus.

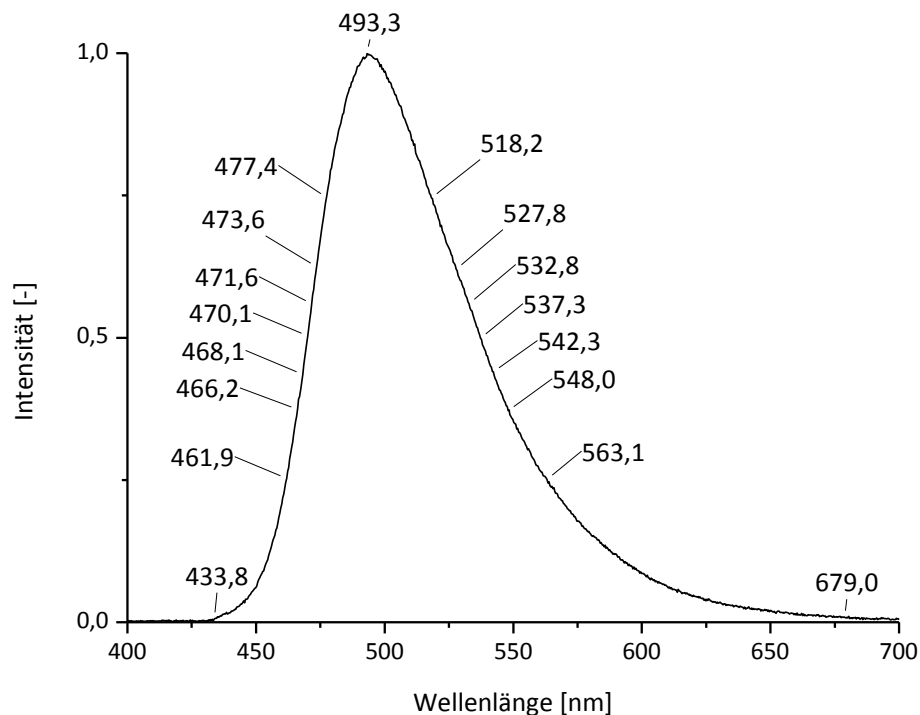


Abbildung 4.58: Fluoreszenzspektrum einer Coumarin 343-Lösung (10^{-11} mol/L) mit den verwendeten Integrationsgrenzen

In Abbildung 4.58 sind die verwendeten Integrationsgrenzen an einem Fluoreszenzspektrum von Coumarin 343 dargestellt. Dabei wurde ausgehend vom gesamten Fluoreszenzspektrum der Integrationsbereich schrittweise bis auf ein Viertel der Signalbreite verkleinert. Die durch die Integration erstellten Elektropherogramme wurden gespeichert und das resultierende Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. Als Rauschen wurde wiederum die doppelte Standardabweichung (SD) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.10 zusammengefasst.

Tabelle 4.10: Berechnete Signal/Rausch-Verhältnisse (S/N) für unterschiedliche Integrationsbereiche

Integrationsbereich [nm]	2-SD [-]	Signalhöhe [-]	S/N [-]
433,82 - 678,95	0,040	0,09	2,23
461,92 - 563,10	0,041	0,14	3,39
466,19 - 547,96	0,046	0,16	3,48
468,13 - 542,26	0,045	0,16	3,53
470,07 - 537,32	0,044	0,17	3,89
471,63 - 532,75	0,046	0,17	3,68
473,56 - 527,79	0,051	0,17	3,36
477,44 - 518,23	0,060	0,16	2,67
494,04 nm, Bandbreite 15 Pixel	0,141	0,24	1,73

Wie in Tabelle 4.10 gezeigt, weist der Integrationsbereich von 470,07-537,32 nm (etwa die Hälfte des Fluoreszenzspektrums) ein optimales Signal/Rausch-Verhältnis von 3,89 auf. Es muss demnach zwischen maximaler Rauschreduzierung, wie bei Integration des gesamten Fluoreszenzspektrum von 433,82-678,95 nm, und einem größtmöglichen Signal, welches bei der Integration eines sehr schmalen Bereichs um das Maximum von 477,44-518,23 nm erreicht wird, ein Kompromiss gefasst werden. Die Zunahme des Signal/Rausch-Verhältnisses mit dem Maximum bei 470,07-537,32 nm ist in der Tabelle gut zu sehen. Im Vergleich zum erhaltenen Elektropherogramm der Spektrometersoftware, welches mit einer Detektionswellenlänge von 494,04 und einer Bandbreite von 15 aufgenommen wurde, konnte eine Verbesserung des S/N von über einem Faktor zwei erreicht werden.

Unter Verwendung des Elektropherogramms mit dem besten S/N soll nun der Parameter „gleitender Mittelwert“ optimiert werden.

4.7.14 Optimierung des gleitenden Mittelwerts

Um die Nachweisgrenzen weiter zu optimieren, wird unter Verwendung des in Abschnitt 4.7.13 bestimmten Integrationsbereiches (407,07-537,32 nm) der gleitende Mittelwert mit dem besten Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt. Dazu wird mittels Specana eine unterschiedliche Anzahl gleitender Mittelwerte (1-7) miteinander verglichen. Durch Anwendung dieser Glättungsfunktion wurden Elektropherogramme erstellt und daraus die Signal/Rausch-Verhältnisse bestimmt. Als Rauschen wurde die doppelte Standardabweichung eingesetzt. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Tabelle 4.11: Berechnete Signal/Rausch-Verhältnisse (S/N) für unterschiedliche gleitende Mittelwerte

gleitender Mittelwert [-]	2·SD [-]	Signalhöhe [-]	S/N [-]
1	0,025	0,13	5,16
2	0,020	0,11	5,41
3	0,015	0,12	8,02
4	0,016	0,10	6,35
5	0,017	0,10	5,72
6	0,017	0,09	5,29
7	0,017	0,09	5,28

Anhand der Tabelle **4.11** ist gut zu erkennen, dass das beste Signal/Rausch-Verhältnis mit 8,02 für einen gleitenden Mittelwert von 3 erhalten wird. Bereits bei einem gleitenden Mittelwert von 1 ist eine deutliche Verbesserung des S/N zu beobachten. Mit dieser Funktion kann demnach die Nachweisstärke verbessert werden, ohne signifikante Informationen zu verlieren. In der Tabelle ist zu sehen, wie das Signal/Rausch-Verhältnis mit zunehmendem gleitendem Mittelwert größer wird und ab einem Wert von vier wieder abfällt. Auch hier muss ein Kompromiss zwischen Glättung des Rauschens und Verminderung der Signalthöhe gefunden werden. Außerdem ist das Analytsignal bei stärkerer Glättung (gleitender Mittelwert >6) nicht mehr auswertbar.

Für diese Messreihe ergibt der gleitende Mittelwert von drei das beste Signal/Rausch-Verhältnis. Es konnte auf diese Weise eine Verbesserung des S/N von über Faktor vier im Vergleich zum Ausgangselektropherogramm erreicht werden.

4.7.15 Auswirkungen der Integrationsgrenzen und des gleitenden Mittelwerts

Die Auswertungsfunktionen der Software Specana ermöglichen eine deutliche Verbesserung der Nachweisstärke des LIF-Systems. Mit dem optimierten Integrationsbereich von 470,07-537,32 nm und dem optimierten gleitenden Mittelwert von 3 konnte das Signal/Rausch-Verhältnis für die Analyse von Coumarin 343 erhöht werden. Im Vergleich zum Ausgangswert der Software des Spektrometerherstellers von 1,7

konnte das S/N insgesamt auf 8,0 gesteigert werden, was einer Gesamtverbesserung um den Faktor 4,6 entspricht. Diese Steigerung der Nachweisstärke ist anhand der entsprechenden Elektropherogramme in Abbildung 4.59 verdeutlicht.

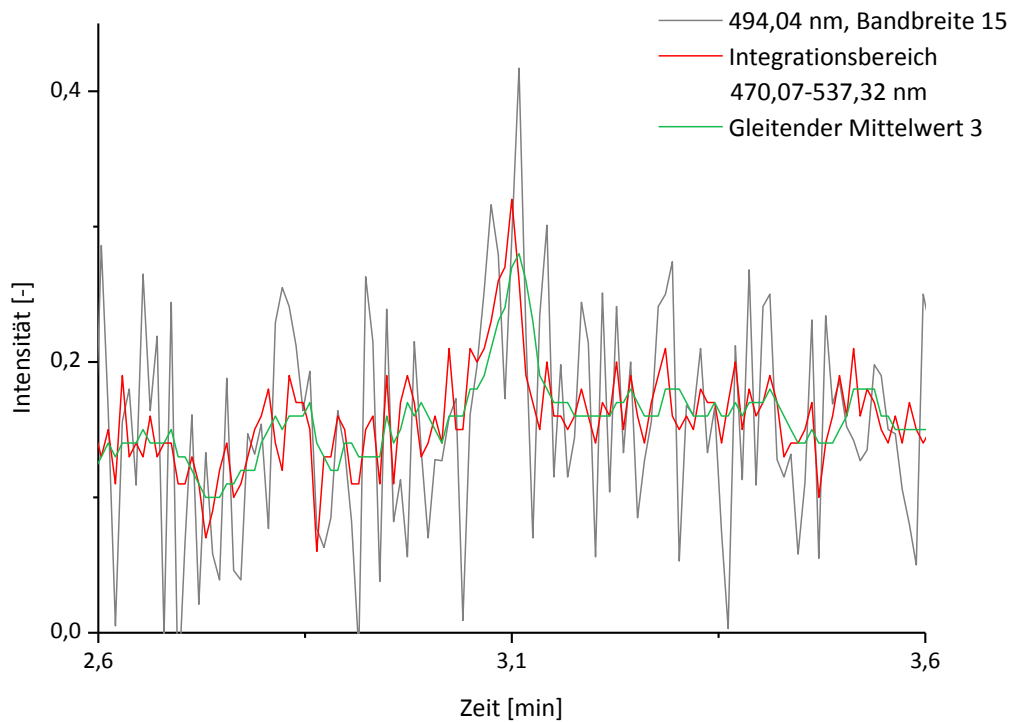


Abbildung 4.59: Vergleich des ursprünglichen Elektropherogramms (grau) von Coumarin 343 (10^{-11} mol/L) mit denen des optimalen Integrationsbereichs (rot) und des optimalen gleitenden Mittelwerts (grün)

In Abbildung 4.59 können die einzelnen Optimierungsschritte nachvollzogen werden. Der erste Verbesserungsschritt des Signal/Rausch-Verhältnisses ist die Nutzung der ausgewählten Integrationsgrenzen (rot), dabei wird eine Verbesserung von 1,73 auf 3,89, also um den Faktor 2,2, im Vergleich zum ursprünglichen Elektropherogramm der Spektrometersoftware (grau) erreicht. Durch die Rauschreduzierung bei Verwendung des gleitenden Mittelwerts (grün) konnte das S/N von 3,89 auf 8,02 um den Faktor 2,1 verbessert werden.

Insgesamt konnte die Nachweisgrenze mit Einsatz der Specana-Auswertefunktionen um den Faktor 4,6 gesenkt werden. Mit den ermittelten Parametern kann nun die analytische Leistungsfähigkeit des Detektionssystems bezüglich der Nachweisstärke und des linearen dynamischen Bereichs ermittelt werden.

4.7.16 Geräteparameter zur Bestimmung der analytischen Leistungsfähigkeit des Detektionssystems

Für die Charakterisierung der vierten Version des entwickelten Detektionssystems wurde eine einfache elektrophoretische Trennung des Modellanalyten Coumarin 343 verwendet, die alle bisherigen optimierten Parameter und Weiterentwicklungen beinhaltet. Die Parameter der CE, des Kompaktspektrometers und der Software Specana sind im Folgenden zusammengefasst.

Zur Bestimmung der analytischen Leistungsdaten des Detektionssystems wurde eine wässrige, 10^{-4} mol/L Stammlösung von Coumarin 343 hergestellt. Durch entsprechende Verdünnungsschritte wurden Lösungen mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-12}$ mol/L mit jeweils drei Unterteilungen von Faktor 1, 2,5 und 5 je Dekade hergestellt.

Nach der Ausrichtung des Lasers, wobei die Kapillare eingespannt und mit Coumarin 343-Lösung (10^{-7} mol/L) in der CE gefüllt wurde, wurde anschließend der Laser manuell auf die maximale Intensität der Fluoreszenz eingestellt. Die Kapillare wurde mit Natronlauge (1 mol/L,

10 min) und mit Pufferlösung (30 min) konditioniert um Analytreste zu entfernen.

Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Injektionsdauer betrug 10 s bei einem Injektionsdruck von 50 mbar, dies entspricht 500 mbar·s. Die verwendete Kapillare mit quadratischem Querschnitt hatte eine Länge von 50 cm (effektiv 35 cm) und einen inneren Durchmesser von 75 µm. Die Trenndauer betrug 5 min, wobei ein konstanter Strom von 40 µA mit einer resultierenden Spannung von etwa 14 kV angelegt wurde. Nach jeder Analyse wurde die Kapillare eine Minute lang mit einem Boratpuffer (pH=9, 100 mmol/L, Herstellung s. 3.2.1) gespült.

Der CCD-Chip wurde über den thermoelektrischen Kühler auf -15 °C gekühlt. Die Integrationszeit zur Aufnahme der Spektren betrug 10 ms, wobei für jedes Spektrum 40 Aufnahmen gemittelt wurden, sodass alle 400 ms ein Spektrum erstellt werden konnte. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt. Die verwendete Glasfaser hatte eine Faserdicke von 600 µm und einen SMA 905-Anschluss.

Als Anregungsquelle wurde ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 405 nm und einer optischen Ausgangsleistung von 100 mW eingesetzt, der mit einem Strom von 80 mA und einer resultierenden Spannung von etwa 6,6 V betrieben wurde. Der Laserstrahl wurde mittels einer asphärischen Linse mit einer Antirefleksionsbeschichtung für den Bereich 400-600 nm fokussiert. Der Emissionsfilter hatte eine *cut-on*-Wellenlänge von 435 nm.

Die Auswertung der aufgezeichneten Spektren zur Berechnung der Elektropherogramme erfolgte mittels der Software Specana. Dabei waren die Integrationsgrenzen 470,07-537,32 nm. Zur Glättung des Rauschens wurde ein gleitender Mittelwert von 3 verwendet.

4.7.17 Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze und linear dynamischer Bereich

Als Nachweisgrenze ($S/N=3$) konnte für Coumarin 343 $5,3 \cdot 10^{-12}$ mol/L bestimmt werden und demnach liegt die Bestimmungsgrenze ($S/N=10$) bei $1,8 \cdot 10^{-11}$ mol/L. Die Elektropherogramme, mit welchen diese Grenzen bestimmt wurden, sind in Abbildung 4.60 gezeigt.

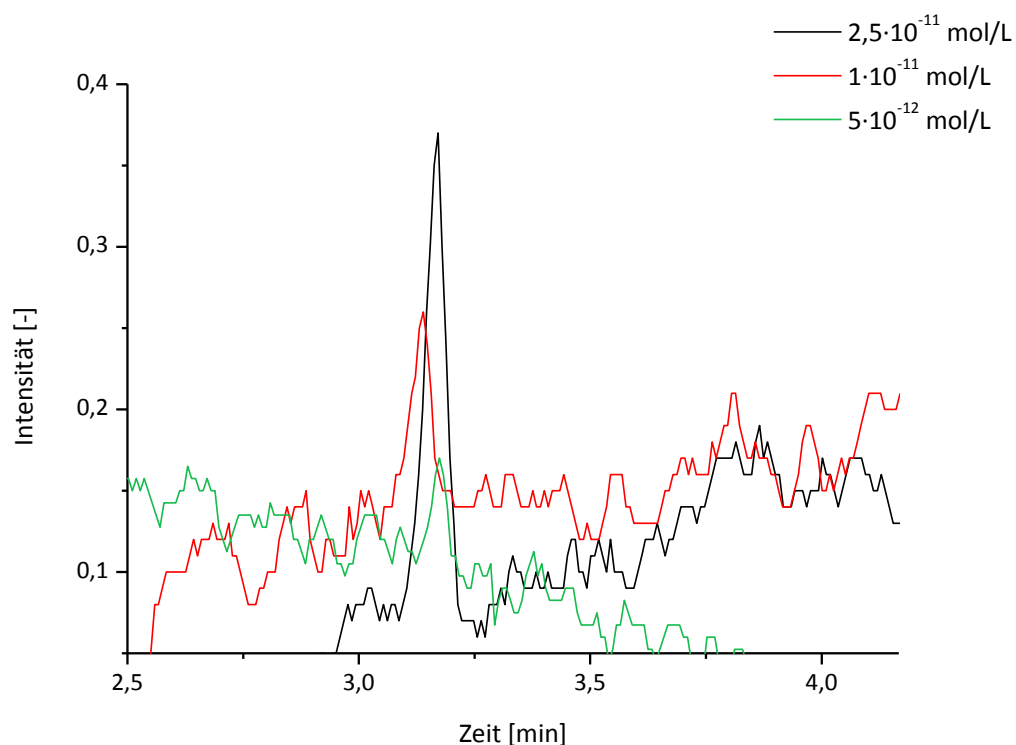


Abbildung 4.60: Elektropherogramme von Coumarin 343-Lösungen nahe der Nachweis- ($5 \cdot 10^{-12}$ mol/L, grün) bzw. nahe der Bestimmungsgrenze ($1 \cdot 10^{-11}$ mol/L rot) sowie der Konzentration $2,5 \cdot 10^{-11}$ mol/L

Für die Berechnung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurde die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich als Rauschen eingesetzt. Auf diese Weise kann für die Probenkonzentration von $5 \cdot 10^{-12}$ mol/L ein S/N von 2,84 angegeben werden, sodass die Nachweisgrenze mit einem S/N von 3 bei $5,3 \cdot 10^{-12}$ mol/L liegt.

Für die Bestimmung des linear dynamischen Bereichs wurde eine Kalibriergerade der Flächenmittelwerte der Oxazin-1-Lösungen erstellt. Abbildung 4.61 zeigt die erhaltenen Messwerte in einer doppellogarithmischen Auftragung.

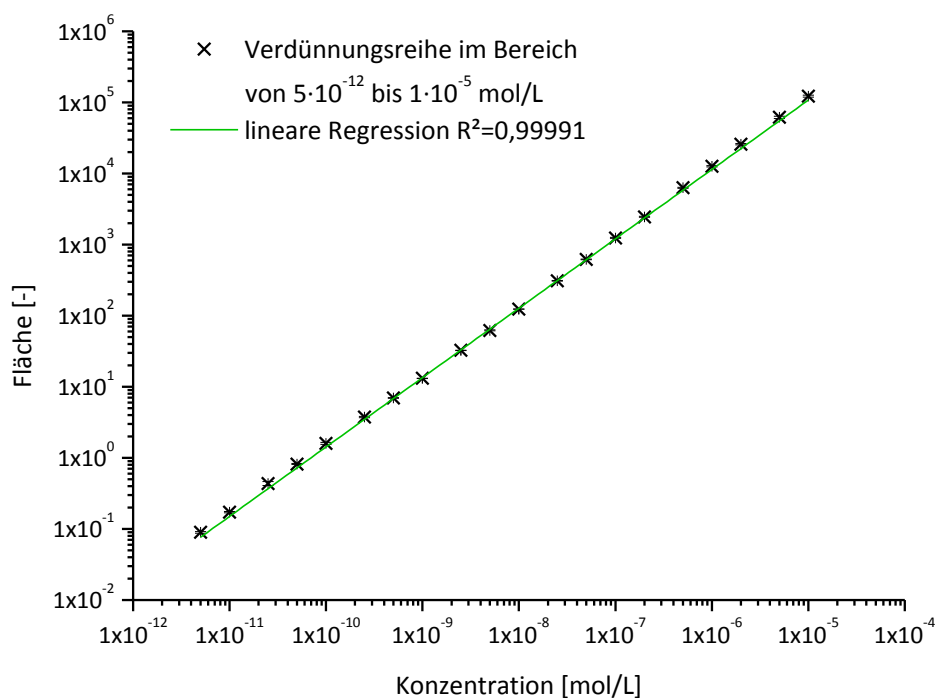


Abbildung 4.61: Linear dynamischer Bereich in doppellogarithmischer Auftragung

Anhand der Messwerte wurde eine lineare Regression durchgeführt. Im Bereich von $5 \cdot 10^{-12}$ mol/L bis $1 \cdot 10^{-5}$ mol/L wurde ein Regressionskoeffizient

von $R^2=0,99991$ erhalten. Somit erstreckt sich der lineare dynamische Bereich über mehr als sechs Dekaden.

4.7.18 Ergebnisse und Ausblick

Durch die bei der Entwicklung der Prototypen I bis III gewonnene Erfahrung konnte beim vierten Prototyp eine erfolgreiche Weiterentwicklung erzielt werden. Dank der Verwendung von PEEK als Gehäusematerial konnten Überschläge der Hochspannung auf den Laser verhindert werden. Die neu entwickelte, in x-, y- und z-Richtung positionierbare Glasfasereinheit, die neben der Glasfaser auch den Emissionsfilter und eine Kugellinse zur Fokussierung der Fluoreszenz enthält, sowie die verwendete quadratische Kapillare konnten die Streustrahlung massiv verringern. Außerdem kann die Lasereinheit in x-Richtung bewegt sowie entlang der z-Achse gekippt werden, wodurch eine optimale Anregung der Fluoreszenz bei minimaler Streuung ermöglicht wird. Auf Grundlage der guten Korrelation zwischen der Anregungsenergie und der emittierten Fluoreszenzintensität wurden Laserdioden mit höheren optischen Ausgangsleistungen verwendet. Mit einer 35 mW-Diode (635 nm), welche die bisherige 5 mW-Diode (635 nm) ersetzte, konnte für den Modellanalyten Oxazin-1 eine sehr gute Nachweisgrenze von $4 \cdot 10^{-10}$ mol/L erreicht werden.

Um die Flexibilität des Systems bezüglich der Anregungswellenlängen zu steigern, wurde ein Gehäuse für Laserdioden konstruiert, mit welchem der Einsatz leistungsstärker Dioden mit verschiedenen Wellenlängen möglich

ist. Zusammen mit dem Wechsel der Laserdiode wurde auch eine neue asphärische Linse mit einer Antirefleksionsbeschichtung für einen Bereich von 400-600 nm integriert und der Emissionsfilter angepasst.

Um die volle Leistungsfähigkeit der Wellenlängenauflösung ausnutzen zu können, wurde eine individuell angepasste Software (Specana) programmiert. Mit Specana können die aufgenommenen Spektren umfangreicher als bisher ausgewertet werden. So kann der Integrationsbereich zur Erzeugung der Elektropherogramme frei gewählt und durch die Glättung des Rauschens mittels eines gleitenden Mittelwerts die Nachweisgrenze weiter gesenkt werden. Außerdem kann der vollständige Datensatz einer Messung in ein dreidimensionales Elektropherogramm bzw. Chromatogramm umgewandelt werden. Auf diese Weise sind alle Informationen einfach und schnell zugänglich.

Eine Optimierung der Injektionszeit konnte die Nachweistärke weiterhin verbessern und die Optimierung der Integrationszeit bzw. die Erhöhung der Mittelungen je Spektrum vergrößerte deutlich den linearen dynamischen Bereich. Zusammenfassend konnte die Nachweisgrenze im Vergleich zum dritten Prototypen für Coumarin 343 um über Faktor 10000 auf $5,3 \cdot 10^{-12}$ mol/L und die Bestimmungsgrenze auf $1,8 \cdot 10^{-11}$ mol/L verbessert werden. Der lineare dynamische Bereich konnte mehr als verdoppelt werden auf einen exzellenten Bereich von über sechs Dekaden.

Mit diesen technischen Verbesserungen sowie allen weiteren Optimierungen wie der Specana-Software konnte die analytische

Leistungsfähigkeit des CE-LIF-Systems in einen sehr guten Bereich gebracht werden. Es sollte jedoch die Robustheit sowie die Flexibilität des Systems weiter erhöht werden. So wäre eine feste Arretierung der justierbaren Einheiten nützlich. Weitere Anregungswellenlängen werden durch die globale technische Entwicklung von Laserdioden mittelfristig kommerziell verfügbar werden, wobei insbesondere der UV-Bereich für die Fluoreszenzdetektion bedeutend ist, da dort viele Moleküle Fluoreszenzeigenschaften zeigen.

Besonders interessant ist die Erweiterung des Detektionssystems auf andere Trenntechniken abseits der Kapillarelektrophorese. Eine Weiterentwicklung des Detektionssystems durch einen speziellen Adapter zur Kopplung an die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) würde den verfügbaren Anwendungsbereich deutlich vergrößern. So könnten ionische Analyten mittels CE oder Ionenchromatographie (IC) getrennt und mit dem LIF-System detektiert werden. Dies gilt auch für unpolare oder polare Analyten, welche mit der HPLC getrennt werden können. Daher soll ein Adapter entwickelt werden, der das Detektionssystem auch für die HPLC bzw. IC zugänglich macht.

4.8 Fünfte Modellversion

4.8.1 Einleitung

Mit dem vierten Prototypen wurde durch die kontinuierliche Weiterentwicklung sowie Optimierung eine sehr gute analytische Leistungsfähigkeit erreicht. Für Coumarin 343 konnten ausgezeichnete Nachweis- ($5,3 \cdot 10^{-12}$ mol/L) und Bestimmungsgrenzen ($1,8 \cdot 10^{-11}$ mol/L) ermittelt werden. Der lineare dynamische Bereich erstreckt sich über einen großen Bereich von mehr als sechs Dekaden. Einen großen Anteil an dieser Nachweisstärke hat auch die eigens programmierte Software Specana, mit welcher die aufgezeichneten Spektren zusätzlich in dreidimensionale Diagramme umgewandelt werden können.

Um dieses kompakte und leistungsfähige Detektionssystem auch anderen analytischen Trennmethode zur Verfügung stellen zu können, wurde ein modularer Adapter entwickelt. Dieser Adapter kann je nach verwendeter Methode schnell und einfach gewechselt werden. Für die CE-Kapillare wird eine Halterung, welche der bisherigen ähnlich ist, konstruiert. Eine völlige Neukonstruktion ist der Adapter für die flüssigchromatographischen Trennmethode HPLC und IC. Der Adapter enthält eine Glaskapillare mit zwei Metallkappen, an welche die HPLC- bzw. IC-Kapillaren mit Standardanschlüssen angeschlossen werden können. Die fünfte Modellversion mit eingebautem HPLC-Adapter ist in Abbildung **4.62** gezeigt.

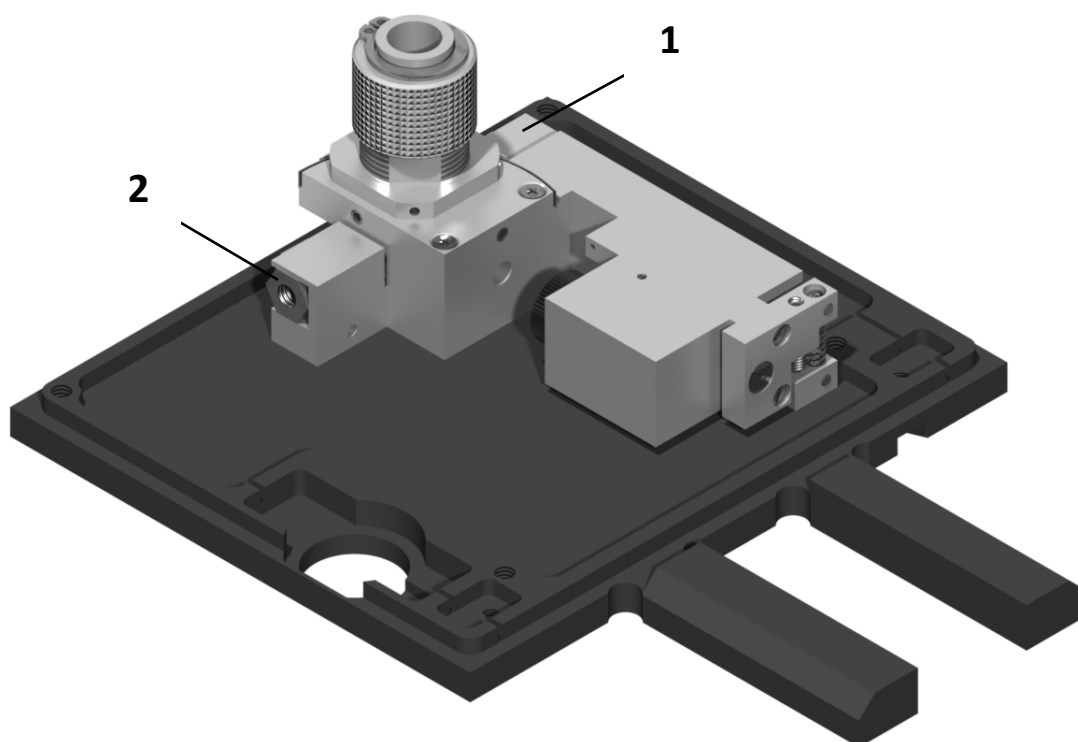


Abbildung 4.62: Fünfte Version eines kompakten, wellenlängenaufgelösten LIF-Systems mit eingesetztem HPLC-Adapter (1 Modularer Adapter, 2 Glaskapillare mit Metallanschlüssen)

Damit die maximale Nachweisstärke auch für die LIF-Detektion bei der HPLC ausgenutzt werden kann, sollen der Innendurchmesser und die Geometrie der Glaskapillare optimiert werden. Ebenfalls soll untersucht werden, welchen Einfluss die Oberflächenbeschaffenheit (mechanisch poliert bzw. flamppoliert) hat. Unter Verwendung dieser Optimierungen soll die Nachweisstärke der HPLC-LIF-Kopplung mit dem CE-LIF-System verglichen werden.

4.8.2 Technische Veränderungen

Für eine erweiterte Flexibilität und die Möglichkeit, das Detektionssystem für die HPLC und IC nutzen zu können, wurde ein modulares Adaptersystem entwickelt. Diese Adapter können je nach Trennmethode einfach und schnell gewechselt werden. Die Detektionseinheit mit dem neuen HPLC- sowie mit dem CE-Adapter ist in Abbildung 4.63 dargestellt.

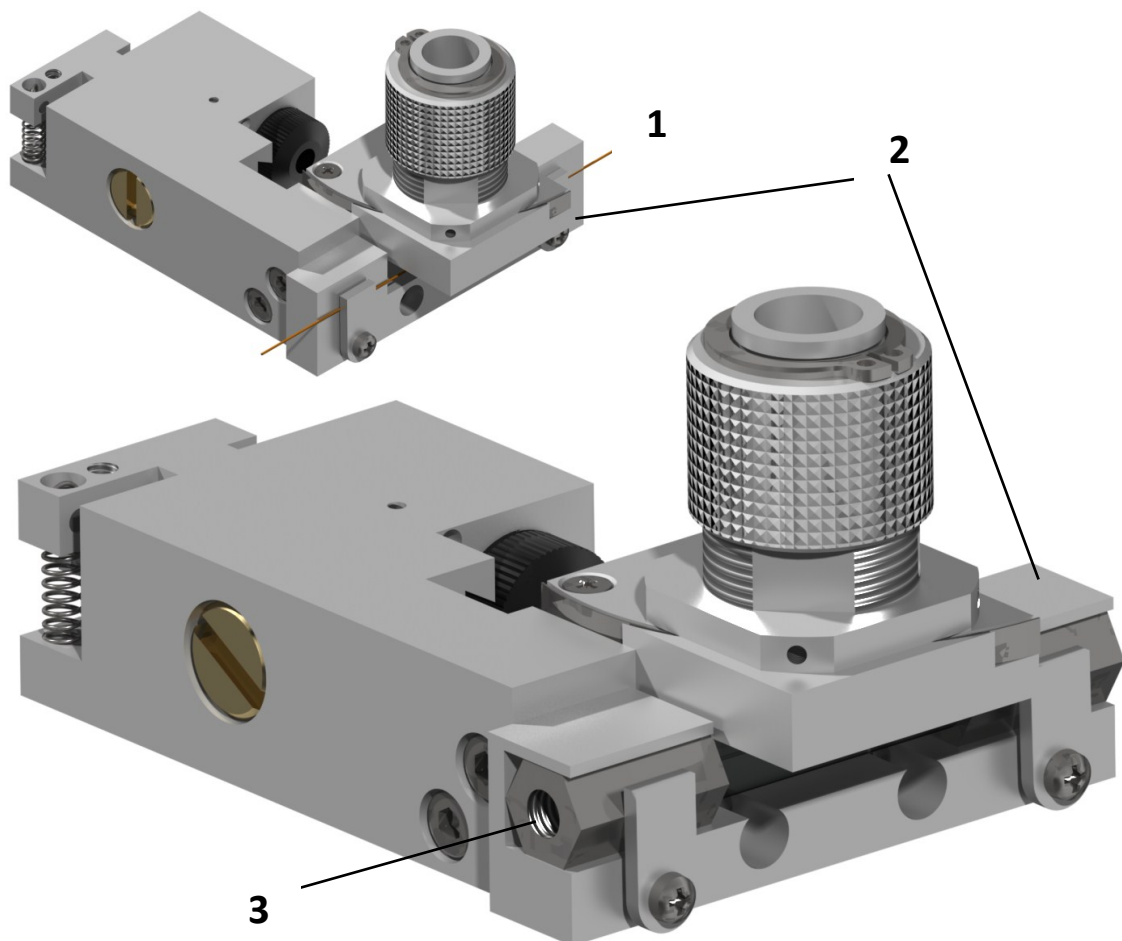


Abbildung 4.63: Detektionseinheit der fünften Modellversion mit CE-Adapter (oben) bzw. HPLC-Adapter (unten) (1 CE-Kapillare, 2 Modularer Adapter, 3 Glaskapillare mit Metallanschlüssen zur HPLC- bzw. IC-Kopplung)

Alle bisher erfolgreichen Verbesserungen des vierten Prototypen wurden bei der fünften Modellversion beibehalten. Dazu zählt die in x-, y- und z-Richtung justierbare optische Einheit aus Kugellinse, Emissionsfilter sowie Glasfaser, wie auch die entlang der x- und z-Achse positionierbare Lasereinheit. In der fünften Modellversion wurde vornehmlich die Halterung der Kapillare weiterentwickelt. Diese ist nun modular aufgebaut und kann bei Bedarf gewechselt werden. Die für die HPLC-Kopplung eingesetzte Glaskapillare hat im Vergleich zur CE-Kapillare (350 μm) einen sehr viel größeren Außendurchmesser (6 mm), der aufgrund des hohen Druckes bei der HPLC notwendig ist. Es wurden Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 200 bis 350 μm zur Optimierung verglichen. An beiden Enden des HPLC-Adapters befinden sich Metallanschlüsse mit Gewinden für die Nutzung von HPLC-Kapillaren mit Standardanschlüssen. Zudem ist die Glaskapillare an zwei Seiten abgeflacht, um die Streuung zu minimieren (Abbildung 4.64).

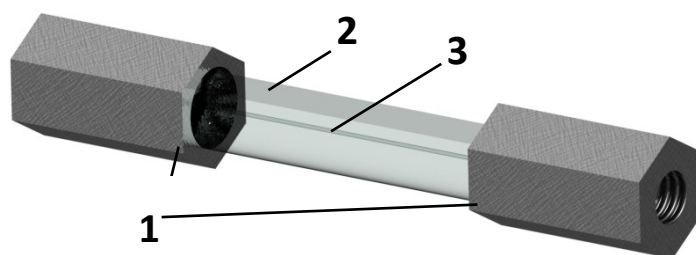


Abbildung 4.64: Glaskapillare des HPLC-Adapters (1 Metallanschlüsse mit Gewinde, 2 abgeflachte Seite der Kapillare, 3 Innendurchmesser 200-350 μm)

Das bisherige Detektionssystem war für die Verwendung der äußerst dünnen CE-Kapillare ausgelegt, daher musste die Basis der x-, y-, z-Positioniereinheit verlängert werden, um die Glasfaser über der Glaskapillare positionieren zu können. Zur Kompensation dieser

Verlängerung wurde die x-Achse der Lasereinheit verkürzt, sodass diese auf einer Strecke von 5 mm justiert werden kann. Eine vollständige Übersicht der Bauteile ist in Abbildung 4.65 gezeigt.

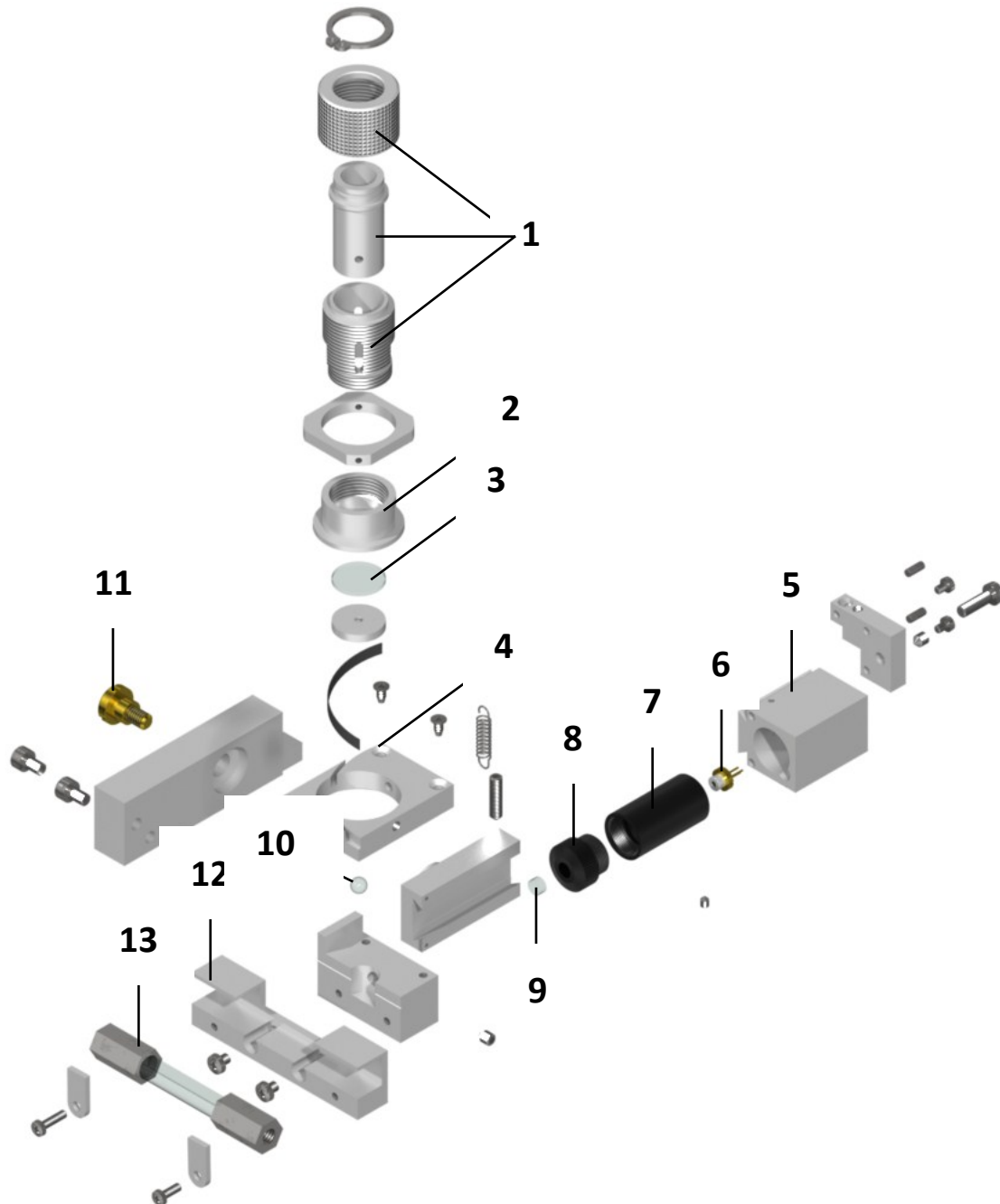


Abbildung 4.65: Explosionsansicht der fünften Modellversion: 1 Glasfaserhalterung mit z-Positionierung, 2 Zylinder für Glasfaser, Filter und Linse, 3 Emissionsfilter, 4 x-, y-Rahmen, 5 Lasereinheit, 6 Laserdiode, 7 Lasergehäuse, 8 Laserlinsenhalter, 9 Asphärische Linse, 10 Kugellinse, 11 Laserkipkachse, 12 HPLC-Adapter, 13 Glaskapillare für die HPLC-Kopplung

Das Gehäuse ist weiterhin aus PEEK gefertigt, da mit diesem Material die optimale elektrische Isolation und eine bessere thermische Leitfähigkeit, wodurch die vom Laser erzeugte Wärme effizienter abgeführt werden kann, erreicht wird. Allerdings musste das gesamte Detektionssystem durch den Einbau des HPLC-Adapters um etwa 20 mm auf 55 mm verbreitert werden. Diese Verbreiterung ist notwendig, da die Metallanschlüsse des Adapters einen größeren Durchmesser (8 mm) haben als die Glaskapillare und der Abstand zwischen Kugellinse und Mittelpunkt der Glaskapillare bei etwa 2,7 mm liegen sollte. Deshalb ist die Glaskapillare genauso breit wie der x-, y-Rahmen. Die zusätzliche Verbreiterung liegt an den beiden Anschlüssen, welche wie in Abbildung 4.63 an beiden Enden der Glaskapillare angebracht sind. Ein Abstand zwischen dem Mittelpunkt der Kapillare und der Kugellinse von <3 mm wird durch Ausnutzung der flachen Kapillarseite erreicht. Mit der 5 mm kürzeren Positioniermöglichkeit des Lasers in x-Richtung konnten sowohl Länge (79 mm) als auch Höhe (45 mm) zum Vorgängermodell identisch gehalten werden.

4.8.3 Optische Bank für den HPLC-Adapter

Für eine unkomplizierte Verifizierung der Parameter wie Abstände und Position für den Einsatz des HPLC-Adapters im Detektionssystem wurde die vorhandene optische Bank (Abschnitt 4.6.4) modifiziert. Der Halter für die CE-Kapillare wurde durch eine Haltevorrichtung für die Glaskapillaren des HPLC-Adapters ersetzt (Abbildung 4.66).

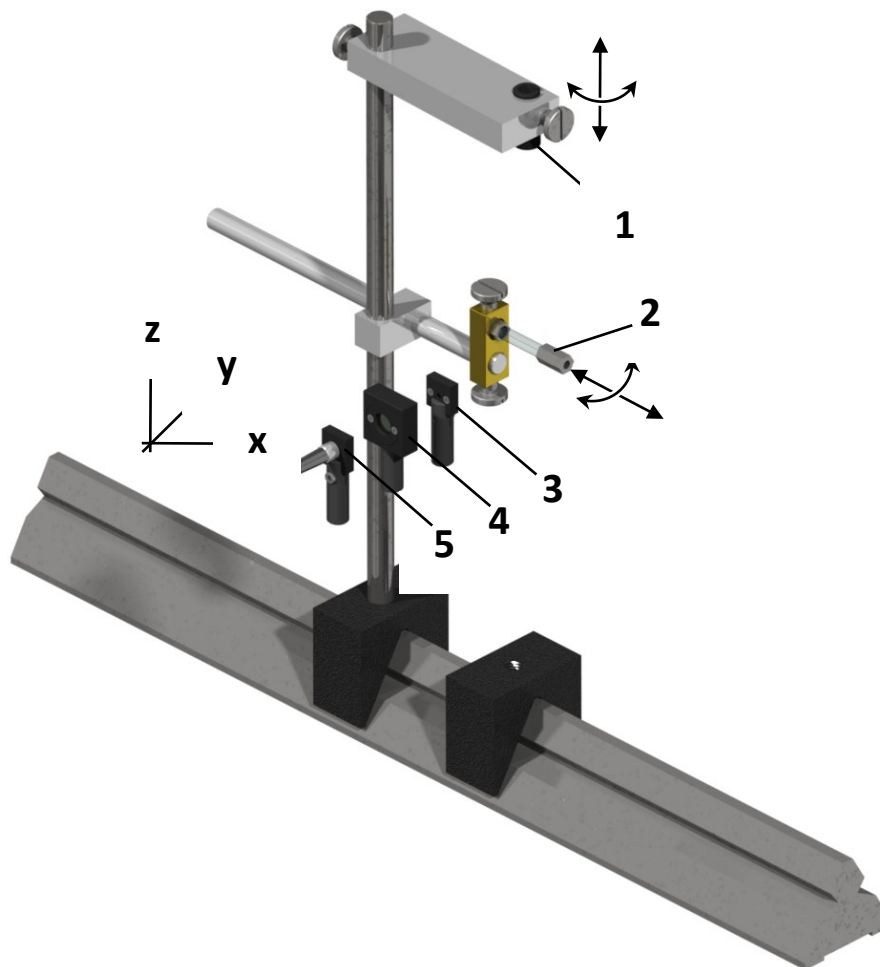


Abbildung 4.66: Individuell konstruierte optische Bank zur Optimierung des Detektionssystems (1 Diodenlaser, 2 Glaskapillare zur HPLC-Kopplung, 3 Kugellinse, 4 Emissionsfilter, 5 Glasfaser)

Die in Abbildung 4.66 dargestellte optische Bank bietet zahlreiche Optimierungsmöglichkeiten, wie die Positionierung des Lasers, die Halterung der Glaskapillare und eine sehr präzise Justierung der drei Detektionselemente (Sammellinse, Emissionsfilter und Glasfaser). Mit all diesen Einstellungsoptionen ist es möglich, den Brennpunkt des Laserstrahls auf die gewünschte Stelle zu fokussieren und die Abstände der Detektionselemente untereinander und relativ zur emittierten Fluoreszenz auf die maximale Intensität zu optimieren. Mit dieser

Konstruktion ist es schnell und einfach möglich, Glaskapillaren für den HPLC-Adapter mit unterschiedlichen Innendurchmessern bzw. Geometrien miteinander zu vergleichen und ein Optimum zu finden.

4.8.4 Optimierung der Glaskapillaren zur HPLC-Kopplung

Mit Einführung des modularen HPLC-Adapters in der fünften Modellversion ist notwendig, die darin eingebaute Glaskapillare zu optimieren. Dabei sollen Glaskapillaren mit verschiedenen Innendurchmessern (200, 250, 300 und 350 μm) und Querschnitten miteinander verglichen werden. Neben einer runden Kapillare (300 μm) werden Glaskapillaren aller Durchmesser mit zwei abgeschliffenen Flächen analog zu den CE-Kapillaren in Abschnitt 4.6.6 getestet. Die Kapillaren haben also zwei flache, abgeschliffene Seiten orthogonal zueinander, um Streuung zu minimieren. Außerdem wird eine abgeschliffene und anschließend flampolierte Kapillare (300 μm) eingesetzt. Beim Flampolieren wird durch Erhitzen mit einer Knallgasflamme die Oberfläche der Glaskapillare angeschmolzen, sodass eine intakte, klare Oberfläche entsteht.

Für die Vergleichstests wurden die einzelnen Glaskapillaren in die modifizierte optische Bank (Abschnitt 4.8.3) eingespannt. Anschließend wurde eine Oxazin-1-Lösung (10^{-6} mol/L) mittels einer Spritzenpumpe in die Kapillare gefüllt. Als Anregungsquelle wurde ein 635 nm-Diodenlaser mit einer optischen Ausgangsleistung von 5 mW verwendet. Der Emissionsfilter hatte eine *cut-on*-Wellenlänge von 665 nm und die

emittierte Fluoreszenz wurde mit einer Kugellinse ($\varnothing=4$ mm, Quarzglas) gesammelt. Nach dem Befüllen der jeweiligen Kapillare wurde durch Nutzung aller Justiermöglichkeiten die maximale Fluoreszenzintensität eingestellt. Der gesamte Vorgang wurde für jede Kapillare drei Mal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.67 zusammengefasst.

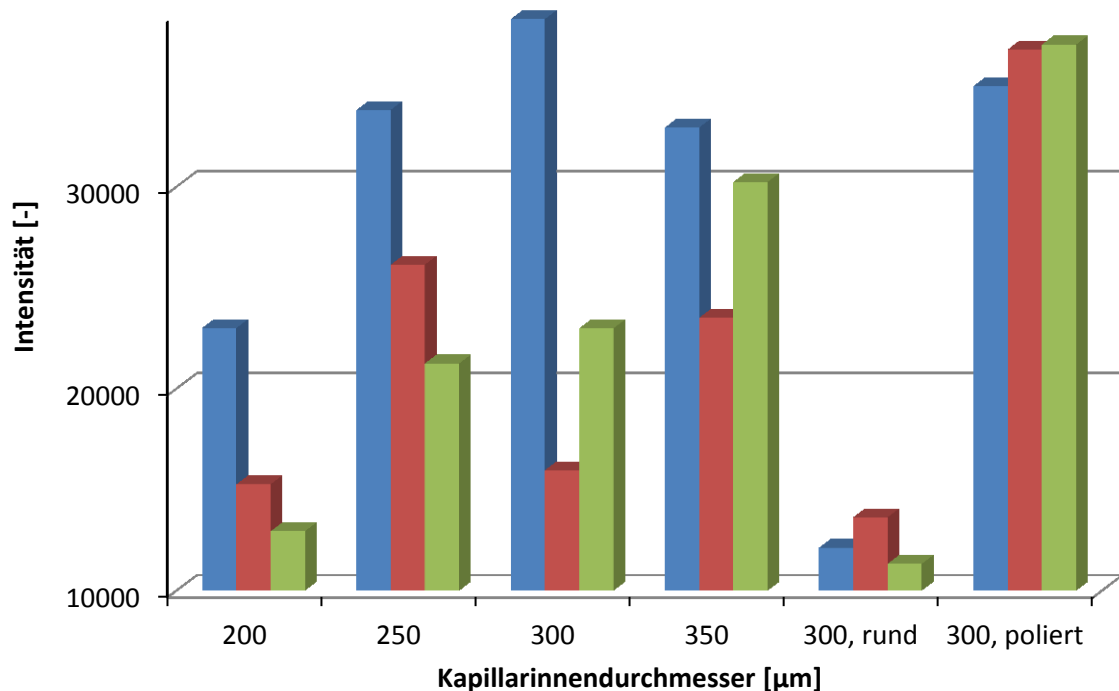


Abbildung 4.67: Vergleich verschiedener Glaskapillaren des HPLC-Adapters mittels einer Oxazin-1-Lösung (10^{-6} mol/L)

Wie in Abbildung 4.67 gezeigt, ist bei den abgeschliffenen Kapillaren eine sehr starke Streuung der Messwerte zu beobachten. Dies liegt vermutlich an den durch das Schleifen verursachten Unebenheiten auf der Oberfläche, sodass bei einigen Positionen auf der Kapillare die Fluoreszenz besser angeregt und detektiert werden kann. Weiterhin fällt auf, dass bei der unbehandelten Kapillare mit rundem Querschnitt deutlich geringere Intensitäten detektiert wurden, welche jedoch aufgrund der glatten

Oberfläche nur eine sehr geringe Streuung aufweisen. Die deutlich geringeren Intensitäten liegen an dem zu großen Abstand der Kugellinse zum Kapillarmittelpunkt sowie an einer erschwerten Fokussierung des Laserstrahls bzw. der Fluoreszenz durch die Beugung an der runden Oberfläche. Das beste Ergebnis wird bei Verwendung einer flamppolierten Kapillare mit zwei flachen Seiten erhalten. Diese weist konsistente Messwerte und sehr gute Intensitäten auf. Für eine genauere Betrachtung sind die Messwerte in Tabelle 4.12 dargestellt.

Tabelle 4.12: Vergleich verschiedener Glaskapillaren des HPLC-Adapters mittels einer Oxazin-1-Lösung (10^{-6} mol/L)

Kapillarinnen- durchmesser [μm]	Mittlere Intensität [-]	SD [-]	RSD [%]
200	17071	5269	30,9
250	27064	6327	23,4
300	25751	11423	44,4
350	28893	4851	16,8
300, rund	12362	1169	9,5
300, flamppoliert	36271	1125	3,1

Durch die starke Streuung der einzelnen Messwerte bei den abgeschliffenen Kapillaren kann keine Unterscheidung zwischen den 250-350 μm -Kapillaren erfolgen. Diese drei Kapillaren zeigen ähnlich hohe Messwerte mit einer Tendenz zu höheren Intensitäten bei größerem Innendurchmesser. Ein sehr gutes Ergebnis wird für die flamppolierte Kapillare erhalten, da diese im Mittel die höchste Intensität erreicht und mit nur 3,1 % eine sehr geringe relative Standardabweichung aufweist. Im

Vergleich zur Kapillare mit rundem Querschnitt ist die Intensität etwa verdreifacht und die relative Standardabweichung zwischen den Messungen beträgt nur ein Drittel.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden weitere flammpolierte Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 350 μm angefertigt und diese in den folgenden HPLC-LIF-Analysen verwendet.

4.8.5 Flüssigchromatographische Analyse des Modellanalyten

Coumarin 343

Für die ersten Versuche mit dem HPLC-Adapter der fünften Modellversion wurde eine einfache flüssigchromatographische Modellanalyse von Coumarin 343 entwickelt. Zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit des HPLC-LIF-Systems wurde eine wässrige, 10^{-4} mol/L Stammlösung von Coumarin 343 hergestellt. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe von $1 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-11}$ mol/L mit jeweils zwei Unterteilungen von Faktor 1 und 5 je Dekade erstellt. Nach dem Einbau des HPLC-Adapters in die Kassette ist zunächst eine Ausrichtung des Lasers erforderlich. Dazu wurde die Glaskapillare mit einer Coumarin 343-Lösung (10^{-7} mol/L) gefüllt. Anschließend wurde der Laserstrahl manuell auf die maximale Intensität der emittierten Fluoreszenz am Spektrometer justiert. Anschließend wurde das System zehn Minuten lang mit dem Laufmittel gespült. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt. Die Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 4.13: HPLC-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Trennung von Coumarin 343

Säule	Restek Ultra IBD <i>150 mm x 2,1 mm, 5 μm</i>
Wässrige mobile Phase	Ameisensäure (0,1 % in Wasser)
Organische mobile Phase	Methanol
Flussrate	500 μ L/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	20 μ L
Gradient	Isokratisch, 70 % Methanol
Trenndauer	4 min

Tabelle 4.14: LIF-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Trennung von Coumarin 343

TE-Kühlung des CCD-Chips	-15 °C
Integrationszeit	10 ms
Mittelung der Spektren	40
Glasfaser	600 μ m, SMA 905
Anregungsquelle	Diodenlaser <i>405 nm, 100 mW, 80 mA Betriebsstrom</i>
Asphärische Laserlinse	Antirefleksionsbeschichtung 400-600 nm
Emissionsfilter	<i>Cut-on</i> -Wellenlänge 435 nm
Integrationsgrenzen	470,07-537,32 nm
Gleitender Mittelwert	3

Tabelle 4.15: ESI-MS-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Trennung von Coumarin 343
(Die englischen Bezeichnungen der MS-Software wurden übernommen)

Scan Type	Single reaction monitoring
Polarity	Positive
Q1 Mass	286,1 amu
Q3 Mass	268,1 amu
Curtain Gas	30 psi
IonSpray Voltage	5000 V
Source Temperature	400 °C
Ion Source Gas 1	60 psi
Ion Source Gas 2	60 psi
Interface Heater	on
Collision Gas	High
Declustering Potential	30 V
Entrance Potential	4 V
Collision Cell Entrance Potential	20 V
Collision Cell Exit Potential	4 V

4.8.6 Leistungsfähigkeit des HPLC-LIF-Systems

Um die Nachweisstärke der HPLC-LIF-Systems zu erfassen und mit der des CE-LIF-System zu vergleichen wurde die flüssigchromatographische Trennung mit anschließender MS/MS-Detektion des Modellanalyten Coumarin 343 aus Abschnitt 4.8.5 durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass eine vergleichbare Nachweisstärke zum CE-LIF-System erzielt werden

kann. Chromatogramme der Probenkonzentrationen $1 \cdot 10^{-10}$, $5 \cdot 10^{-11}$ und $1 \cdot 10^{-11}$ mol/L sind in Abbildung 4.68 dargestellt.

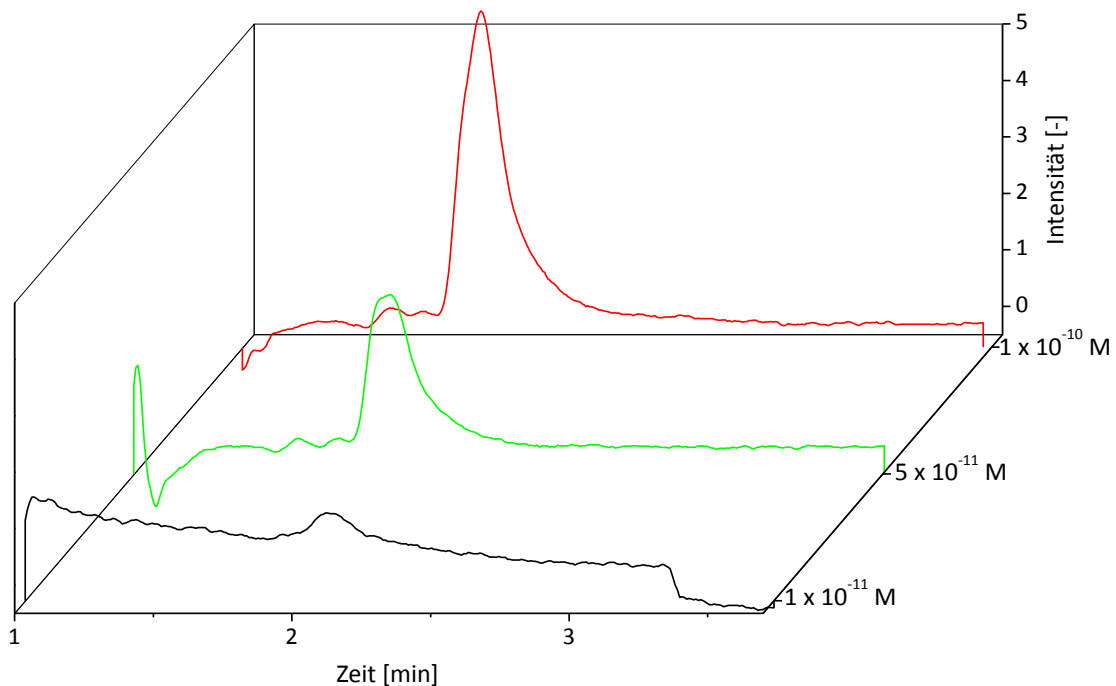


Abbildung 4.68: Mittels HPLC-LIF aufgenommene Chromatogramme von Coumarin 343-Lösungen unterschiedlicher Konzentration ($1 \cdot 10^{-10}$, $5 \cdot 10^{-11}$ und $1 \cdot 10^{-11}$ mol/L)

Wie in Abbildung 4.68 gezeigt weist Coumarin 343 eine Retentionszeit von etwa zwei Minuten auf. Um die Nachweisstärke besser beurteilen zu können, wurde die Nachweisgrenze aus den vorliegenden Messungen berechnet. Dazu wurde das Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. Als Rauschen wurde die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet. Die Signalhöhen, Standardabweichung und die errechneten S/N sind in Tabelle 4.16 zusammengefasst.

Tabelle 4.16: Signal/Rausch-Verhältnisse einer HPLC-LIF-Trennung von Coumarin 343

Konzentration [mol/L]	Signalhöhe [-]	2·SD [-]	S/N [-]
$1 \cdot 10^{-9}$	50,81	0,045	1119,7
$1 \cdot 10^{-10}$	5,42	0,047	116,1
$5 \cdot 10^{-11}$	2,67	0,048	55,5
$1 \cdot 10^{-11}$	0,49	0,047	10,3

Die berechneten Signal/Rausch-Verhältnisse in Tabelle 4.16 zeigen eine gute lineare Abhängigkeit von der Probenkonzentration. Der lineare dynamische Bereich wurde für das HPLC-LIF-System nicht separat bestimmt, da dieser hauptsächlich vom Detektionssystem abhängt und somit ebenfalls einen Bereich von sechs Dekaden abdecken sollte. Für Coumarin 343 kann eine Nachweisgrenze (NWG) von $3 \cdot 10^{-12}$ mol/L (S/N=3) und eine Bestimmungsgrenze von $1 \cdot 10^{-11}$ mol/L (S/N=10) angegeben werden. Somit liegt das Chromatogramm in Abbildung 4.68 an der Bestimmungsgrenze. Im Vergleich zum CE-LIF-System (NWG= $5 \cdot 10^{-12}$ mol/L) wird eine etwas niedrigere Nachweisgrenze erzielt. Dies liegt zum einen an größeren Innendurchmesser der Kapillare (CE: 75 μ m, HPLC: 350 μ m) und zum anderen an dem geringen Injektionsvolumen in der CE (CE: $\sim 0,1$ μ L, HPLC: 20 μ L). Dass trotz der großen Unterschiede bezüglich Injektionsvolumen und Kapillarinndurchmesser der Unterschied des S/N relativ gering ist, liegt an den durch das laminare Flussprofil der HPLC breiteren und somit kleineren Peaks.

Die eingesetzte HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode erlaubt nicht nur eine hohe Nachweisstärke für Fluorophore, sondern auch die schnelle Identifizierung

der Analyten. Neben der Identifizierungsmöglichkeit über das charakteristische Fluoreszenzspektrum der jeweiligen Fluorophore (vgl. 4.6.12), können die Analyten auch über ihre Massen charakterisiert werden. Das verwendete Massenspektrometer (MS), ein Triple Quadrupol, ermöglicht SRM-Experimente (*single reaction monitoring*). Im SRM-Modus wird im Quadrupol Q_1 eine Masse selektiert, anschließend im Q_2 fragmentiert und im Q_3 ein bestimmtes Fragmentation des Analyten detektiert. SRM ist dadurch eine sehr selektive und sensitive Methode. Die dabei zu beobachtenden Massenübergänge sind charakteristisch. Für Coumarin 343 kann bei den verwendeten Bedingungen die Abspaltung eines Wassermoleküls beobachtet werden.

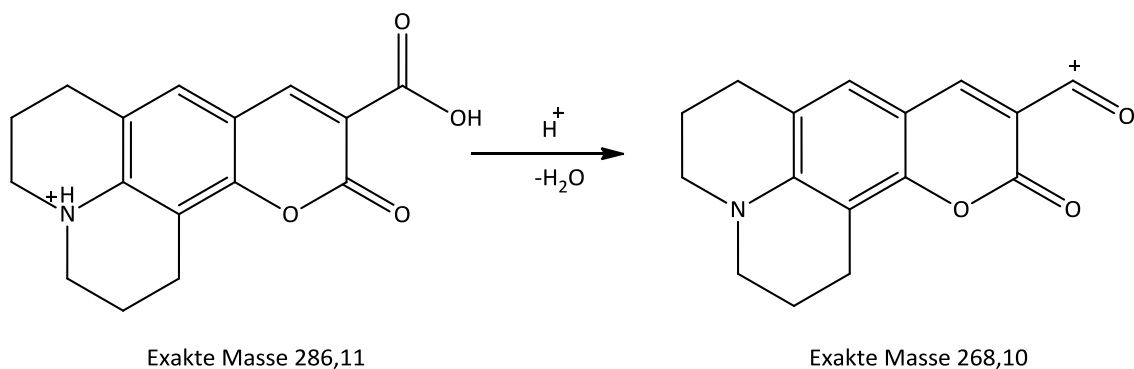


Abbildung 4.69: Fragmentierung von Coumarin 343 unter Wasserabspaltung

Der in Abbildung 4.69 gezeigte Massenübergang kann nun zur Signalzuordnung genutzt werden. Ein Chromatogramm dieses SRM-Übergangs einer Coumarin 343-Lösung (10^{-8} mol/L) ist in Abbildung 4.70 dargestellt.

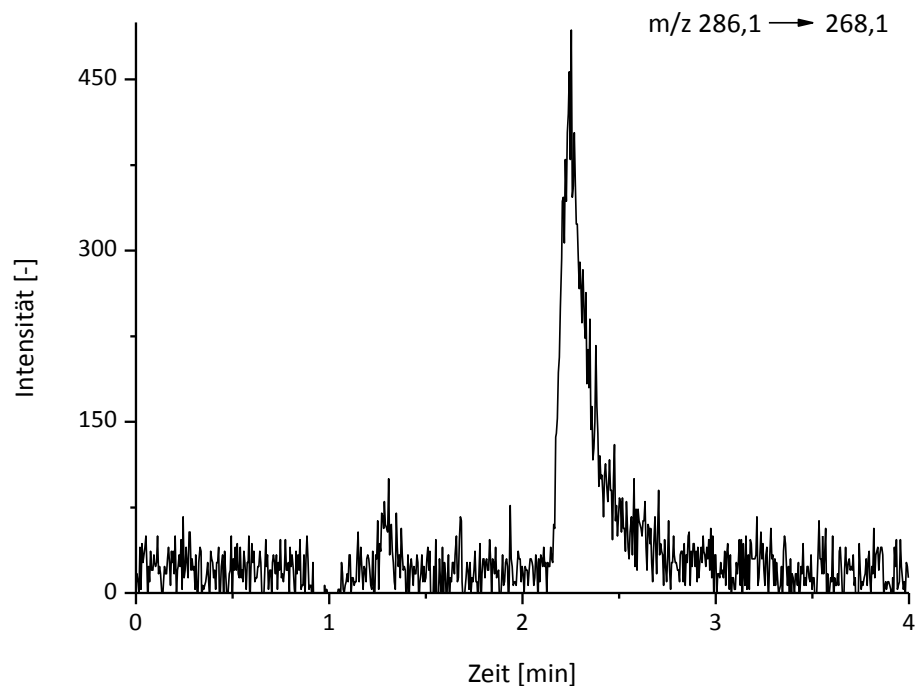


Abbildung 4.70: HPLC/ESI-MS/MS-Chromatogramm von Coumarin 343 (10^{-8} mol/L, SRM 286,1/268,1 m/z)

Die Retentionszeit von 2,3 min stimmt gut mit der mittels HPLC-LIF bestimmten überein; die leichte Verzögerung des Signals liegt an der Reihenanzordnung der Detektoren. So war das MS als destruktiver Detektor mit einer 50 cm langen Kapillare hinter dem LIF-Detektions-system installiert. Die gute Sensitivität und Selektivität dieser Methode kann an diesem Beispiel gut verdeutlicht werden. Für eine Coumarin 343-Lösung der Konzentration 10^{-8} mol/L kann unter Verwendung der doppelten Standardabweichung als Rauschen ein S/N von 14,7 angegeben werden. Es wird somit eine Nachweisgrenze von $2 \cdot 10^{-9}$ mol/L (S/N=3) erreicht.

Anhand dieser einfachen HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode konnte gut die Leistungsfähigkeit des Detektionssystems aufgezeigt werden. So kann eine Nachweisgrenze von $3 \cdot 10^{-12}$ mol/L für Coumarin 343 am HPLC-LIF-System angegeben werden, womit diese noch etwas niedriger liegt als die des CE-LIF-Systems, und für die Detektion mittels MS konnte eine Nachweisgrenze von $2 \cdot 10^{-9}$ mol/L erzielt werden. In Kombination mit dem SRM-Modus des Massenspektrometers ist eine eindeutige Identifizierung über die Fluoreszenzspektren oder die Fragmentierungsreaktion möglich.

4.8.7 Fazit und Ausblick

Mit der erfolgreichen Erweiterung des vierten Prototypen um ein modulares Adaptersystem konnte mit der fünften Modellversion ein breites Feld an Anwendungsmöglichkeiten erschlossen werden. Die modulare Bauweise erlaubt einen schnellen und einfachen Austausch des Adapters. So kann weiterhin das Detektionssystem in Kombination mit einer Kapillarelektrophorese als CE-LIF-System genutzt werden. Das System bietet eine sehr hohe Trenneffizienz, Sensitivität und Selektivität für Fluorophore. Unter Verwendung der Auswertemöglichkeiten der Specana-Software konnte für Coumarin 343 eine Nachweisgrenze von $5,3 \cdot 10^{-12}$ mol/L und ein linearer dynamischer Bereich von mehr als sechs Dekaden erreicht werden.

Ebenso kann das Detektionssystem als HPLC-LIF-System verwendet werden. Dafür konnte die Glaskapillare des HPLC-Adapters optimiert werden. So wurde das beste Ergebnis für Kapillaren mit einem

Innendurchmesser von 350 μm und zwei abgeschliffenen, flamppolierten Flächen erzielt. An der modifizierten optischen Bank zeigten diese optimierten Kapillaren das günstigste Streuverhalten und die höchste Nachweisstärke. Mit dem HPLC-Adapter ist sowohl eine Kopplung des LIF-Systems an ein HPLC- als auch an ein IC-Gerät möglich. Es können sowohl ionische Analyten mittels CE oder IC getrennt und mit hoher Nachweisstärke detektiert werden, als auch unpolare bzw. polare Moleküle mittels HPLC. Auch für das HPLC-LIF-System konnte eine sehr gute Nachweisgrenze für Coumarin 343 mit $3 \cdot 10^{-12}$ mol/L erzielt werden. Eine einfache HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode hat zudem die Identifizierungsmöglichkeiten aufgezeigt. So ist es möglich, Fluorophore über ihre charakteristischen Fluoreszenz- oder Fragmentspektren zu identifizieren. Allerdings können isobare Strukturen bei dieser Methode nur über die Fluoreszenzspektren identifiziert werden.

Zusammenfassend konnte die Miniaturisierung eines LIF-Systems zu einem kompakten Detektionssystem für die laserinduzierte, wellenlängenaufgelöste Fluoreszenzdetektion erfolgreich abgeschlossen werden. Es konnte eine sehr hohe Variabilität bezüglich der Einsatzmöglichkeiten (CE, HPLC, IC) als auch der Anregungswellenlänge (405 nm, 445 nm, 532 nm, 635 nm und 658 nm) erreicht werden. Dazu können sowohl die Lasereinheit als auch der Emissionsfilter einfach und schnell gewechselt werden.

Eine Evaluation des Potenzials ist als nächster Schritt notwendig. Dazu sollten diverse Applikationen für CE-LIF/MS und HPLC-LIF/ESI-MS

verglichen werden, um auf diese Weise Vorteile und mögliche Verbesserungsmöglichkeiten der Systeme zu ergründen. Mit diesen Anwendungen abseits von Modellanalyten sollten auch mögliche technische Ansatzpunkte zur Optimierung der Robustheit und der Nutzerfreundlichkeit gefunden werden.

Kapitel 5

Evaluation des entwickelten Detektionssystems

5.1 Untersuchung eines Rhodamingemisches mittels CE-LIF

5.1.1 Einleitung

Synthetische Farbstoffe wie Rhodamine rücken immer mehr in den Fokus von Gesundheitsbehörden. Obwohl ihr Einsatz weitestgehend verboten ist, werden sie noch immer in Nahrungsmitteln gefunden, da sie im Vergleich zu natürlichen Farbstoffen stabiler und preisgünstiger sind. So wurde unter anderem Rhodamin B in Gewürzen aus China und Vietnam gefunden [100]. Die Gefahr solcher Farbstoffe geht dabei von ihren Azofunktionen und ihrer aromatischen Struktur aus. Rhodamin B wurde von der European Food Safety Authority (EFSA) als potentiell kanzerogen und genotoxisch eingestuft [101]. Diese Gefährdung könnte ebenfalls von anderen Rhodaminen (123, 800, 6G, 110 und 19) mit ähnlicher auf Xanthen basierender Struktur ausgehen. Die Strukturformeln und die Anregungs- ($\lambda_{\text{ex, max}}$) bzw. Emissionsmaxima ($\lambda_{\text{em, max}}$) der untersuchten Rhodamine sind in Abbildung 5.1 dargestellt.

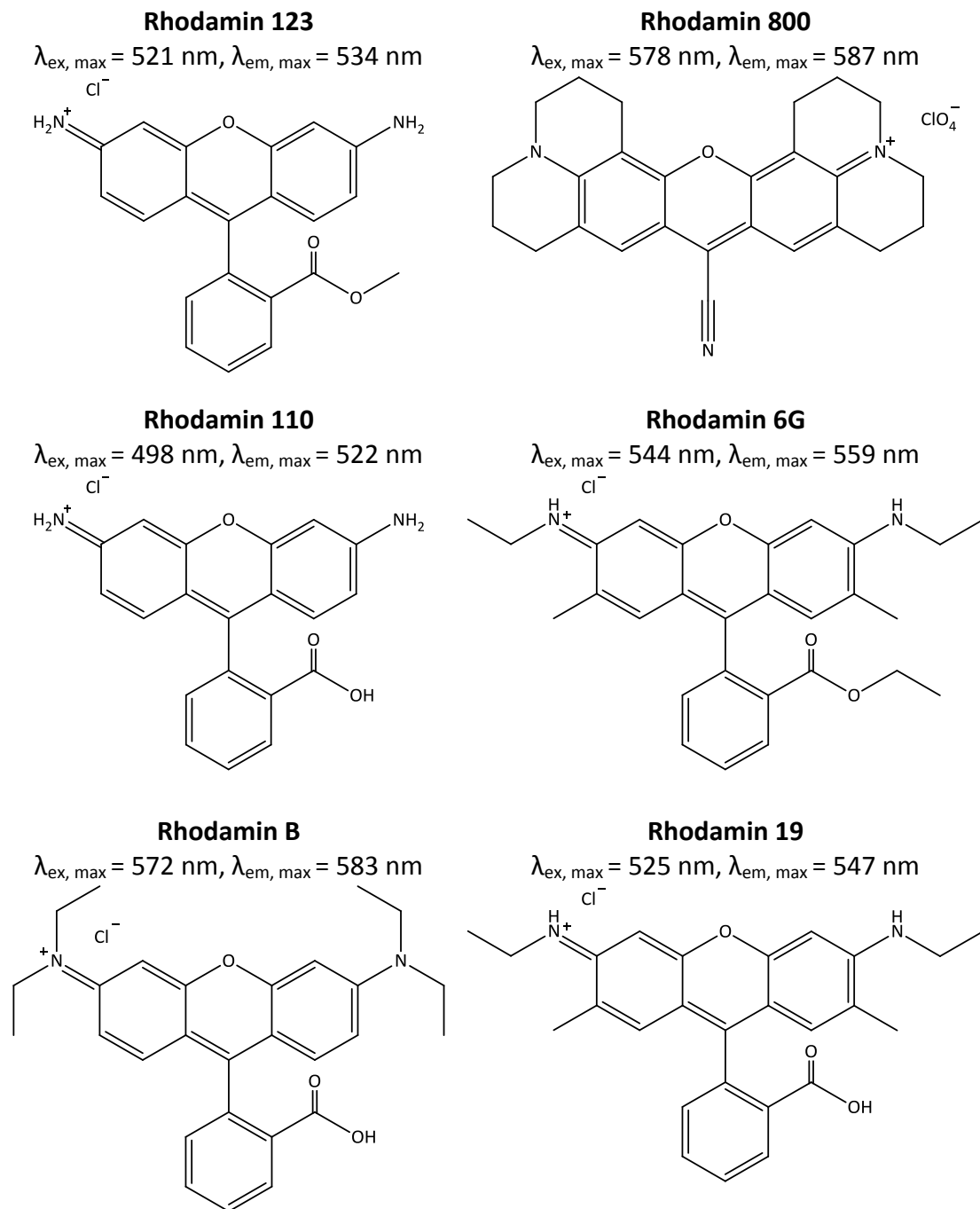


Abbildung 5.1: Strukturformeln und die Anregungs- ($\lambda_{\text{ex, max}}$) bzw. Emissionsmaxima ($\lambda_{\text{em, max}}$) der untersuchten Rhodamine (123, 800, 110, 6G, B und 19)

Rhodamine finden auch in Kugelschreibertinten Verwendung (6G und B), sowie als Farbstoffe für Textilien und Papier [102]. Zudem werden sie in Farbstofflasern als aktives Medium eingesetzt, da sie eine

Quantenausbeute von beinahe eins aufweisen. In der Biotechnologie finden sie Verwendung als Marker in der Fluoreszenzmikroskopie, in Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) und in der Durchflusszytometrie. Rhodamin 123 wird beispielsweise als Substrat für p-Glycoprotein *in vivo* verwendet, dabei kann die Transportaktivität des Glycoproteins untersucht werden [103]. Ebenso werden Rhodamine als Indikatoren angewendet, um die Flussgeschwindigkeit und -richtung von Gewässern zu bestimmen [104].

Aufgrund dieser breiten Verwendung und des unklaren Gefahrenpotentials ist es wichtig, eine schnelle, selektive und sensitive Methode zur Bestimmung und Identifizierung von Rhodaminen zu etablieren.

5.1.2 Probenvorbereitung

Für die kapillarelektrophoretische Trennung eines Rhodamingemisches wurden 10^{-4} mol/L wässrige Stammlösungen der untersuchten Rhodamine (123, 800, 110, 6G, B und 19) hergestellt. Aus diesen Lösungen wurde eine Mischung der Rhodamine mit einem Gesamtvolumen von 1,5 mL erstellt. Um das Ansprechverhalten der Analyten auszugleichen, wurden diese in unterschiedlichen Anteilen zugegeben. Die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Zusammensetzung des Rhodamingemisches für die CE-LIF-Analyse

Rhodamin	Konzentration im Gemisch [mol/L]
123	$1,0 \cdot 10^{-6}$
800	$3,3 \cdot 10^{-5}$
110	$1,0 \cdot 10^{-5}$
6G	$1,0 \cdot 10^{-6}$
B	$3,3 \cdot 10^{-6}$
19	$5,0 \cdot 10^{-5}$

Als Elektrolytlösung wurde 20 mmol/L Natriumchloracetat in Wasser mit einem pH-Wert von 3 genutzt. Die Herstellung des Puffers erfolgte durch Lösen von 10 mmol (1,2 g) Natriumchloracetat in 500 mL Wasser und Einstellen des pH-Wertes mit wässriger Ammoniaklösung (1 mol/L).

5.1.3 CE- und Spektrometereinstellungen

Nach dem Einbau des CE-Adapters in die Kassette ist zunächst eine Ausrichtung des Lasers erforderlich. Dazu wurde die Kapillare hydrodynamisch mit einer Coumarin 343-Lösung (10^{-7} mol/L) gefüllt. Anschließend wurde der Laserstrahl manuell auf die maximale Intensität der emittierten Fluoreszenz am Spektrometer justiert. Zur Konditionierung wurde die Kapillare zehn Minuten lang mit 1 mol/L Natronlauge gespült. Anschließend wurde die Kapillare 30 min mit dem Trennpuffer konditioniert. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt und nach jeder Analyse die Kapillare

eine Minute lang mit Natronlauge (1 mol/L) sowie für drei Minuten mit Pufferlösung gespült.

Die Injektionszeit der Probenlösung betrug 7,5 s bei einem Injektionsdruck von 50 mbar, dies entspricht 375 mbar·s. Die verwendete quadratische Kapillare hatte eine Länge von 65 cm (effektiv 50 cm) und einen inneren Durchmesser von 75 μm . Es wurde ein Strom von 160 μA mit einer resultierenden Spannung von etwa 17 kV angelegt. Als Elektrolytlösung wurde ein Chloracetatpuffer (20 mmol/L, pH=3, Herstellung s. Abschnitt 5.1.2) verwendet. Die Parameter des Detektionssystems sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Tabelle 5.2: LIF-Parameter der CE-LIF-Trennung eines Rhodamingemisches

TE-Kühlung des CCD-Chips	-15 °C
Integrationszeit	10 ms
Mittelung der Spektren	35
Glasfaser	600 μm , SMA 905
Anregungsquelle	Diodenlaser <i>405 nm, 100 mW, 80 mA Betriebsstrom</i>
Asphärische Laserlinse	Antireflektionsbeschichtung 400-600 nm
Emissionsfilter	<i>Cut-on</i> -Wellenlänge 435 nm
Detektionswellenlänge	583 nm
Bandbreite	15 Pixel

5.1.4 Geräte

Tabelle 5.3: Verwendete Geräte und deren Hersteller bzw. Vertrieb

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	TE214S	Sartorius, Göttingen
Diodentreiber	EU37	Roithner, Wien (A)
Hubkolbenpipette	Reference®	Eppendorf, Hamburg
Kapillare	WWP 075 375	Polymicro, Phoenix (USA)
Kapillarelektrophorese	G1600	Agilent, Waldbronn
Laserdiode	PHR-805T	Insaneware Deluxe, Gladbeck
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Dülmen
Spannungsquelle	6080	Peaktech, Ahrensburg
Spektrometer	QE65000	Ocean Optics, Ostfildern

5.1.5 Chemikalien

Tabelle 5.4: Verwendete Chemikalien mit Reinheit, CAS-Nummer und Hersteller

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nr.	Hersteller/Vertrieb
Ammoniak	25 %	1336-21-6	Merck, Darmstadt
Natriumchloracetat	≥98 %	9826-62-3	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	≥98 %	1310-73-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rhodamin 110	>99 %	13558-31-1	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Rhodamin 123	>99 %	62669-70-9	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rhodamin 19	>99 %	62669-66-3	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Rhodamin 6G	99 %	989-38-8	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rhodamin 800	>99 %	101027-54-7	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rhodamin B	>99 %	81-88-9	Fluka Chemie, Buchs (CH)

5.1.6 Kapillarelektrophoretische Trennung eines Rhodamingemisches

Da die Rhodamine des zu untersuchenden Gemisches (123, 800, 110, 6G, B und 19) als Kationen in wässriger Lösung vorliegen, eignen sie sich für eine kapillarelektrophoretische Trennung im sauren Bereich. Bei niedrigen pH-Werten ist der elektroosmotische Fluss (EOF) schwächer, sodass die elektrophoretische Migration kaum von ihm überlagert wird und auf diese Weise eine bessere Trenneffizienz erreicht wird. GÖTZ et al. [14] konnten bereits erfolgreich drei der untersuchten Rhodamine (123, 19 und 6G) kapillarelektrophoretisch mittels Mikrochip-CE trennen. Daher wurde die CE-LIF-Methode (Abschnitt 5.1.3) in Anlehnung an diese entwickelt. In Abbildung 5.2 ist ein Elektropherogramm der Trennung des Rhodamingemisches dargestellt.

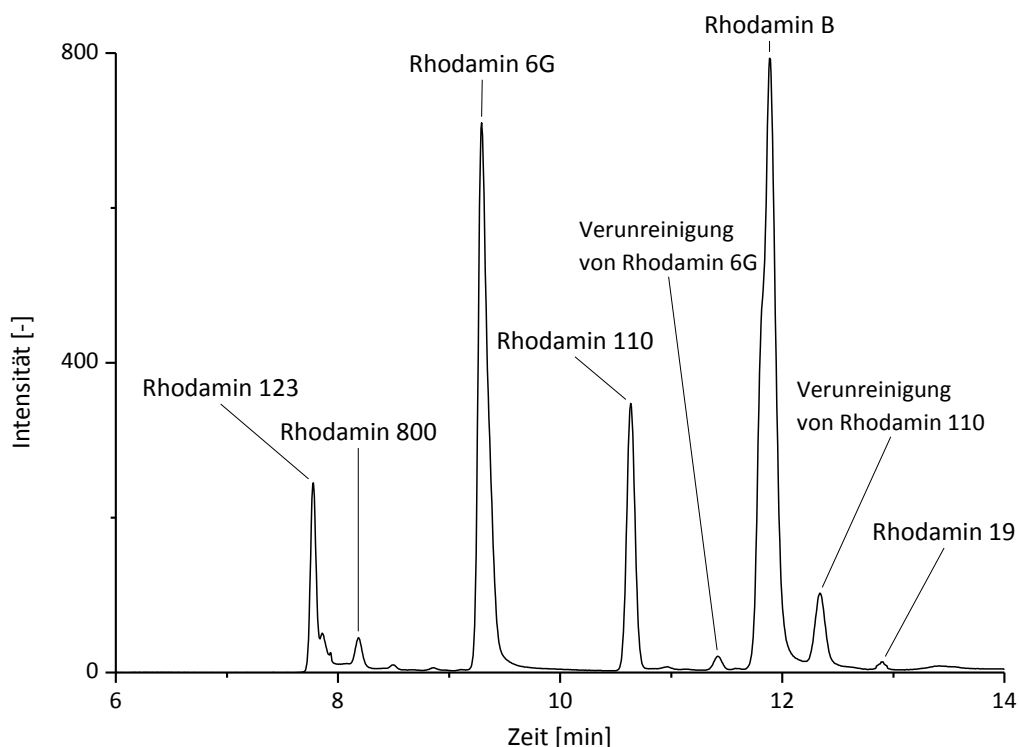


Abbildung 5.2: Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse eines Rhodamingemisches (123, 800, 110, 6G, B und 19) mit Konzentrationen von $1,0 \cdot 10^{-6}$ bis $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/L

Wie in Abbildung 5.2 gezeigt konnte erfolgreich das Rhodamingemisch innerhalb von 13 min getrennt werden. Dabei weist Rhodamin 123 die kürzeste Migrationszeit auf (7,8 min). Eine Basislinientrennung vom Rhodamin 800, welches bei 8,2 min migriert, konnte nicht erreicht werden. Die beiden größten Signale werden für Rhodamin 6G (9,3 min) und Rhodamin B (11,9 min) erhalten. Zwischen diesen beiden tritt Rhodamin 110 mit einer Migrationszeit von 10,6 min auf. Als letztes der untersuchten Rhodamine kann das Rhodamin 19 (12,9 min) detektiert werden. Zusätzlich zu den untersuchten Rhodaminen sind zwei Verunreinigungen zu erkennen, welche nicht abgetrennte Nebenprodukte der Synthese der Rhodamine darstellen. Die Verunreinigung mit einer Migrationszeit von 11,4 min konnte dem Rhodamin 6G zugeordnet werden und diejenige bei 12,3 min stammt vom Rhodamin 110.

Nach der erfolgreich entwickelten Trennung des Rhodamingemisches aus Rhodamin 123, 800, 110, 6G, B und 19 ist eine sichere Identifizierung der einzelnen Analyten zu gewährleisten. Diese wird üblicherweise durch Ermittlung der Migrationszeiten der Analyten durch Einzelmessungen oder durch Konzentrationserhöhung einzelner Analyten in einer bekannten Mischung sichergestellt. Mit beiden Methoden müssen jedoch für eine sichere Identifizierung der Analytenanzahl entsprechend viele zusätzliche Messungen durchgeführt werden, in diesem Fall sechs.

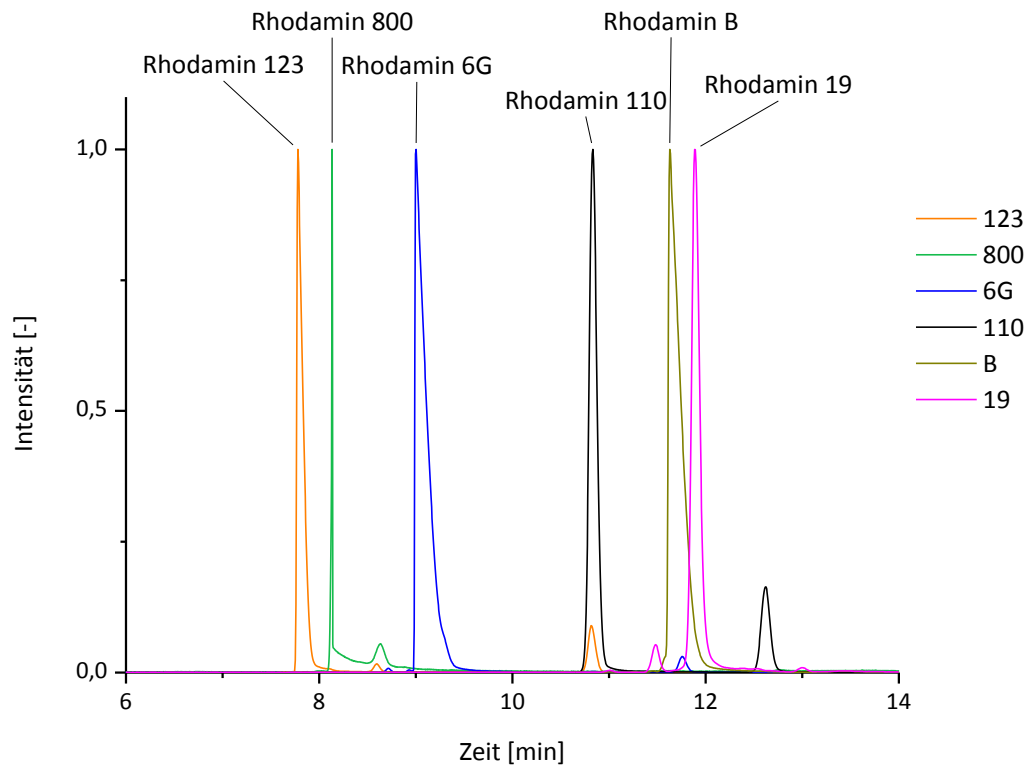


Abbildung 5.3: Normierte Elektropherogramme der Rhodamine 123, 800, 110, 6G, B und 19 mit der Konzentration 10^{-4} mol/L

In Abbildung 5.3 sind Einzelmessungen der sechs Rhodamine (10^{-4} mol/L) zusammengefasst. Es können weitere Verunreinigungen bzw. Nebenprodukte der Rhodamine 123 und 19 beobachtet werden. Das Nebenprodukt von Rhodamin 123 komigriert mit Rhodamin 110, jenes von Rhodamin 19 weist eine Migrationszeit von 11,5 min auf. Auf diese Weise können die Analyten eindeutig identifiziert werden. Die wellenlängenaufgelöste Fluoreszenzdetektion bietet jedoch eine weitere Möglichkeit der Identifizierung von Fluorophoren über ihre charakteristischen Fluoreszenzspektren. Die bei diesen Messungen aufgenommenen Spektren (jeweils etwa 2400) können mit der Software Specana eingelesen und in einem Datensatz zusammengefasst werden.

Dieser Datensatz kann in eine Matrix umgewandelt und als dreidimensionales Elektropherogramm dargestellt werden.

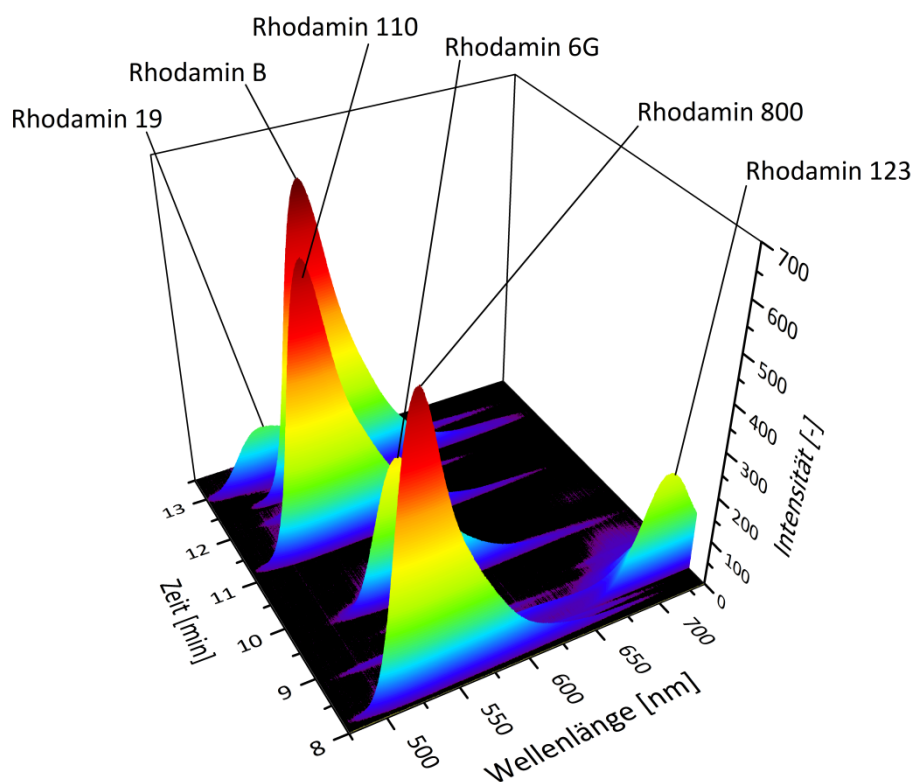


Abbildung 5.4: Dreidimensionales Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse eines Rhodamingemisches (123, 800, 110, 6G, B und 19) mit Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L

In Abbildung 5.4 ist ein dreidimensionales Elektropherogramm der analysierten Rhodamine (123, 800, 110, 6G, B und 19) dargestellt. In dieser Darstellungsform sind die gesamten Informationen der wellenlängenaufgelösten Detektion zusammengefasst, so sind Zeit sowie Wellenlänge als Basis und die Intensität als z-Achse dargestellt. Durch die Auftragung der Wellenlänge als zusätzliche Ordinate sind die Spektren der Peaks direkt zu sehen, sodass eine einfache Unterscheidung und Identifizierung ermöglicht wird. Das dreidimensionale Elektropherogramm

kann gedreht werden, um ein klassisches zweidimensionales Elektropherogramm zu erhalten oder als Konturplot per Draufsicht dargestellt werden. Der Konturplot verbessert die Übersichtlichkeit, da neben der Zeit die Wellenlängenverteilung zu sehen ist und über die Farbskala die Intensitäten des jeweiligen Signals angezeigt werden (Abbildung 5.5).

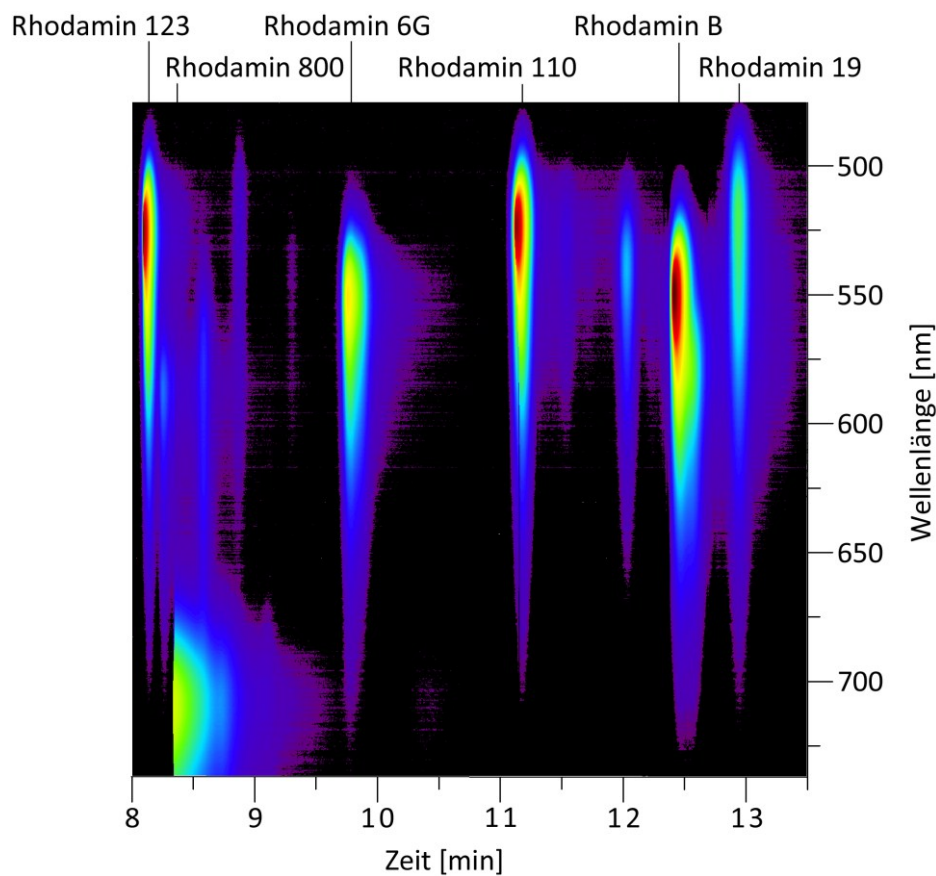


Abbildung 5.5: Konturplot der CE-LIF-Analyse eines Rhodamingemisches (123, 800, 110, 6G, B und 19) mit Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L

Mit Hilfe des Konturplots in Abbildung 5.5 bzw. des dreidimensionalen Elektropherogramms in Abbildung 5.4 und bekannten Fluoreszenzspektren der Analyten ist eine sichere und einfache Unterscheidung bzw. Identifizierung der Analyten möglich. Somit kann eine einfache und schnelle Zuordnung der Analyten ohne einen Mehraufwand durch

Einzelmessungen der Analyten und Vergleich der Migrationszeiten erfolgen.

5.1.7 Fazit und Ausblick der Untersuchung eines Rhodamingemisches

Es konnte erfolgreich eine Trennung von sechs verschiedenen Rhodaminen (123, 800, 110, 6G, B und 19) innerhalb von 13 min erreicht und so die Leistungsfähigkeit des CE-LIF-Systems aufgezeigt werden. Mit der hohen Trenneffizienz der Kapillarelektrophorese konnten zusätzlich zwei Verunreinigungen von den Analyten getrennt werden. Ebenso wurden die Vorteile einer wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzdetektion verdeutlicht. Die Software Specana ermöglicht es die zahlreichen aufgenommenen Spektren einer Messung einzulesen und in eine Matrix zu konvertieren. Aus dieser Matrix kann ein dreidimensionales Elektropherogramm, ein Konturplot oder ein klassisches zweidimensionales Elektropherogramm erstellt werden. Die Verfügbarkeit der Fluoreszenzspektren jedes Signals in der dreidimensionalen Darstellung erleichtert die Identifizierung der Analyten. So sind keine Einzelmessungen jedes Analyten notwendig, da diese mit bekannten Fluoreszenzspektren identifiziert bzw. fluoreszierende Gruppen eingegrenzt werden können.

Eine Optimierung dieser Methode soll bei der Detektion erfolgen, sodass die Nachweisgrenze für diese Analyten verbessert werden kann. Es konnten Nachweisgrenzen von 10^{-8} mol/L für Rhodamin 19 bis 10^{-9} mol/L für Rhodamin 123 mit der verwendeten Konfiguration erreicht werden

[105]. Diese Nachweisgrenzen können durch Änderung der Anregungswellenlänge gesenkt werden. Die Anregungsmaxima der Rhodamine liegen zwischen 498 und 578 nm und unterscheiden sich somit deutlich. Es muss also ein Kompromiss gefunden werden, damit alle Analyten bestmöglich angeregt werden können. Die Verwendung der blauen 445 nm Laserdiode mit einer optischen Ausgangsleistung von 1 W könnte beispielsweise die Nachweisgrenze für alle Rhodamine deutlich senken. Wobei durch die hohe Anregungsenergie vermutlich eine Sättigung erreicht werden und ein höheres Rauschen vorliegen würde, dennoch sollte die Empfindlichkeit durch die längerwellige Anregung und die höhere Energie verbessert werden können.

5.2 Trennung eines Farbstoffgemisches mittels HPLC-LIF/ESI-MS/MS

5.2.1 Einleitung

Die Leistungsfähigkeit des CE-LIF-Systems konnte unter anderem schon in Kapitel 5.1 aufgezeigt werden. Um einen besseren Eindruck der Leistungsfähigkeit der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Kopplung zu erhalten, wurde eine flüssigchromatographische Trennung eines Farbstoffgemisches entwickelt. Dazu zählen Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben (Nitrostilben). Die Strukturformeln, exakten Massen und die Anregungs- ($\lambda_{\text{ex, max}}$) sowie Emissionsmaxima ($\lambda_{\text{em, max}}$) sind in Abbildung 5.6 dargestellt.

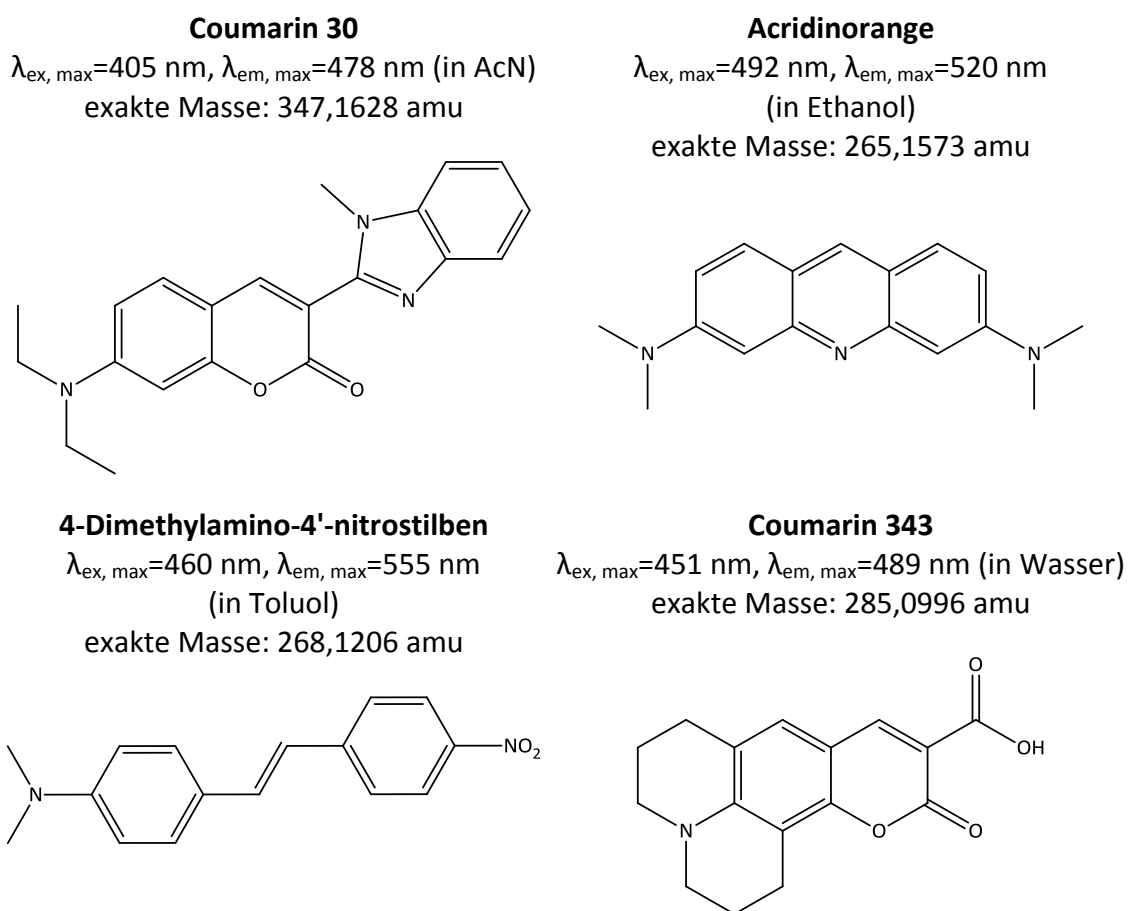


Abbildung 5.6: Strukturformeln, exakte Massen und die Anregungs- ($\lambda_{\text{ex, max}}$) sowie Emissionsmaxima ($\lambda_{\text{em, max}}$) des untersuchten Farbstoffgemisches aus Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben

Da die vier Farbstoffe strukturell sehr unterschiedlich sind und somit verschiedene Emissionsmaxima zwischen 478 und 555 nm aufweisen, eignen sie sich sehr gut für eine modellhafte flüssigchromatographische Trennung, um die Stärken des HPLC-LIF-Detektionssystems hervorzuheben.

5.2.2 Probenvorbereitung

Für die flüssigchromatographische Trennung eines Farbstoffgemisches wurden 10^{-4} mol/L Stammlösungen in Toluol der Farbstoffe Coumarin 30, Acridinorange und Coumarin 343, sowie eine 10^{-3} mol/L Stammlösung in Toluol von 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben hergestellt. Aus diesen Lösungen wurden zwei Mischungen der Farbstoffe mit einem Gesamtvolumen von 1,5 mL für die HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Analyse erstellt. Um das Ansprechverhalten der Analyten auszugleichen und eine gleichmäßige Intensitätsverteilung zu gewährleisten, wurden diese in unterschiedlichen Anteilen zugegeben. Die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 5.5 bzw. in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

Tabelle 5.5: Zusammensetzung des Farbstoffgemisches für die HPLC-LIF-Analyse

Farbstoff	Konzentration im Gemisch [mol/L]
Coumarin 30	$5,0 \cdot 10^{-7}$
Acridinorange	$6,6 \cdot 10^{-7}$
Coumarin 343	$1,3 \cdot 10^{-7}$
4-Dimethylamino-4'-nitrostilben	$2,3 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 5.6: Zusammensetzung des Farbstoffgemisches für die Analyse mittels HPLC-LIF/ESI-MS/MS

Farbstoff	Konzentration im Gemisch [mol/L]
Coumarin 30	$5,0 \cdot 10^{-7}$
Acridinorange	$6,6 \cdot 10^{-7}$
Coumarin 343	$4,3 \cdot 10^{-6}$
4-Dimethylamino-4'-nitrostilben	$1,2 \cdot 10^{-4}$

5.2.3 Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode

Nach dem Einbau des HPLC-Adapters in die Kassette ist zunächst eine Ausrichtung des Lasers erforderlich. Dazu wurde die Glaskapillare mit einer Coumarin 343-Lösung (10^{-7} mol/L) gefüllt. Anschließend wurde der Laserstrahl manuell auf die maximale Intensität der emittierten Fluoreszenz am Spektrometer justiert. Das System wurde danach zehn Minuten lang mit der mobilen Phase gespült. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt. Die Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode sind im Folgenden aufgeführt. Die englischen Bezeichnungen der jeweiligen Software wurden übernommen.

Tabelle 5.7: HPLC-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Trennung eines Farbstoffgemisches

Säule	Bischoff ProntoSIL C18 ace-EPS 50 mm x 4,6 mm, 3 μ m
Wässrige mobile Phase	Ameisensäure (1 % in Wasser)
Organische mobile Phase	Methanol (MeOH)
Flussrate	500 μ L/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 μ L

Tabelle 5.8: Gradient der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Trennung eines Farbstoffgemisches

Zeit [min]	0	6	10	11	13
MeOH [%]	40	95	95	40	40

Tabelle 5.9: LIF-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Trennung eines Farbstoffgemisches

TE-Kühlung des CCD-Chips	-15 °C
Integrationszeit	10 ms
Mittelung der Spektren	35
Glasfaser	600 µm, SMA 905
Anregungsquelle	Diodenlaser 405 nm, 100 mW, 80 mA Betriebsstrom
Asphärische Laserlinse	Antireflektionsbeschichtung 400-600 nm
Emissionsfilter	Cut-on-Wellenlänge 435 nm
Gleitender Mittelwert	3

Tabelle 5.10: Integrationsgrenzen der Analytemissionsspektren zur Erstellung der Chromatogramme

Farbstoff	Integrationsgrenzen [nm]
Coumarin 30	484,01-552,13
Acridinorange	504,05-576,30
Coumarin 343	470,07-537,32
4-Dimethylamino-4'-nitrostilben	540,36-737,16

Tabelle 5.11: ESI-MS-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Trennung für alle Farbstoffe

Scan Type	Multiple reaction monitoring (MRM)
Polarity	Positive
Curtain Gas	30 psi
IonSpray Voltage	5000 V
Source Temperature	400 °C
Ion Source Gas 1	60 psi
Ion Source Gas 2	60 psi
Interface Heater	on

Tabelle 5.12: Farbstoffspezifische ESI-MS-Parameter der MRM-Übergänge

MS-Parameter	Coumarin 30	Acridinorange	Coumarin 343	Nitrostilben
Q1 Mass [amu]	348,1	266,1	286,1	269,0
Q3 Mass [amu]	304,0	250,1	268,1	254,0
Collision Gas	High	High	High	High
Declustering Potential [V]	60	60	30	30
Entrance Potential [V]	8	12	4	10
Collision Cell Entrance Potential [V]	50	40	20	30
Collision Cell Exit Potential [V]	4	6	4	4

5.2.4 Chemikalien

Tabelle 5.13: Verwendete Chemikalien mit Reinheit, CAS-Nummer und Hersteller

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nr.	Hersteller/Vertrieb
Acridinorange	99 %	65-61-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ameisensäure	p.a.	64-18-6	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Coumarin 30	99%	41044-12-6	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coumarin 343	97 %	55804-65-4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	≥99,9 %	67-56-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrostilben	≥99,8 %	2844-15-7	Sigma-Aldrich, Steinheim
Toluol	99,8 %	108-88-3	Sigma-Aldrich, Steinheim

5.2.5 Geräte

Tabelle 5.14: Verwendete Geräte und deren Hersteller bzw. Vertrieb

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	TE214S	Sartorius, Göttingen
Autosampler	SIL-HT	Shimadzu, Duisburg
Diodentreiber	EU37	Roithner, Wien (A)
Entgaser	DGU-14A	Shimadzu, Duisburg
Hubkolbenpipette	Reference®	Eppendorf, Hamburg
Laserdiode	PHR-805T	Insaneware Deluxe, Gladbeck
LC-Pumpen	LC-10AD	Shimadzu, Duisburg
Quadrupol-MS	QTrap 2000	Applied Biosystems, Darmstadt
Säulenofen	CTO-10A	Shimadzu, Duisburg
Spannungsquelle	6080	Peaktech, Ahrensburg
Spektrometer	QE65000	Ocean Optics, Ostfildern
Spritzenpumpe	Model 74900	Cole Parmer, Vernon Hills (USA)

5.2.6 Flüssigchromatographische Trennung eines Farbstoffgemisches

Die zu untersuchenden Farbstoffe (Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben) sind durch das für Fluorophore übliche, starre und flache π -System recht ähnlich, weisen jedoch verschiedene Heteroatome auf. Diese Heteroatome bzw. -gruppen führen zu unterschiedlichen Polaritäten der Moleküle. Daher wurde eine *polar embedded* C18-Phase zur Trennung des Gemisches verwendet. Diese Phasen weisen im Gegensatz zu klassischen *reversed phase*-Säulenmaterialien neben der Alkylkette zusätzliche polare Funktionen auf

und sind somit gut für die Trennung von polaren Analyten geeignet. In Abbildung 5.7 ist ein Chromatogramm des LIF-Farbstoffgemisches, welches mittels Fluoreszenzdetektion aufgenommen wurde, dargestellt.

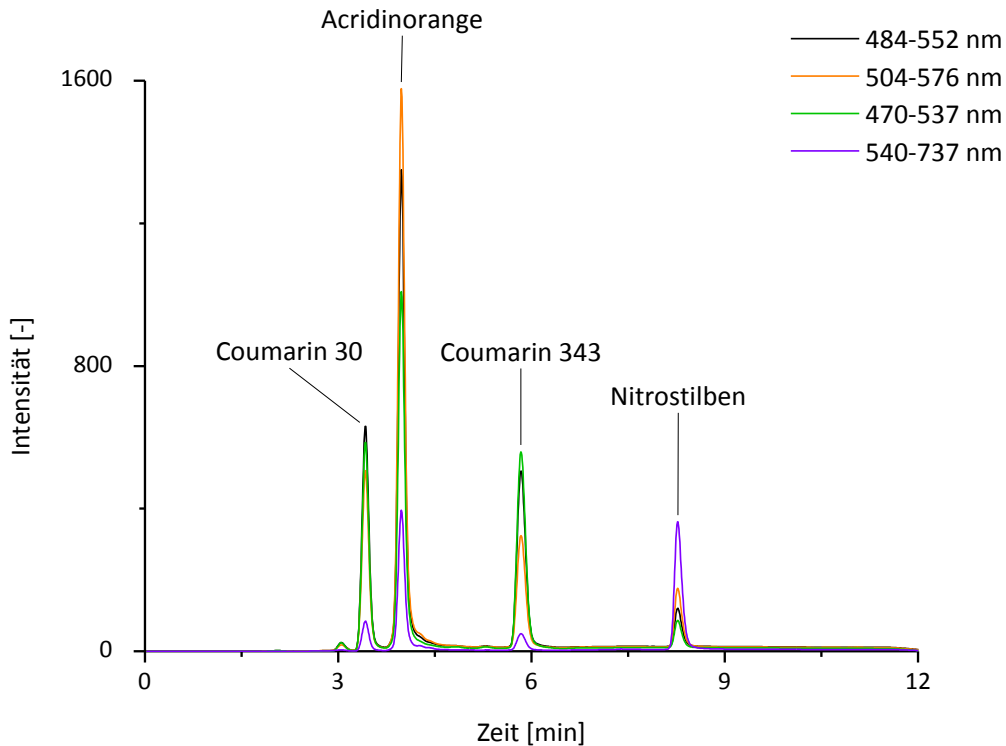


Abbildung 5.7: Chromatogramm der HPLC-LIF-Analyse eines Farbstoffgemisches (Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben) mit Konzentrationen von $2,3 \cdot 10^{-4}$ bis $1,3 \cdot 10^{-7}$ mol/L

Wie in Abbildung 5.7 gezeigt konnte das Farbstoffgemisch erfolgreich innerhalb von 9 min getrennt werden. Dabei eluiert Coumarin 30 bei 3,4 min als erstes und Acridinorange bei 4,0 min als zweites. Coumarin 343 hat eine Retentionszeit von 5,8 min und 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben eine von 8,3 min.

Mit den Chromatogrammen in Abbildung 5.7 kann die Nachweisgrenze für die jeweiligen Farbstoffe abgeschätzt werden, dazu wurde als Rauschen

die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet. Da die Standardabweichung der Schwankung um einen Mittelwert nach oben und unten entspricht, wird auf diese Weise ein objektiver Wert für das Rauschen erhalten. Die niedrigsten Nachweisgrenzen können für Coumarin 343 mit $2,2 \cdot 10^{-11}$ mol/L und für Acridinorange mit $3,9 \cdot 10^{-11}$ mol/L für diese Methode angegeben werden. Für Coumarin 30 wurde eine Nachweisgrenze von etwa $6,3 \cdot 10^{-11}$ mol/L und $6,2 \cdot 10^{-8}$ mol/L für das Nitrostilben berechnet.

Die Identifizierung der Analyten kann mit den unterschiedlichen Integrationsbereichen und den entsprechend verschiedenen Signalintensitäten erfolgen. So können Acridinorange und das Nitrostilben sicher zugeordnet werden. Die Emissionsmaxima der beiden Coumarine liegen für eine zweifelsfreie Zuordnung jedoch zu nahe beieinander. Mit der verwendeten HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode mit wellenlängen-aufgelöster Fluoreszenzdetektion kann eine eindeutige Identifizierung über die charakteristischen Fluoreszenzspektren erfolgen, welche zudem mit den MRM-Chromatogrammen verifiziert werden kann. In Abbildung 5.8 ist ein dreidimensionales Chromatogramm der Fluoreszenzdetektion dargestellt.

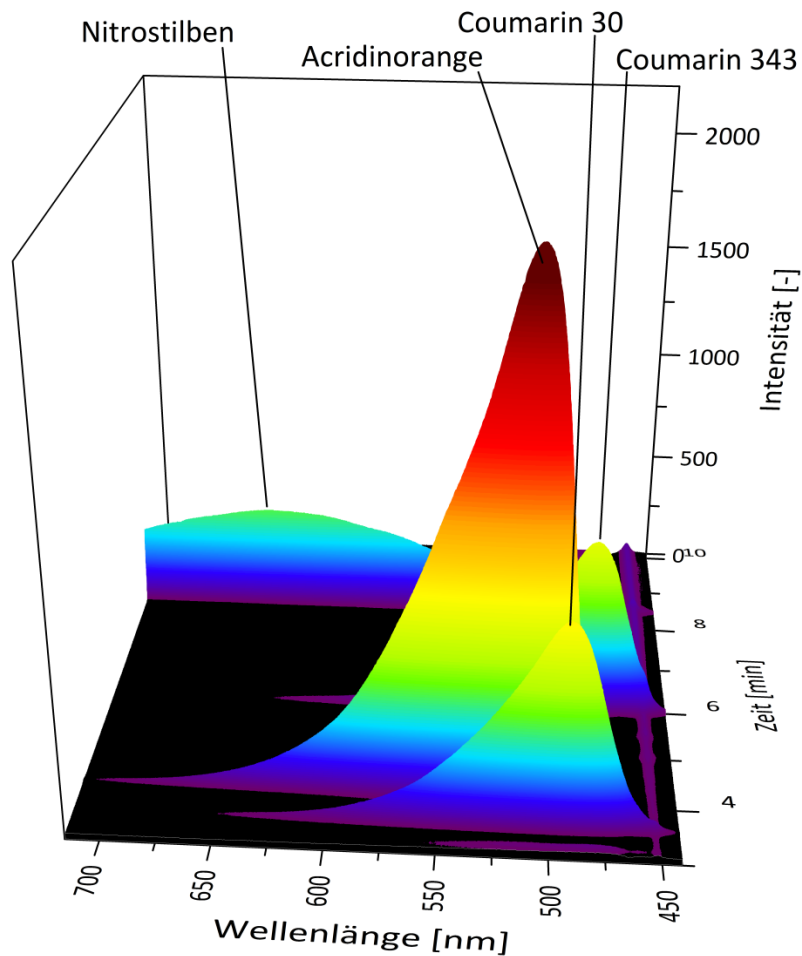


Abbildung 5.8: Dreidimensionales Chromatogramm der HPLC-LIF-Analyse eines Farbstoffgemisches (Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und Nitrostilben) mit Konzentrationen von $2,3 \cdot 10^{-4}$ bis $1,3 \cdot 10^{-7}$ mol/L

Mittels des dreidimensionalen Chromatogramms in Abbildung 5.8 können die beiden Coumarine unterschieden werden. Das erste Signal mit einem Emissionsmaximum von etwa 500 nm entspricht dem Coumarin 30 und das Signal mit einem Maximum von etwa 475 nm dem Coumarin 343. Das Fluoreszenzspektrum von Acridinorange passt ebenfalls gut mit dem in Ethanol bestimmten überein, wohingegen das Emissionsmaximum des Nitrostilbens etwa 100 nm in den roten Spektralbereich im Vergleich zum in Toluol aufgenommenen verschoben ist. Diese Verschiebung lässt sich

mit der unterschiedlichen Polarität des Toluols und des Laufmittels der flüssigchromatographischen Trennung (Methanol und 1 %-ige Ameisensäure in Wasser) erklären, da das Fluoreszenzspektrum bei einigen Molekülen stark vom Lösungsmittel bzw. der Polarität dessen abhängt. Um die anhand der Fluoreszenzspektren durchgeführte Identifizierung zu verifizieren, können die MRM-Chromatogramme herangezogen werden (Abbildung 5.9).

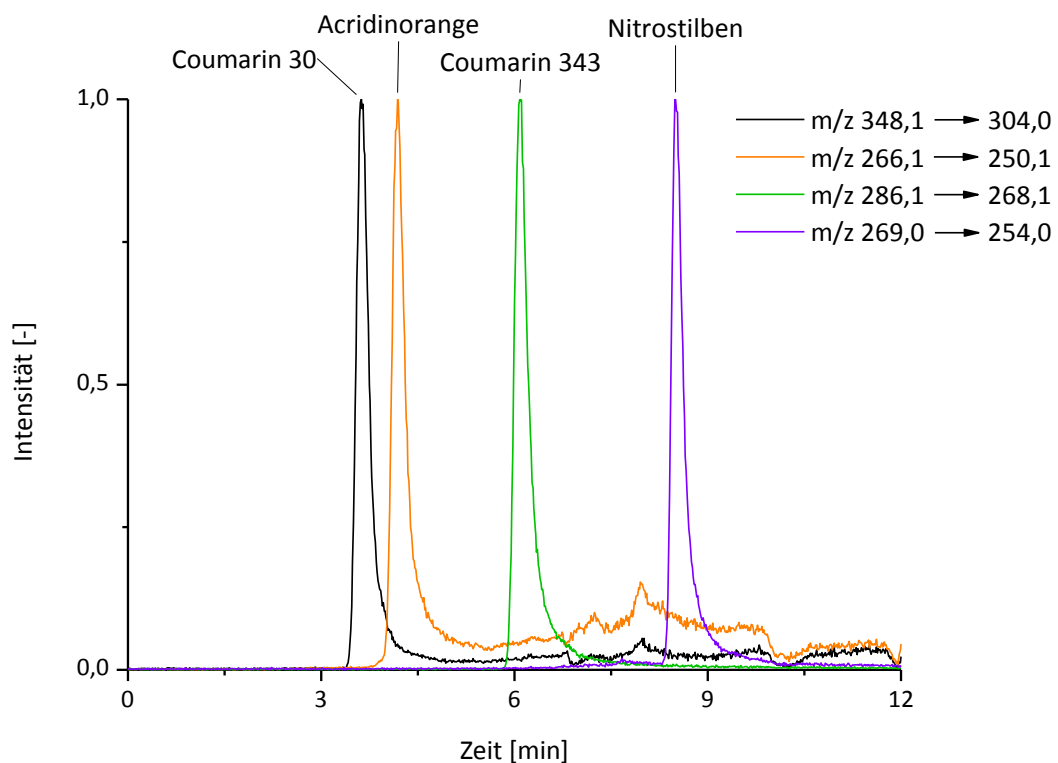


Abbildung 5.9: Normierte Chromatogramme der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse der Farbstoffe Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und Nitrostilben mit Konzentrationen von $1,2 \cdot 10^{-4}$ bis $5,0 \cdot 10^{-7}$ mol/L

Aufgrund der instrumentellen Anordnung sind die Retentionszeiten der Analyten der MRM-Chromatogramme im Vergleich zur Fluoreszenzdetektion in Abbildung 5.7 länger. Der Transfer vom LIF-Detektor zum Massenspektrometer führt zudem zu einer Verbreiterung der Peaks.

Dennoch können die Analyten eindeutig identifiziert und die Retentionsreihenfolge bestätigt werden. Mit den Chromatogrammen in Abbildung 5.9 kann die Nachweisgrenze für die jeweiligen Farbstoffe abgeschätzt werden. Dazu wurde als Rauschen die doppelte Standardabweichung der Basislinie in dem Bereich vor den Peaks berechnet. Die niedrigsten Nachweisgrenzen können für das Coumarin 30 und für Acridinorange mit jeweils $1,5 \cdot 10^{-9}$ mol/L für diese Methode angegeben werden. Für Coumarin 343 wurde eine Nachweisgrenze von $9,0 \cdot 10^{-9}$ mol/L und für Nitrostilben von $4,3 \cdot 10^{-7}$ mol/L berechnet.

5.2.7 Fazit und Ausblick der Trennung eines Farbstoffgemisches

Es konnte erfolgreich eine Trennung der vier untersuchten Farbstoffe (Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben) innerhalb von 9 min erreicht und so die Leistungsfähigkeit des HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Systems sowie die Stärken der wellenlängen-aufgelösten Fluoreszenzdetektion aufgezeigt werden. Analyten können mittels dreidimensionaler Chromatogramme, welche mit Specana generiert werden, identifiziert werden. Die frei wählbaren Integrationsbereiche für die einzelnen Analyten tragen zur guten Sensitivität des Systems bei. Es konnten Nachweisgrenzen für die Fluoreszenzdetektion zwischen $2,2 \cdot 10^{-11}$ mol/L (Coumarin 343) und für Nitrostilben $6,2 \cdot 10^{-8}$ mol/L erzielt werden. Mit der massenspektrometrischen Detektion wurden Faktor 416 (Coumarin 343, $9,0 \cdot 10^{-9}$ mol/L) bis Faktor 7 (Nitrostilben, $4,3 \cdot 10^{-7}$ mol/L) höhere Nachweisgrenzen erreicht. Je besser die Wellenlänge des Lasers und das

Anregungsmaximum des Analyten übereinstimmen, desto empfindlicher ist die LIF-Detektion im Vergleich zur MS-Detektion. Ein Vorteil der massenspektrometrischen Detektion ist die Möglichkeit der sicheren Zuordnung der Analytsignale. Es ist also mit diesem System möglich, eine eindeutige Signalzuordnung (ESI-MS/MS) mit einer sehr sensitiven Detektionsmethode (LIF) zu kombinieren.

Für eine Optimierung der Methode sollte das *Tailing* der Signale sowie der damit verbundene Anstieg der Basislinie, was durch eine Ablagerung der Analyten im *ESI-Interface* oder durch den Gradienten der mobilen Phase verursacht sein kann, verbessert werden. Des Weiteren kann die Nachweisstärke für Nitrostilben und Acridinorange durch eine Änderung der Anregungswellenlänge gesenkt werden. Der Austausch der 405 nm-Diode (100 mW) gegen die blaue 445 nm-Laserdiode mit einer optischen Ausgangsleistung von 1 W würde die Nachweisstärke deutlich verbessern. Allerdings müsste bei Verwendung der vollen Leistung die Kühlung der Diode angepasst werden. Wobei durch die hohe Anregungsenergie vermutlich eine Sättigung erreicht werden und ein höheres Rauschen vorliegen würde, dennoch sollte die Empfindlichkeit durch die längerwellige Anregung und die höhere Energie verbessert werden können.

5.3 Analyse von Aminosäuren sowie β -Lactoglobulin A mittels CE und HPLC nach Derivatisierung mit NBD-Cl

5.3.1 Einleitung

Proteine sowie Peptide werden mittels Proteinbiosynthese aus Aminosäuren aufgebaut. Im Organismus erfüllen Proteine verschiedene Aufgaben, wie den Sauerstofftransport im Blut oder die Immunabwehr [106]. Aufgrund dieser Funktionen ist die Zufuhr von essentiellen Aminosäuren über die Nahrung sehr wichtig. Um den Gehalt an Aminosäuren in Lebensmitteln zu bestimmen, wird eine Analyse der Proteinzusammensetzung der Lebensmittel bzw. der Aminosäurezusammensetzung der Proteine durchgeführt. Für die Entwicklung einer möglichst empfindlichen Methode wurde eine Mischung aus verschiedenen Aminosäuren untersucht. Zudem wurde das Molkenprotein β -Lactoglobulin A als Modellprotein untersucht, weil es sich mit 162 Aminosäuren und einer Masse von 18,4 kDa um ein kleines Protein mit einer einfachen Struktur handelt [97]. Es kommt hauptsächlich bei Wiederkäuern, aber auch bei anderen Säugetieren vor, nicht jedoch beim Menschen. Für die Aminosäuremischung wurden L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin ausgewählt. Die Strukturformeln und exakten Massen der untersuchten Aminosäuren sind in Abbildung 5.10 gezeigt.

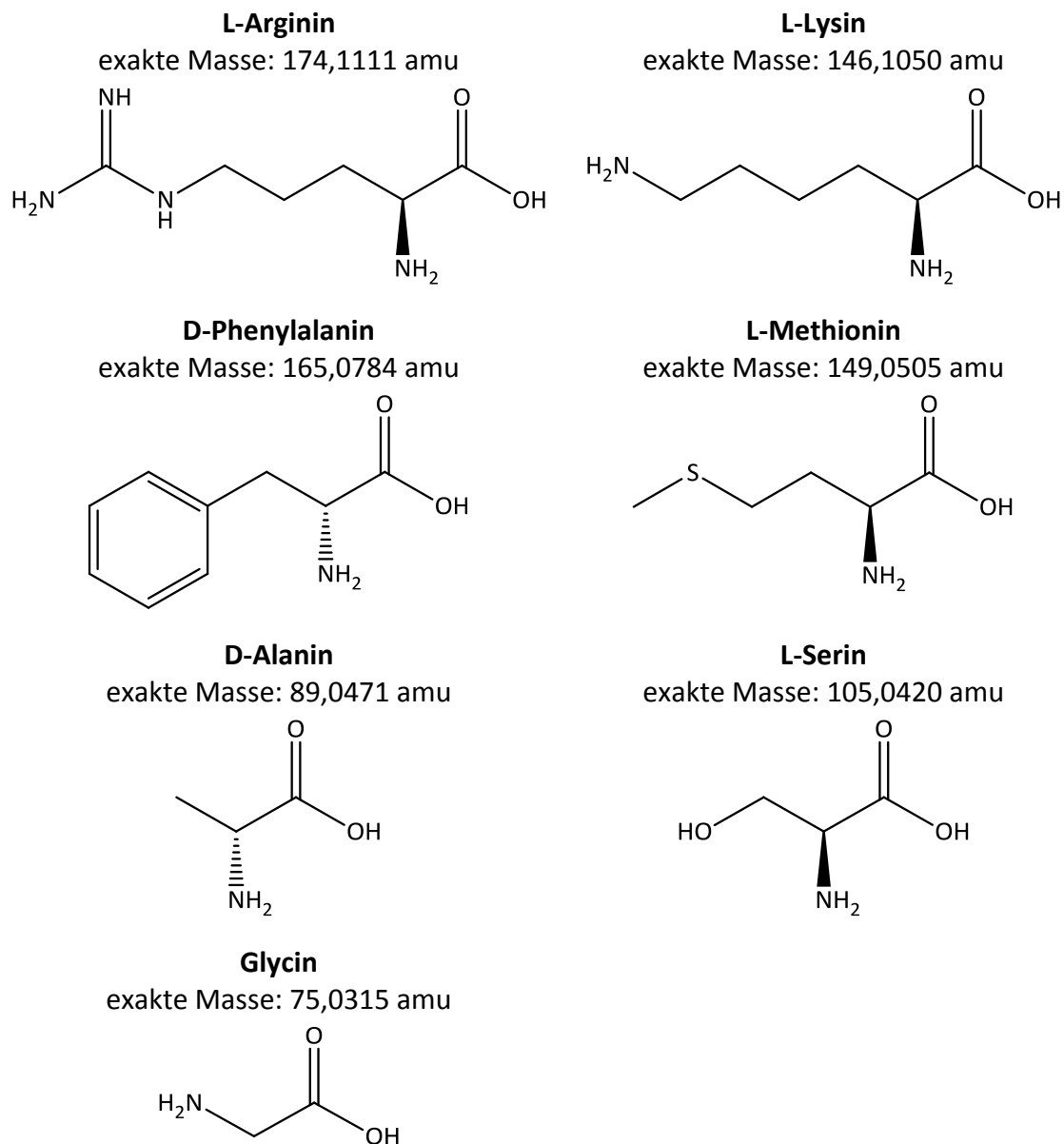


Abbildung 5.10: Strukturformeln und exakte Massen der untersuchten Aminosäuren (Arginin, Lysin, Phenylalanin, Methionin, Alanin, Serin und Glycin)

Aufgrund der Bedeutung von Aminosäuren für den menschlichen Körper ist es wichtig, eine einfache, schnelle und sensitive Methode zur Bestimmung und Identifizierung von Aminosäuren bzw. Proteinen zu entwickeln. Dazu sollen sowohl eine flüssigchromatographische als auch eine elektrophoretische Trennung mit laserinduzierter, wellenlängen-

aufgelöster Fluoreszenzdetektion auf Basis der Methode von KAUMKÖTTER et al. entwickelt und diese miteinander verglichen werden [107]. Aminosäuren und Proteine zeigen allerdings in der Regel keine natürliche Fluoreszenz im sichtbaren Bereich, daher müssen sie für eine LIF-Detektion vor der Analyse mit einem Derivatisierungsreagenz umgesetzt werden. Als Derivatisierungsreagenz wurde 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) gewählt, da dieses mit Aminogruppen stark fluoreszierende Produkte bildet und selbst keine Fluoreszenz aufweist [108]. NBD-Cl ist gut löslich in organischen Lösungsmitteln, jedoch schlecht in Wasser [109]. Die Strukturformel und exakte Masse von NBD-Cl ist in Abbildung 5.11 gezeigt.

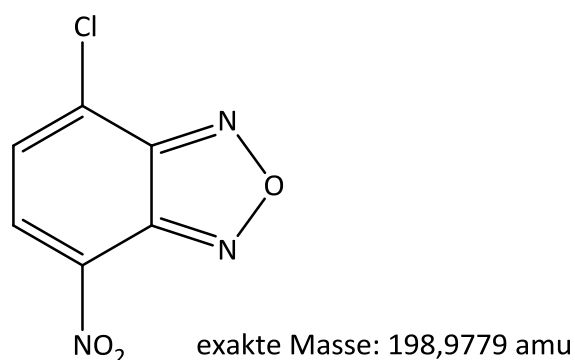


Abbildung 5.11: Strukturformel und exakte Masse von 4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl)

Obwohl NBD-Cl selbst keine Fluoreszenz zeigt und so die Detektion nicht stört, fluoresziert dessen Hydrolyseprodukt, welches bei alkalischen Bedingungen als NBD-O^- vorliegt, schwach. Die gebildeten aliphatischen Aminderivate zeigen eine starke Fluoreszenz, wobei die Derivate primärer Amine schwächer fluoreszieren als die sekundärer. Aromatische Aminderivate fluoreszieren nicht [110]. Die Umsetzung mit NBD-Cl erfolgt

in alkalischer Lösung durch nukleophile Substitution, dabei können auch Hydroxy- bzw. Thiolgruppen zu nicht oder nur schwach fluoreszierenden Derivaten umgesetzt werden [109, 111]. Die gebildeten Derivate sind ohne Lichteinwirkung einige Stunden lang stabil. Das Absorptionsmaximum der NBD-Derivate ist vom Lösungsmittel und dem Substituenten abhängig, liegt jedoch im sichtbaren Bereich. Daher kann eine Störung durch biologische Substanzen mit nativer Fluoreszenz im UV-Bereich ausgeschlossen werden [109].

Es soll also ein kapillarelektrophoretische Trennung mit LIF-Detektion der Aminosäuremischung entwickelt und mit einer flüssigchromatographischen Methode verglichen werden. Außerdem soll die Umsetzung von β -Lactoglobulin A mit NBD-Cl und anschließender kapillarelektrophoretische Analyse erfolgen.

5.3.2 Probenvorbereitung

Für die elektrophoretische und flüssigchromatographische Trennung der Aminosäuren (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin) wurden 10^{-2} mol/L Stammlösungen in Ethanol und Wasser (1:1) hergestellt. Von β -Lactoglobulin A wurde ebenfalls eine Stammlösung ($3,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L) in einem Carbonatpuffer (pH=9, 50 mmol/L) für die kapillarelektrophoretische Analyse erstellt. Von NBD-Cl wurde eine Stammlösung ($5 \cdot 10^{-2}$ mol/L) in Ethanol hergestellt.

Für den Derivatisierungsschritt wurde eine ethanolische Natriumacetatlösung hergestellt. Dazu wurde Ethanol mit einer gesättigten

ethanolischen Natriumacetatlösung (20:1) gemischt und der pH-Wert auf 8,5 mit Essigsäure eingestellt.

Für die Analyse der einzelnen Aminosäuren wurden von der ethanolischen Natriumacetatlösung 1200 μL mit 250 μL der NBD-Cl-Lösung ($5 \cdot 10^{-2}$ mol/L) und 50 μL der jeweiligen Aminosäurelösung (10^{-2} mol/L) versetzt. Dies entspricht einem 25-fachen Überschuss von NBD-Cl gegenüber den Aminosäuren. Die Reaktion erfolgte bei 60 °C für eine Stunde. Vor den Analysen wurden die Lösungen auf 4 °C abgekühlt und um den Faktor 30 auf $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L (LIF-) bzw. um den Faktor drei auf $1,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L (MS-Analysen) verdünnt.

Für die Analyse der Aminosäuremischung wurden von der ethanolischen Natriumacetatlösung 1080 μL mit 350 μL der NBD-Cl-Lösung ($5 \cdot 10^{-2}$ mol/L) und jeweils 10 μL der jeweiligen Aminosäurelösung (10^{-2} mol/L) versetzt. Dies entspricht einem 25-fachen Überschuss von NBD-Cl gegenüber den einzelnen Aminosäuren. Die Reaktion erfolgte bei 60 °C für eine Stunde. Vor der Analyse wurde die Lösung auf 4 °C abgekühlt und um den Faktor 6 auf $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L für jede Aminosäure verdünnt.

Für die Analyse des β -Lactoglobulin A wurden 600 μL Carbonatpuffer (pH=9, 50 mmol/L) mit 600 μL der NBD-Cl-Lösung ($5 \cdot 10^{-2}$ mol/L) und 100 μL der Proteinlösung ($3,5 \cdot 10^{-4}$ mol/L) versetzt. Dies entspricht einem 25-fachen Überschuss von NBD-Cl gegenüber den Aminogruppen des Proteins. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht um eine Denaturierung des β -Lactoglobulin A zu vermeiden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL Ameisensäure gestoppt und die Lösung mit 0,1 %-

iger Ameisensäure auf 2,5 mL verdünnt. Die Lösung wurde zum Entsalzen auf eine PD-10-Säule gegeben und das Protein wurde im Anschluss mit 3,5 mL 0,1 %-iger Ameisensäure von der Säule eluiert. Diese Lösung wurde direkt mittels CE/ESI-ToF-MS analysiert (10^{-5} mol/L) und vor der CE-LIF-Analyse um den Faktor 10 auf 10^{-6} mol/L verdünnt.

Für die kapillarelektrophoretischen Analysen wurde ein 50 mmol/L Carbonatpuffer mit einem pH-Wert von 9 als Elektrolytlösung genutzt. Die Herstellung des Puffers erfolgte durch Lösen von 25 mmol (2,4 g) Ammoniumcarbonat in 500 mL Wasser und Einstellen des pH-Wertes mit Essigsäure auf 9.

Für die flüssigchromatographischen Analysen wurde ein 25 mmol/L Ammoniumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 als wässrige mobile Phase genutzt. Die Herstellung des Puffers erfolgte durch Lösen von 25 mmol (1,93 g) Ammoniumcarbonat in 1 L Wasser und Einstellen des pH-Wertes mit Essigsäure auf 5,5.

5.3.3 Parameter der CE-LIF-Methode

Nach dem Einbau des CE-Adapters in die Kassette ist zunächst eine Ausrichtung des Lasers erforderlich. Dazu wurde die Kapillare hydrodynamisch mit einer Coumarin 343-Lösung (10^{-7} mol/L) gefüllt. Anschließend wurde der Laserstrahl manuell auf die maximale Intensität der emittierten Fluoreszenz am Spektrometer justiert. Zur Konditionierung wurde die Kapillare zehn Minuten lang mit 1 mol/L Natronlauge gespült. Anschließend wurde die Kapillare 30 Minuten lang mit dem Trennpuffer

konditioniert. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt und nach jeder Analyse die Kapillare eine Minute lang mit Pufferlösung gespült.

Die Injektionszeit der Probenlösung betrug 2 s bei einem Injektionsdruck von 40 mbar, dies entspricht 80 mbar·s. Die verwendete quadratische Kapillare hatte eine Länge von 65 cm (effektiv 50 cm) und einen inneren Durchmesser von 75 μm . Es wurde ein Strom von 75 μA angelegt. Als Elektrolytlösung wurde ein Carbonatpuffer verwendet. Die Parameter des Detektionssystems sind in Tabelle 5.15 bzw. Tabelle 5.16 aufgeführt.

Tabelle 5.15: LIF-Parameter der CE-LIF-Trennung einer mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuremischung

TE-Kühlung des CCD-Chips	-15 °C
Integrationszeit	10 ms
Mittelung der Spektren	30
Glasfaser	600 μm , SMA 905
Anregungsquelle	Diodenlaser 405 nm, 100 mW, 80 mA Betriebsstrom
Asphärische Laserlinse	Antireflektionsbeschichtung 400-600 nm
Emissionsfilter	Cut-on-Wellenlänge 435 nm
Gleitender Mittelwert	3

Tabelle 5.16: Integrationsgrenzen der Analytemissionsspektren zur Erstellung der Elektropherogramme

Aminosäure bzw. Protein	Integrationsgrenzen [nm]
Alanin	515,55-620,79
Arginin	514,02-664,33
Glycin	507,12-627,10
Lysin	505,20-625,62
Methionin	503,28-633,39
Phenylalanin	506,35-626,36
Serin	508,27-628,21
Aminosäuremischung	514,41-664,69
β -LGA	525,12-675,30

5.3.4 Parameter der CE/ESI-ToF-MS-Methode

Die ESI-ToF-MS-Parameter zur Detektion der Analyten nach der CE-Trennung sind in Tabelle 5.17 zusammengefasst. Die englischen Bezeichnungen der MS-Software wurden übernommen.

Tabelle 5.17: ESI-ToF-MS-Parameter für die Detektion von NBD-Cl-derivatisierten Aminosäuren und β -Lactoglobulin A

	Aminosäuren	β-LGA
Ion Polarity	Negative	Positive
End Plate Offset	-400 V	-500 V
Capillary	4000 V	4000 V
Nebulizer	0,2 bar	0,2 bar
Dry Gas	4,0 L/min	4,0 L/min
Dry Temp	180 °C	190 °C
Capillary Exit	-90,0 V	150,0 V
Hexapole 1	-25,0 V	23,0 V
Hexapole 2	-21,4 V	21,0 V
Transfer Time	49,0 μ s	60,0 μ s
Skimmer 1	-30,0 V	50,0 V
Skimmer 2	-26,5 V	22,0 V
Hexapole RF	60,0 Vpp	400,0 Vpp
Pre Puls Storage	5,0 μ s	30,0 μ s
Lens 1 Extraction	-21,1V	21,3 V
Lens 2	-7,4 V	7,4 V
Lens 3	-22,0 V	22,4 V
Lens 4	-0,3 V	0,3 V
Lens 5	27,5 V	-27,5 V
Mass Range	m/z 50-600	m/z 500-2200

Als *Sheath Liquid* wurde eine Mischung aus Isopropanol und 1 %-iger Ameisensäure (1:1, v/v) verwendet. Um eine möglichst hohe Massengenauigkeit zu erhalten, wurde eine interne Kalibrierung mit Na-Formiat im Anschluss an jede Analyse durchgeführt.

5.3.5 Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode

Nach dem Einbau des HPLC-Adapters in die Kassette ist zunächst eine Ausrichtung des Lasers erforderlich. Dazu wurde die Glaskapillare mit einer Coumarin 343-Lösung (10^{-7} mol/L) gefüllt. Anschließend wurde der Laserstrahl manuell auf die maximale Intensität der emittierten Fluoreszenz am Spektrometer justiert. Das System wurde danach zehn Minuten lang mit der mobilen Phase gespült. Vor jeder Messung wurde der gesamte spektrale Bereich auf den Intensitätswert Null gesetzt. Die Parameter der HPLC-LIF/MS-Methode sind im Folgenden aufgeführt. Die englischen Bezeichnungen der jeweiligen Software wurden übernommen.

Tabelle 5.18: HPLC-Parameter der HPLC-LIF/-ESI-MS-Trennung einer mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuremischung

Säule	Bischoff ProntoSIL 120-5-C18 H <i>150 mm x 2,0 mm, 5 μm</i>
Wässrige mobile Phase	Ammoniumacetatpuffer (25 mmol/L, pH=5,5)
Organische mobile Phase	Acetonitril (AcN)
Flussrate	300 μ L/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 μ L

Tabelle 5.19: Gradient der HPLC-LIF/ESI-MS-Analyse einer mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuremischung

Zeit [min]	0	5	6	16	21	22	24
AcN [%]	13	20	20	85	85	13	13

Tabelle 5.20: LIF-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS-Analyse einer mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuremischung

TE-Kühlung des CCD-Chips	-15 °C
Integrationszeit	10 ms
Mittelung der Spektren	35
Glasfaser	600 µm, SMA 905
Anregungsquelle	Diodenlaser 405 nm, 100 mW, 80 mA Betriebsstrom
Asphärische Laserlinse	Antirefleksionsbeschichtung 400-600 nm
Emissionsfilter	Cut-on-Wellenlänge 435 nm
Gleitender Mittelwert	3

Tabelle 5.21: Integrationsgrenzen der Analytemissionsspektren zur Erstellung der Chromatogramme

Aminosäure	Integrationsgrenzen [nm]
Alanin	499,05-613,30
Lysin	500,20-620,05
Methionin	497,12-617,07
Phenylalanin	503,28-623,39
Serin	498,28-618,56
Aminosäuremischung	500,20-620,05

Tabelle 5.22: ESI-MS-Parameter der HPLC-LIF/ESI-MS-Analyse einer mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuremischung

Scan Type	Multiple reaction monitoring
Polarity	Negative
Curtain Gas	10 psi

IonSpray Voltage	-4500 V
Source Temperature	400 °C
Ion Source Gas 1	90 psi
Ion Source Gas 2	10 psi
Interface Heater	on

Tabelle 5.23: Aminosäurespezifische ESI-MS/MS-Parameter

MS-Parameter	Alanin	Lysin*	Methionin	Phenylalanin	Serin
Q1 Mass [amu]	250,9	471,2	311,0	327,0	266,0
Q3 Mass [amu]	192,0	426,6	142,0	192,0	193,0
Collision Gas	High	High	High	High	High
Declustering Potential [V]	-15	-10	-15	-25	-10
Entrance Potential [V]	-3	-2	-3	-3	-2
Collision Cell Entrance Potential [V]	-20	-10	-25	-20	-10
Collision Cell Exit Potential [V]	-4	-4	-4	-4	-4

* zweifach derivatisiert

5.3.6 Geräte

Tabelle 5.24: Verwendete Geräte und deren Hersteller bzw. Vertrieb

Gerät	Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	TE214S	Sartorius, Göttingen
Autosampler	SIL-HT	Shimadzu, Duisburg
Diodentreiber	EU37	Roithner, Wien (A)
Entgaser	DGU-14A	Shimadzu, Duisburg
ESI-ToF-MS	micrOTOF	Bruker Daltonics®, Bremen
Hubkolbenpipette	Reference®	Eppendorf, Hamburg
Kapillare	WWP 075 375	Polymicro, Phoenix (USA)
Kapillarelektrophorese	G1600	Agilent, Waldbronn
Laserdiode (405 nm)	PHR-805T	Insaneware Deluxe, Gladbeck
LC-Pumpen	LC-10AD	Shimadzu, Duisburg
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Dülmen
Quadrupol-MS	QTrap 2000	Applied Biosystems, Darmstadt
Säulenofen	CTO-10A	Shimadzu, Duisburg
Sheath Liquid-Pumpe	Serie 100 D	Teledyne ISCO, Lincoln (USA)
Spannungsquelle	6080	Peaktech, Ahrensburg
Spektrometer	QE65000	Ocean Optics, Ostfildern
Spritzenpumpe	Model 74900	Cole Parmer, Vernon Hills (USA)

5.3.7 Chemikalien

Tabelle 5.25: Verwendete Chemikalien mit Reinheit, CAS-Nummer und Hersteller

Chemikalie	Reinheit	CAS-Nr.	Hersteller/Vertrieb
Acetonitril	≥99,9 %	75-05-8	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Ameisensäure	p.a.	64-18-6	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Ammoniak	25 %	1336-21-6	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	≥99 %	631-61-8	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Ammoniumcarbonat	≥99,5 %	506-87-6	Fluka Chemie, Buchs (CH)
D-Alanin	>99 %	338-69-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
DL-Serin	99 %	302-84-1	Acros Organics, Geel (B)
D-Phenylalanin	>99 %	673-06-3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	99 %	64-19-7	VWR, Darmstadt
Ethanol	99 %	64-17-5	VWR, Darmstadt
Glycin	≥99 %	56-40-6	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Isopropanol	≥99,7 %	67-63-0	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Arginin	≥99,5 %	74-79-3	Fluka Chemie, Buchs (CH)
L-Lysin	≥98 %	56-87-1	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Methionin	≥98 %	63-68-3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumformiat	≥99 %	141-53-7	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	≥ 98 %	1310-73-2	Sigma-Aldrich, Steinheim
NBD-Cl	99 %	10199-89-0	abcr, Karlsruhe
β-Lactoglobulin A	>90 %	50863-92-8	Sigma-Aldrich, Steinheim

5.3.8 Kapillarelektrophoretische Trennung einer Aminosäuremischung

Durch die Derivatisierung der untersuchten Aminosäuren (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin) konnte die Nutzung der sensitiven Fluoreszenzdetektion ermöglicht werden. Allerdings wird die strukturelle Ähnlichkeit der Aminosäuren untereinander durch diese Umsetzung verstärkt und so die Trennung erschwert. Dennoch konnte mit der in Abschnitt 5.3.3 beschriebenen CE-LIF-Methode erfolgreich eine Trennung der sieben Aminosäuren innerhalb von acht Minuten erreicht werden. In Abbildung 5.12 ist ein Elektropherogramm der Aminosäuremischung gezeigt.

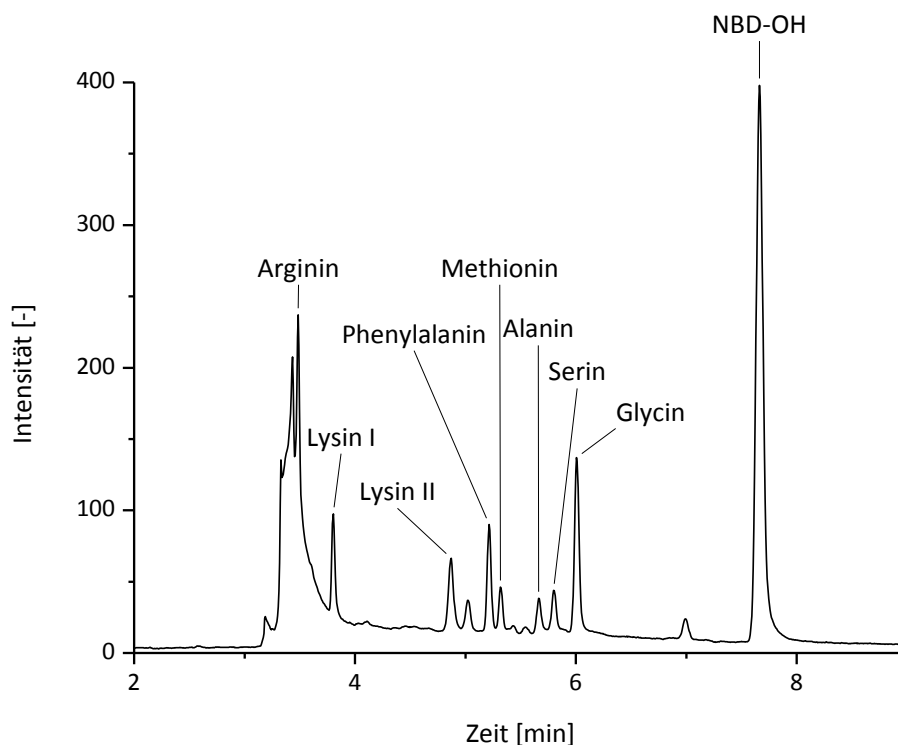


Abbildung 5.12: Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse einer Aminosäuremischung (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin) mit einer Konzentration von jeweils $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L

Wie in dem Elektropherogramm der Aminosäuremischung zu sehen ist, sind alle Aminosäuren sowie das Hydrolyseprodukt des NBD-Cl, das NBD-OH, gut voneinander getrennt. Jedoch ist die Nettoladung des Arginins so gering, dass es mit dem EOF bei 3,5 min migriert und so nicht quantifiziert werden kann. Die nächsten beiden Signale bei 3,8 und 4,9 min konnten dem Lysin zugeordnet werden. Es liegt sowohl die einfach als auch die zweifach derivatisierte Aminosäure vor, sodass beide Derivate voneinander getrennt werden konnten. Phenylalanin hat eine Migrationszeit von 5,2 min und ist gut vom Methionin bei 5,3 min getrennt. Das Signal mit einer Migrationszeit von 5,7 min konnte Alanin zugeordnet werden. Als letzte Aminosäuren migrieren Serin bei 5,8 min und Glycin bei 6,0 min. Das Hydrolyseprodukt des im Überschuss zugegebenen Derivatisierungsreagenzes migriert bei 7,7 min und stört die Detektion der Analyten nicht.

Obwohl das Absorptions- sowie das Emissionsmaximum der NBD-Derivate vom Lösungsmittel und dem Substituenten abhängig ist, kann keine sichere Identifizierung der jeweiligen Aminosäuren über ihre Fluoreszenzspektren erfolgen, da die gebildeten Derivate der Aminosäuren im gleichen spektralen Bereich fluoreszieren. Jedoch kann mit der wellenlängenaufgelösten Detektion der Integrationsbereich den jeweiligen Aminosäuren angepasst werden und auf diese Weise die Empfindlichkeit verbessert werden. Ein dreidimensionales mit Specana erstelltes Elektropherogramm ist in Abbildung 5.13 gezeigt.

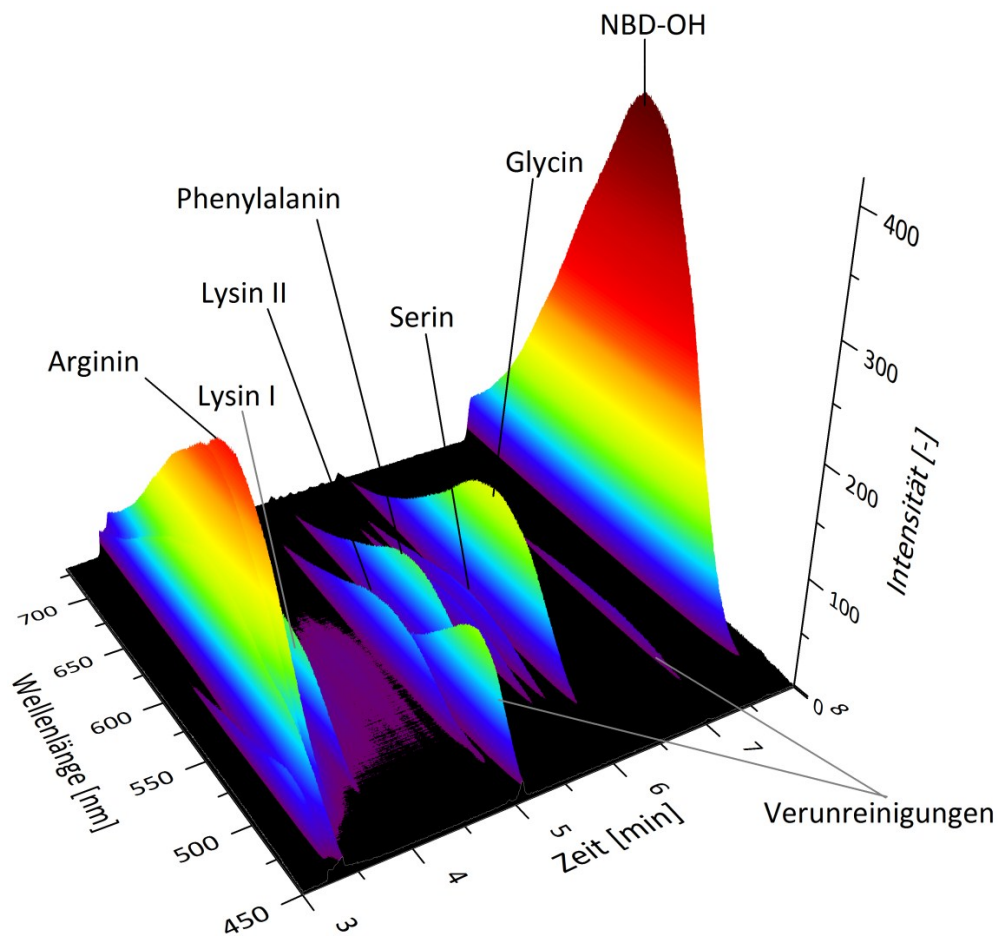


Abbildung 5.13: Dreidimensionales Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse einer Aminosäuremischung (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin)

Auch in einem dreidimensionalen Elektropherogramm können die Aminosäuren nur schwer unterschieden werden, allerdings können fluoreszierende Verunreinigungen erkannt werden. So können das Signal zwischen dem zweiten Peak des Lysins und dem Phenylalanin bei 5 min und das Signal vor dem NBD-OH bei 7 min einer Verunreinigung zugeordnet werden, da ihr Emissionsmaximum im Vergleich zu den Aminosäurederivaten deutlich im längerwelligen Bereich liegt.

Die Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Aminosäuren konnte durch Einzelmessungen der Analyten erreicht werden. Die dabei erhaltenen Elektropherogramme sind in Abbildung 5.14 dargestellt.

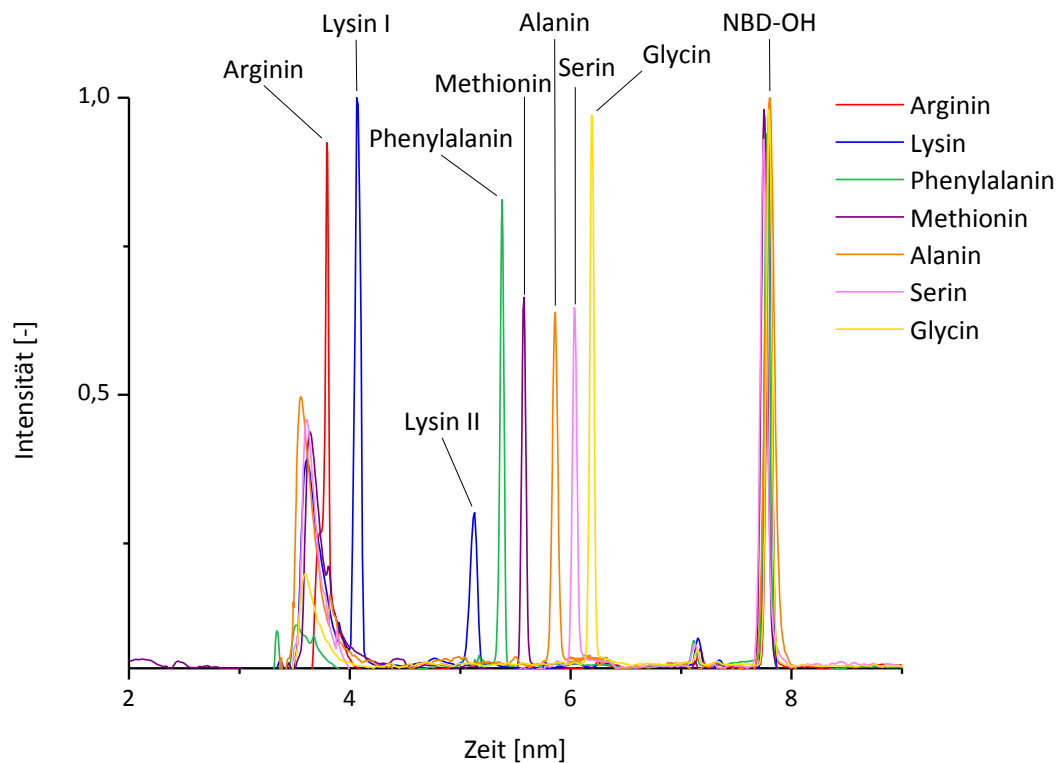


Abbildung 5.14: Normierte Elektropherogramme der CE-LIF-Analyse einzelner Aminosäuren mit einer Konzentration von jeweils $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L

Mit Hilfe der Einzelmessungen der Aminosäurederivate konnte die Migrationsreihenfolge der Analyten zweifelsfrei bestimmt werden. Auch die Migrationszeiten stimmen gut mit denen der Analyse der Aminosäuremischung überein. Allerdings können die Signale nur den jeweiligen Probenlösungen zugeordnet werden, eine Unterscheidung mehrerer Signale einer Lösung ist nicht möglich. So können die beiden Signale des Lysins nur mittels massenspektrometrischer Detektion unterschieden werden. Um zu überprüfen, welches der Signale von der

einfach bzw. zweifach derivatisierten Aminosäure stammt, wurde die CE an ein Flugzeitmassenspektrometer gekoppelt. Die entsprechenden Elektropherogramme sind in Abbildung 5.15 gezeigt.

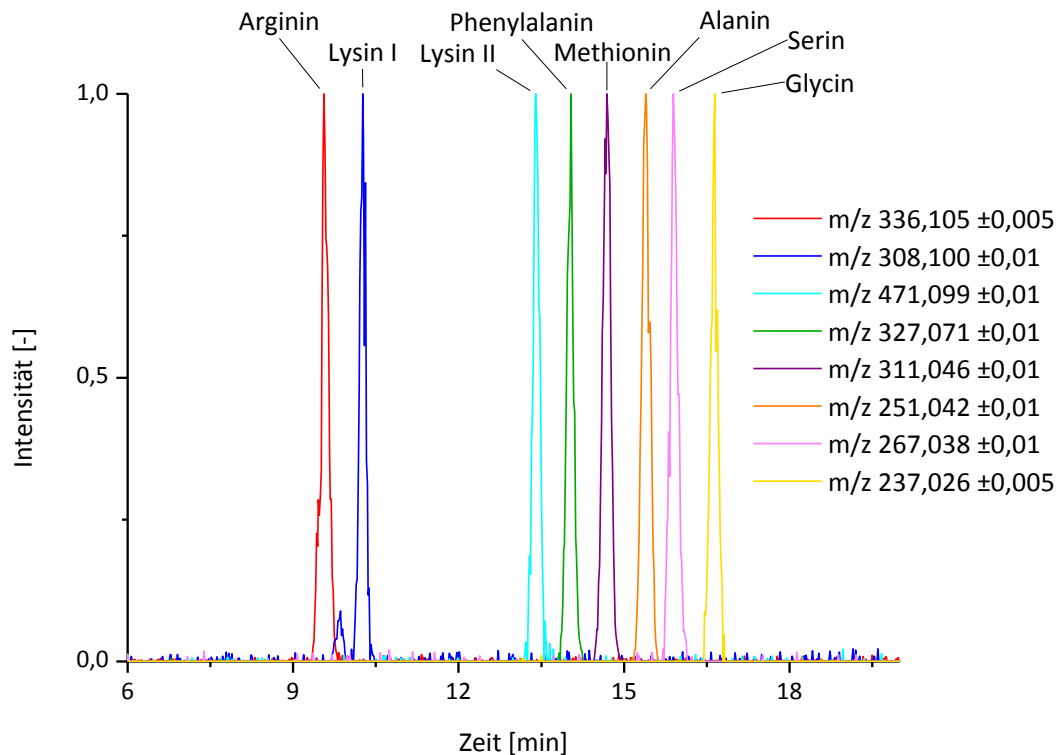


Abbildung 5.15: Normierte Elektropherogramme der CE/ESI-ToF-MS-Analyse einzelner Aminosäuren mit einer Konzentration von jeweils $1,1 \cdot 10^{-4}$ mol/L

Im Vergleich zur Fluoreszenzdetektion ist die Migrationszeit aller Aminosäuren bei der massenspektrometrischen Detektion länger. Dies liegt an der zusätzlichen Trennstrecke nach der Position des Fluoreszenzdetektors, da die MS-Detektion nicht innerhalb der Kapillare durchgeführt werden kann. Die Migrationsreihenfolge ist jedoch identisch und so können die beiden Lysinderivate zugeordnet werden. Das einfach derivatisiert Lysin hat eine Migrationszeit von 10,3 min und als zweites migriert das zweifach derivatisierte Lysin bei 13,4 min. Auch die

Identifizierung der restlichen Aminosäuren konnte mittels ihrer extrahierten Ionenspuren verifiziert werden.

Mit den Ergebnissen der CE-LIF-Analyse (Abbildung 5.14) können die Nachweisgrenzen für diese Methode abgeschätzt werden. Um die Leistungsfähigkeit des kompakten CE-LIF-Systems (Abschnitt 4.8) mit der des auf Mikroskopbasis aus Abschnitt 3.1 vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse von KAUMKÖTTER et al. [107] herangezogen. Als Rauschen wurde jeweils die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet.

Tabelle 5.26: Nachweisgrenzen ($S/N=3$) für das kompakte CE-LIF-System (Abschnitt 4.8) und das auf Mikroskopbasis (Abschnitt 3.1) bei der CE-LIF-Analyse NBD-Cl-derivatisierter Aminosäuren

	CE-LIF [mol/L]	CE-LIF-Mikroskop [mol/L]
Arginin	$3,7 \cdot 10^{-8}$	$3,6 \cdot 10^{-8}$
Serin	$6,8 \cdot 10^{-8}$	$3,5 \cdot 10^{-8}$
Alanin	$9,4 \cdot 10^{-8}$	$9,9 \cdot 10^{-8}$
Lysin	$2,8 \cdot 10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^{-8}$
Methionin	$7,9 \cdot 10^{-8}$	$4,4 \cdot 10^{-8}$
Phenylalanin	$2,2 \cdot 10^{-8}$	$3,0 \cdot 10^{-8}$
Glycin	$4,2 \cdot 10^{-8}$	$5,7 \cdot 10^{-9}$

In Tabelle 5.26 sind die Nachweisgrenzen ($S/N=3$) für CE-LIF-Analyse der derivatisierten Aminosäuren zusammengefasst. Der Vergleich der Ergebnisse für das kompakte System und das auf Mikroskopbasis zeigt, dass die Nachweistärke der beiden Systeme vergleichbar ist. Lediglich die

Nachweisgrenze für Glycin weist einen größeren Unterschied von Faktor 7 auf. Es konnte also mit einem äußerst kompakten und auch kostengünstigen Aufbau eine ähnlich gute Empfindlichkeit für diese Anwendung erreicht werden. Die Variabilität des entwickelten LIF-Systems erlaubt außerdem die Kopplung an eine HPLC und so die Nutzung eines komplementären Trennmechanismus.

5.3.9 Flüssigchromatographische Trennung einer Aminosäuremischung

Um eine Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen, wurden die untersuchten Aminosäuren (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin) wie in Abschnitt 5.3.2 mit einem 25-fachen Reagenzüberschuss derivatisiert. Die Analyse erfolgte mit der in Abschnitt 5.3.5 beschriebenen HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Methode. Es konnten allerdings nur fünf der sieben untersuchten Aminosäuren voneinander getrennt werden. Außerdem konnte eine Vielzahl an Nebenprodukten oder Verunreinigungen detektiert werden. In Abbildung **5.16** ist das Chromatogramm der HPLC-LIF-Analyse der mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuremischung mit einer Konzentration von jeweils $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L gezeigt.

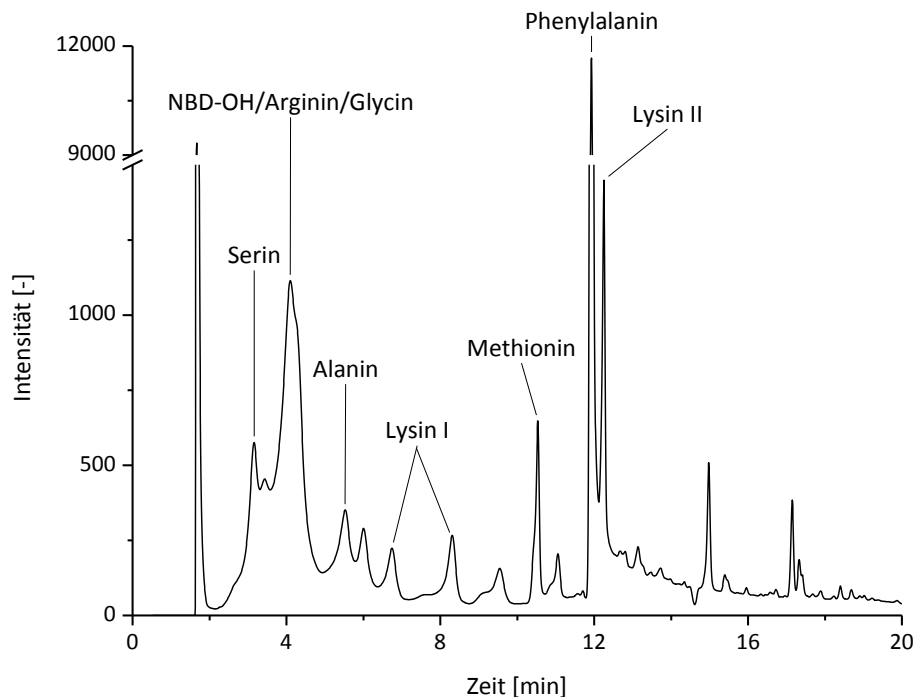


Abbildung 5.16: Chromatogramm der HPLC-LIF-Analyse einer Aminosäuremischung (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin) mit einer Konzentration von jeweils $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L

Wie in der Abbildung 5.16 zu sehen ist, konnten lediglich fünf Aminosäuren vom Hydrolyseprodukt des Derivatisierungsreagenzes bei 4,1 min getrennt werden. Dabei eluiert das Serin noch vor dem NBD-OH bei 3,2 min und das Alanin direkt dahinter bei 5,5 min. Für das Lysin konnten wiederum mehrere Signale beobachtet werden, so sind bei 6,7, 8,3 und 12,3 min die Derivatisierungsprodukte zu beobachten. Das Signal bei 10,5 min kann dem Methionin und der größte Peak bei 11,9 min dem Phenylalanin zugeordnet werden. Da die Fluoreszenzspektren der derivatisierten Aminosäuren sehr ähnlich sind, kann keine Differenzierung der Analyten über die wellenlängenaufgelöste Detektion durchgeführt werden. Außerdem macht auch die Vielzahl an Signalen eine Einzelanalyse jeder Aminosäure notwendig, um die Peaks den Analyten zuordnen zu

können. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 5.17 dargestellt.

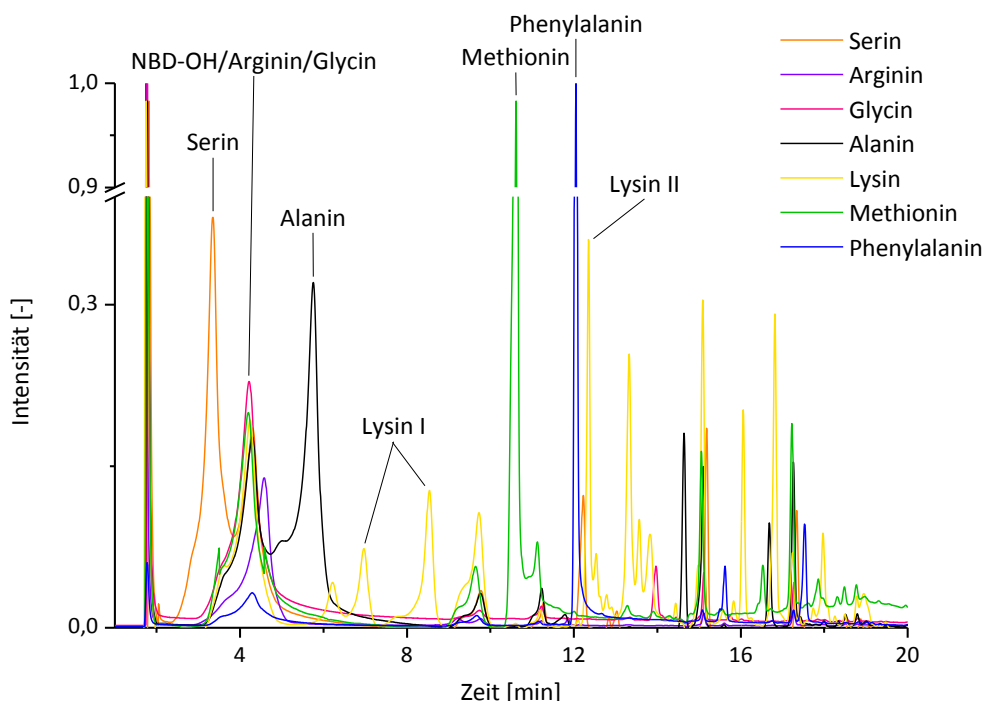


Abbildung 5.17: Normierte Chromatogramme der HPLC-LIF-Analyse einzelner Aminosäuren mit einer Konzentration von jeweils $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L

Mit Hilfe der Einzelmessungen der Aminosäurederivate konnte die Elutionsreihenfolge der Analyten bestimmt werden. Auch die Retentionszeiten stimmen gut mit denen der Analyse der Aminosäuremischung überein. Allerdings können die Signale nur den jeweiligen Probenlösungen zugeordnet werden, eine Unterscheidung mehrerer Signale einer Lösung ist nicht möglich. Insbesondere die große Zahl an Peaks bei der Lysinprobenlösung macht eine sichere Identifizierung unmöglich. Es wurde nach der Fluoreszenzdetektion eine massenspektrometrische Detektion durchgeführt, um die Aminosäurederivate über ihre charakteristischen Fragmentierungsreaktionen mittels

MS/MS-Analyse bestimmen zu können. Die Chromatogramme der HPLC/ESI-MS/MS-Analyse sind in Abbildung 5.18 zusammengefasst.

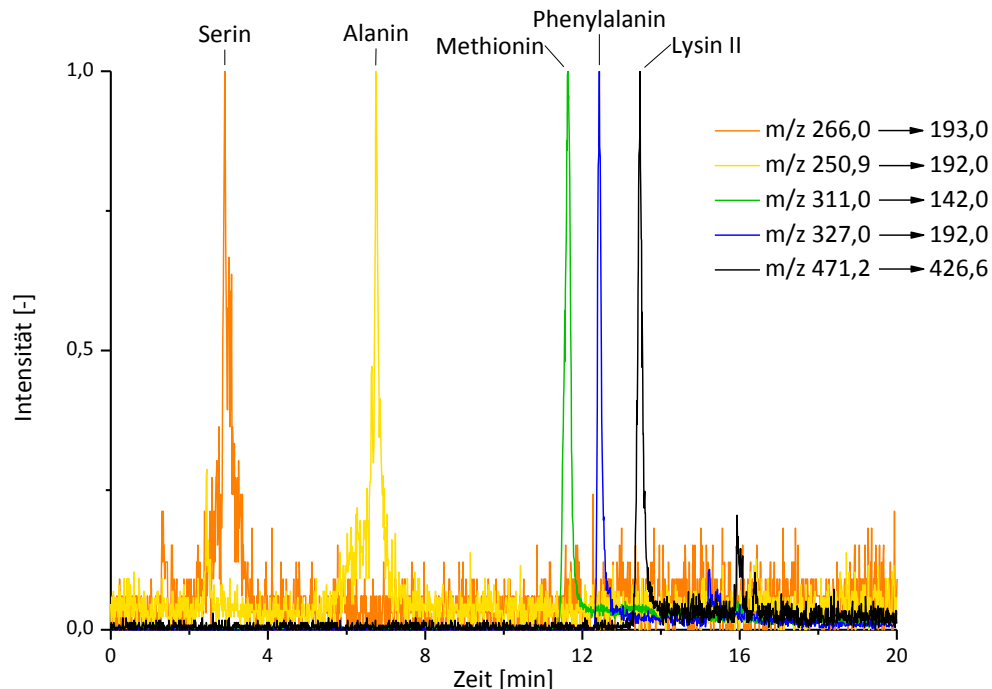


Abbildung 5.18: Normierte Chromatogramme der HPLC/ESI-MS/MS-Analyse einzelner Aminosäuren mit einer Konzentration von jeweils $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol/L

Mittels massenspektrometrischer Detektion konnten die Retentionszeiten sowie die Elutionsreihenfolge von Serin, Alanin, Methionin und Phenylalanin verifiziert werden. Allerdings konnte nur für das zweifach derivatisierte Lysin ein optimaler MRM-Übergang beobachtet und entsprechend nur dieses Derivat zugeordnet werden. Für andere mögliche Umsetzungsprodukte konnte keine MS/MS-Detektion erzielt werden. Die zahlreichen Signale insbesondere beim Lysin konnten keinem Produkt oder einer bestimmten Verunreinigung zugeordnet werden. Beim Lysin liegt außer den beiden Aminogruppen nur die Carboxylgruppe als funktionelle Gruppe vor. Eine Derivatisierung dieser ist jedoch sehr unwahrscheinlich und würde nur ein zusätzliches Signal erklären. Um

diese Signale zuordnen zu können, sind zusätzliche Messungen wie die Bestimmung der exakten Massen der einzelnen Peaks nötig. Jedoch konnten fünf der untersuchten Aminosäuren erfolgreich umgesetzt, getrennt und detektiert werden.

Mit den Ergebnissen der HPLC-LIF-Analyse (Abbildung 5.17) können die Nachweisgrenzen für diese Methode abgeschätzt werden. Um die Leistungsfähigkeit des kompakten HPLC-LIF-Systems (Abschnitt 4.8) mit der eines kommerziell erhältlichen Fluoreszenzdetektors (RF-10 A_{XL}, Shimadzu) vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse von KAUMKÖTTER et al. [107] herangezogen. Als Rauschen wurde jeweils die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem drifffreien Bereich berechnet.

Tabelle 5.27: Nachweisgrenzen ($S/N=3$) für das kompakte HPLC-LIF-System (Abschnitt 4.8) und einen kommerziellen Fluoreszenzdetektor (RF-10 A_{XL}, Shimadzu) der HPLC-LIF-Analyse von NBD-Cl-derivatisierten Aminosäuren

	LIF [mol/L]	Fluoreszenzdetektor [mol/L]
Serin	$3,7 \cdot 10^{-9}$	$2,2 \cdot 10^{-8}$
Alanin	$6,0 \cdot 10^{-9}$	$2,5 \cdot 10^{-8}$
Lysin	$1,3 \cdot 10^{-9}$	$7,7 \cdot 10^{-8}$
Methionin	$2,3 \cdot 10^{-9}$	$2,8 \cdot 10^{-8}$
Phenylalanin	$2,3 \cdot 10^{-10}$	$3,7 \cdot 10^{-8}$

In Tabelle 5.27 sind die Nachweisgrenzen ($S/N=3$) für CE-LIF-Analyse der derivatisierten Aminosäuren zusammengefasst. Der Vergleich der Ergebnisse für das kompakte LIF-System und den kommerziellen Fluoreszenzdetektor zeigt, dass die Nachweisstärke des laserinduzierten Systems für alle Aminosäuren deutlich niedriger ist. So ist die

Empfindlichkeit zwischen Faktor 4 für Alanin und Faktor 129 für Phenylalanin besser, obwohl beim Fluoreszenzdetektor die Anregungswellenlänge frei wählbar ist und somit eine optimale Anregung der Fluorophore ermöglicht wird. Beim Vergleich der Nachweisgrenzen des HPLC-LIF-Systems (Tabelle 5.27) und des CE-LIF-Systems (Tabelle 5.26) ist zu beobachten, dass das HPLC-System durch das größere Injektionsvolumen und den größeren Kapillarinne Durchmesser etwa ein bis zwei Dekaden sensitiver ist. Es konnte also mit diesem kompakten System und dem kostengünstigen Diodenlaser eine sehr gute Empfindlichkeit für diese Methode erreicht werden.

5.3.10 Kapillarelektrophoretische Analyse von β -Lactoglobulin A

Die Umsetzung von Proteinen mit NBD-Cl ist eine vergleichsweise kostengünstige Methode, um Proteine für die Fluoreszenzdetektion verfügbar zu machen. Die Derivatisierung von β -Lactoglobulin A erfolgte nach der Methode in Abschnitt 5.3.2 mit einem 700-fachen Überschuss an Derivatisierungsreagenz bezüglich der Proteinkonzentration, was einem 25-fachen Überschuss bezüglich der Aminogruppen entspricht. Die Probenlösungen wurden vor der Analyse mittels PD-10-Säulen entsalzt, damit die hohe Reagenzkonzentration keine negativen Auswirkungen auf die Analyse bzw. die massenspektrometrische Detektion hat. Bei diesem Vorgang nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie werden Moleküle <5000 Da auf der Säule zurückgehalten, sodass β -LGA vom NBD-Cl abgetrennt werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Umsetzung mit NBD-Cl und die Abtrennung des Reagenzes erfolgreich waren, wurde die

Probenlösung mittels CE/ESI-ToF-MS untersucht und das entsprechende Massenspektrum generiert.

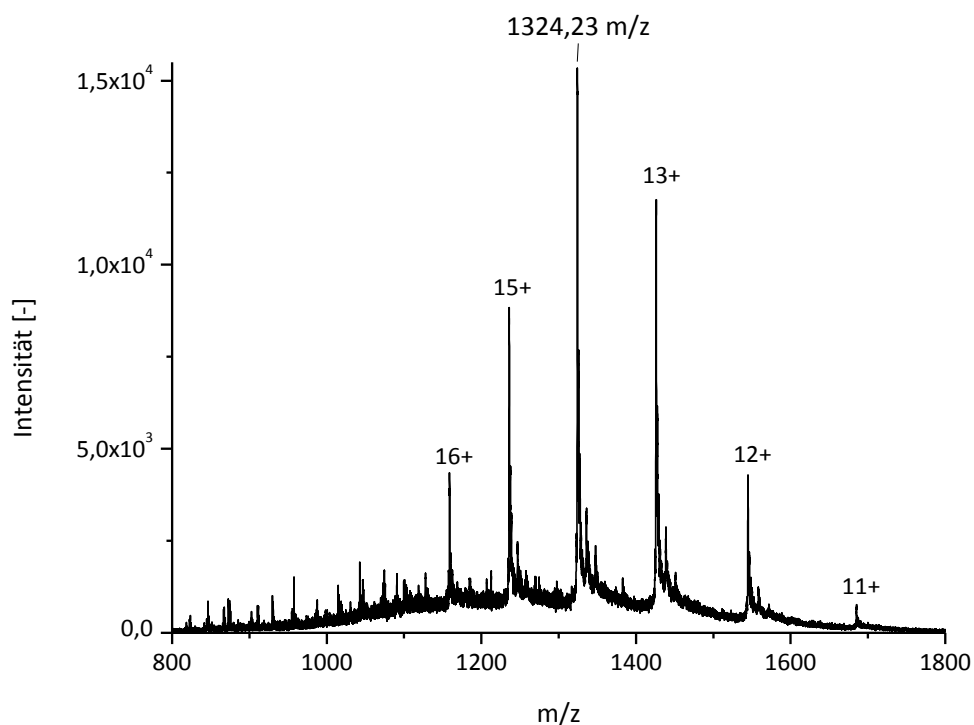


Abbildung 5.19: Massenspektrum von β -Lactoglobulin A (10^{-5} mol/L) nach Derivatisierung mit NBD-Cl

In dem Massenspektrum in Abbildung 5.19 ist die übliche Ladungsverteilung eines Proteins zu erkennen. Es sind mehrere Peaks je Ladungszustand zu sehen, was auf eine Derivatisierung des Proteins hindeutet. Allerdings sind keine Signale des nativen β -Lactoglobulins A zu erkennen, sodass das Protein fast vollständig mit dem Markierungsreagenz umgesetzt worden ist. Zur besseren Übersicht und um neutrale Spektren zu erhalten, wurde das Massenspektrum dekonvolviert und mit einem neutralen Massenspektrum des nativen β -

Lactoglobulins A verglichen. Dieser Vergleich ist in Abbildung 5.20 dargestellt.

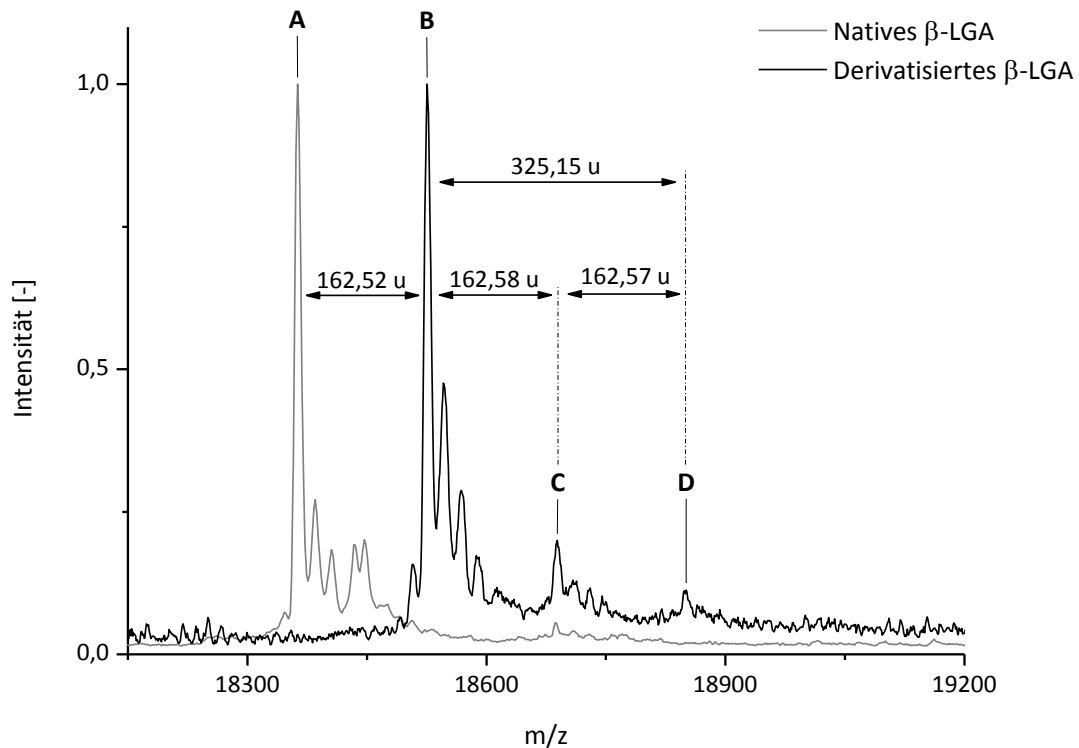


Abbildung 5.20: Massenspektrum des nativen (A) sowie des mit NBD-Cl derivatisierten β -Lactoglobulin A (B, C, D) nach Dekonvolierung

Der Vergleich des neutralen Massenspektrums des nativen β -LGA mit dem des derivatisierten Protein zeigt, dass kein freies Protein mehr vorliegt und stattdessen drei weitere Signale zu sehen sind. Durch die Massenunterschiede von etwa 162,6 u können die zusätzlichen Signale dem ein- bis dreifach derivatisiertem β -LGA zugeordnet werden (Tabelle 5.28). Somit ist eine Derivatisierung des β -LGA unter Abspaltung von HCl mit NBD-Cl erfolgt. Die HCl-Abspaltung erklärt den Unterschied von etwa 36 u zur Masse des freien Derivatisierungsreagenzes, welche 198,98 u beträgt.

Tabelle 5.28: Dekonvolvierte Massen, Massendifferenzen zur Masse des nativen β -LGA und die dazugehörigen Moleküle der derivatisierten Probenlösung

Signal	m [u]	m(X)-m(A) [u]	Molekül
A	18362,97	-/-	β -LGA
B	18525,49	162,52	NBD- β -LGA
C	18688,96	325,99	NBD ₂ - β -LGA
D	18850,64	487,67	NBD ₃ - β -LGA

Nach der bestätigten Umsetzung des Proteins und der Abtrennung der Derivatisierungsreagenzes kann das mit NBD-Cl derivatisierte β -Lactoglobulin A mit der in Abschnitt 5.3.3 beschriebenen CE-LIF-Methode analysiert werden. In Abbildung 5.21 ist ein Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse von β -LGA gezeigt.

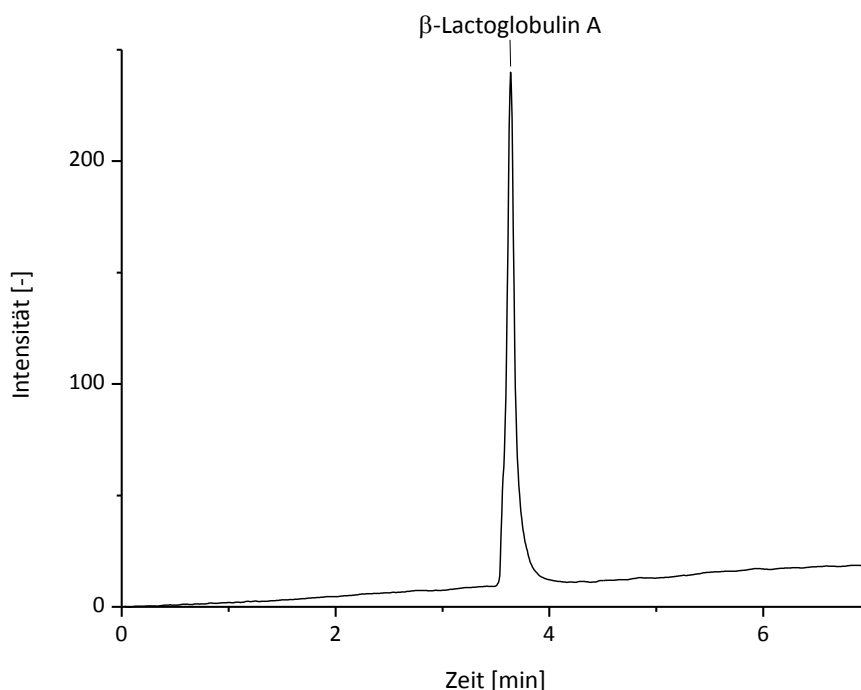


Abbildung 5.21: Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse von mit NBD-Cl derivatisierten β -Lactoglobulin A (10^{-6} mol/L)

In dem Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse vom derivatisierten β -LGA ist wie erwartet nur ein Signal mit einer Migrationszeit von 3,6 min zu sehen, da das NBD-Cl vollständig beim Entsalzen abgetrennt wurde und so kein NBD-OH detektiert werden kann. Damit die Leistungsfähigkeit für die Detektion des markierten Proteins mit anderen Systemen, wie dem CE-LIF-System auf Mikroskopbasis (Kapitel 3) verglichen werden kann, wurde die Nachweisgrenze über das Signal/Rausch-Verhältnis aus dem Elektropherogramm in Abbildung 5.21 abgeschätzt. Als Rauschen wurde die doppelte Standardabweichung der Basislinie in einem driftfreien Bereich berechnet. Für das markierte β -Lactoglobulin A kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von 900 angegeben werden. Somit beträgt die Nachweisgrenze ($S/N=3$) für das derivatisierte Protein $3,3 \cdot 10^{-9}$ mol/L und liegt damit etwa eine Dekade höher als für das mikroskopbasierte System (Abschnitt 3.3.3). Da für die mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuren ähnliche Nachweisgrenzen erhalten wurden (Tabelle 5.26), liegt dieser Unterschied hauptsächlich am Derivatisierungsreagenz. Das speziell für die Fluoreszenzdetektion entwickelte Oyster[®]-488 hat eine bessere Quantenausbeute und dessen Anregungsmaximum (504 nm) liegt nahe genug an der Wellenlänge des diodengepumpte Festkörperlasers (473 nm).

Es konnte also erfolgreich eine fast vollständige Umsetzung des β -LGA mit NBD-Cl durchgeführt und mittels CE/ESI-ToF-MS bestätigt werden. Außerdem konnte bei dem Entsalzungsvorgang das Derivatisierungsreagenz abgetrennt und eine CE-LIF-Analyse des umgesetzten Proteins mit einer Nachweisgrenze in nanomolaren Bereich durchgeführt werden.

5.3.11 Zusammenfassung und Ausblick der Analyse von Biomolekülen

In diesem Kapitel konnte die Umsetzung von sieben untersuchten Aminosäuren (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin) mit NBD-Cl gezeigt werden. Es wurde eine kapillarelektrophoretische Trennung entwickelt, mit welcher alle sieben Aminosäuren sowie das Derivatisierungsreagenz innerhalb von acht Minuten getrennt werden können. Für die CE-LIF-Analyse konnten gute Nachweisgrenzen im Bereich von $2,2$ bis $9,4 \cdot 10^{-8}$ mol/L erreicht werden. Diese Nachweisgrenzen sind vergleichbar mit denen des LIF-Systems auf Mikroskopbasis. Allerdings konnten die Vorteile der wellenlängen aufgelösten Fluoreszenzdetektion bei dieser Methode nur teilweise ausgenutzt werden. So ist eine Identifizierung der Aminosäurederivate aufgrund der ähnlichen Fluoreszenzspektren nicht möglich. Der frei wählbare Integrationsbereich verbessert jedoch die Empfindlichkeit und Verunreinigungen mit abweichenden Emissions-maxima können erkannt werden. Die Migrationsreihenfolge konnte mittels CE/ESI-ToF-MS bestätigt werden. Mit dieser Methode als Grundlage könnte eine Trennung mit anschließender LIF-Detektion für alle Aminosäuren entwickelt werden. Die Empfindlichkeit könnte mit einer Anpassung der Anregungswellenlänge des Lasers oder einer Optimierung der Derivatisierung mit beispielsweise NBD-F weiter verbessert werden.

Mit der Variabilität des kompakten LIF-Systems konnte eine HPLC-LIF-Methode zur Analyse der mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuren entwickelt werden. Allerdings konnten nur fünf der sieben untersuchten

Aminosäuren voneinander getrennt werden, da Arginin und Glycin nicht vom NBD-OH getrennt werden konnten. Mit einer Trenndauer von 20 min ist diese Trennung mehr als doppelt so lang wie die kapillarelektrophoretische, woran gut die Trenneffizienz der Kapillarelektrophorese verdeutlicht werden kann. Die Nachweisstärke des HPLC-LIF-Systems ist jedoch im Vergleich zum CE-LIF-System mit Nachweisgrenzen von $2,3 \cdot 10^{-10}$ mol/L bis $6,0 \cdot 10^{-9}$ mol/L besser. Ein Vergleich der Nachweisgrenzen mit einem kommerziellen Fluoreszenzdetektor zeigt, dass diejenigen des HPLC-LIF-Systems bis zu Faktor 129 niedriger sind. Auch hier konnte die Identifizierung nicht über die Fluoreszenzspektren erfolgen. Daher wurde die Retentionsreihenfolge mittels MS/MS-Detektion im Anschluss an die HPLC-LIF-Analyse verifiziert. Eine vollständige Trennung aller Aminosäurederivate kann vermutlich nicht über eine Anpassung des Gradienten oder der mobilen Phase erreicht werden, jedoch könnte dies mit einer anderen stationären Phase gelingen. So wurde bei dieser Methode eine C18-Phase genutzt, die vor allem gute Trenneigenschaften für unpolare Analyten besitzt. Ein Ansatz wäre die Trennung auf einer *polar embedded*-Säule oder einer HILIC-Phase, um eine bessere Trennung der polaren Analyten zu erhalten. Die bereits gute Nachweisstärke könnte ebenfalls durch die Anpassung der Anregungswellenlänge des Lasers weiter verbessert werden.

Nach der erfolgreichen Umsetzung von diversen Aminosäuren mit NBD-Cl konnte auch die Derivatisierung des Proteins β -Lactoglobulin A gezeigt werden. Mittels PD-10-Säulen (Größenausschlusschromatographie) wurde das Derivatisierungsreagenz erfolgreich abgetrennt. Die gelungene

Umsetzung konnte mittels CE/ESI-ToF-MS bestätigt werden. Dabei konnten ausschließlich ein- bis dreifach derivatisierte Addukte detektiert werden. Das umgesetzte Protein konnte mittels CE-LIF analysiert werden, wobei eine gute Nachweisgrenze von $3,3 \cdot 10^{-9}$ mol/L erzielt wurde. Auf Basis dieser Methode könnte eine kapillarelektrophoretische Trennung für die quantitative Analyse eines Proteingemisches entwickelt werden. Für eine höhere Empfindlichkeit könnte die Derivatisierung weiter optimiert werden, beispielsweise mit NBD-F oder größerem Reagenzüberschuss, so dass eine Mehrfachderivatisierung der Proteine vorliegt. Durch die Verwendung eines Derivatisierungsreagenzes mit einer höheren Quantenausbeute, welches speziell für die Fluoreszenzdetektion entwickelt wurde wie das Oyster[®]-488, könnte die Nachweisgrenze für die LIF-Detektion weiter gesenkt werden. Ebenso könnte die Anpassung der Anregungswellenlänge des Lasers die Nachweisstärke weiter verbessern.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Die laserinduzierte Fluoreszenzdetektion ist eine sehr sensitive Detektionsmethode. Dies konnte mit einer CE-LIF-Trennung an einem mikroskopbasierten Detektionssystem verdeutlicht werden. Dazu wurde β -Lactoglobulin A mit einem kommerziellen Derivatisierungsreagenz (Oyster[®]-488) umgesetzt. Die erfolgreiche Derivatisierung konnte mittels HPLC/ESI-ToF-MS nachgewiesen werden. Für die CE-LIF-Analyse des derivatisierten Proteins konnte eine Nachweisgrenze von $1,3 \cdot 10^{-10}$ mol/L erreicht werden. Allerdings wurden auch die Nachteile dieses Aufbaus deutlich. So ist die Systemgröße unhandlich, die verwendeten Bauteile teuer, der Autosampler kann nicht verwendet werden und die Flexibilität bezüglich der Anregungswellenlänge sowie der Einsatzmöglichkeiten ist sehr gering. Daher war es das Ziel, im Rahmen dieser Arbeit ein miniaturisiertes Detektionssystem für die laserinduzierte wellenlängen-aufgelöste Fluoreszenzdetektion zu entwickeln. Dabei sollte das neue Detektionssystem kompakt und somit variabel einsetzbar sein. Eine hohe Flexibilität bezüglich der Anregungswellenlänge sollte gegeben sein, sodass der Laser und weitere optische Bauteile schnell und einfach

getauscht werden können. Dennoch sollte auch das kompakte LIF-System die Vorteile der wellenlängenaufgelösten Detektion nutzen und eine vergleichbare Nachweisstärke aufweisen. Da die Kapillarelektrophorese technisch bedingt eine geringe Empfindlichkeit hat, sollte das Detektionssystem primär auf diese Anwendung ausgerichtet sein.

Die Entwicklung erfolgte in fünf Stufen. Dabei war der erste Prototyp sehr einfach aufgebaut und zwar ohne eine Filtereinheit und ohne eine Option, die Position der Glasfaser oder des Lasers zu ändern. Die Streustrahlung des Lasers gelangte zum Detektor und machte eine Fluoreszenzdetektion unmöglich.

Durch den Einsatz eines kleinen Emissionsfilters aus beschichtetem Kunststoff sowie einer kippbaren Lasereinheit konnte die Streustrahlung beim zweiten Prototypen größtenteils eliminiert werden. Allerdings konnte lediglich eine Nachweisgrenze von $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol/L für Oxazin-1 erreicht werden, welche somit im Bereich eines UV/Vis-Detektors liegt. Für eine Verbesserung der Empfindlichkeit sollte die Streustrahlung weiter verringert und die Ausbeute an detektierter Fluoreszenzstrahlung erhöht werden.

Im dritten Entwicklungsschritt konnte eine bikonvexe Sammellinse zur Fokussierung der Fluoreszenz, eine Linse zur Lenkung sowie weiteren Fokussierung des Laserstrahls und eine entlang der z-Achse positionierbare Glasfaserhalterung integriert werden. Nach den an der optischen Bank durchgeführten Optimierungen der optischen Bauteile (Filter, Linsen, Glasfaser) wurde eine gute Empfindlichkeit erreicht. Es

konnte eine Nachweisgrenze von $2 \cdot 10^{-8}$ mol/L für Oxazin-1 und ein drei Dekaden umfassender linearer dynamischer Bereich erzielt werden. Während einer intensiven Nutzung des LIF-Systems trat jedoch ein konzeptioneller Entwicklungsfehler auf. So kann die Hochspannung der CE über das Metallgehäuse in den Laser gelangen und die Laserdiode zerstören. Für die weitere Verbesserung der Empfindlichkeit sollten die Einstellmöglichkeiten des Systems sowie Linse weiter optimiert werden.

Um den Laser zu isolieren, wurde das Gehäuse des vierten Systems aus PEEK gefertigt und eine in x-, y- und z-Richtung positionierbare optische Einheit (Kugellinse, Emissionsfilter, Glasfaser) integriert. Durch den Einsatz einer asphärischen Linse konnte auf eine variable Linsenkomination verzichtet, der Abstand zur Kapillare verringert und stattdessen die Positioniermöglichkeit des Lasers in x- und z-Richtung erweitert werden. Mit diesen Erweiterungen und der verwendeten quadratischen Kapillare konnte die Streustrahlung weiter reduziert und für den Modellanalyten Oxazin-1 eine sehr gute Nachweisgrenze von $4 \cdot 10^{-10}$ mol/L erreicht werden. Um die Flexibilität des Systems bezüglich der Anregungswellenlänge zu steigern wurde ein Gehäuse für Laserdioden konstruiert, mit welchem der Einsatz leistungsstarker Dioden mit verschiedensten Wellenlängen (405 nm, 445 nm, 532 nm, 635 nm und 658 nm) möglich ist. Um die volle Leistungsfähigkeit der Wellenlängenauflösung ausnutzen zu können, wurde eine individuell angepasste Software (Specana) programmiert. Mit dieser Software kann der Integrationsbereich zur Erzeugung der Elektropherogramme frei gewählt und das Rauschen mittels eines gleitenden Mittelwerts geglättet

werden. Außerdem kann der vollständige Datensatz einer Messung in ein dreidimensionales Elektropherogramm umgewandelt werden. Auf diese Weise sind alle Informationen einfach und schnell zugänglich. Durch diese und weitere Optimierungen der Methode konnte für Coumarin 343 eine ausgezeichnete Nachweisgrenze von $5,3 \cdot 10^{-12}$ mol/L sowie ein linearer dynamischer Bereich von mehr als sechs Dekaden erreicht werden. Um die Variabilität nicht nur bezüglich der Anregungswellenlängen, sondern auch bezüglich der Einsatzmöglichkeiten des Detektionssystems zu erweitern, sollte ein Adapter entwickelt werden, der das Detektionssystem auch für die HPLC bzw. IC zugänglich macht.

Für die fünfte und endgültige Modellversion wurde ein modularer Adapter entwickelt, um dieses kompakte und leistungsfähige Detektionssystem auch anderen analytischen Trennmethoden zur Verfügung stellen zu können. Die modulare Bauweise erlaubt einen schnellen und einfachen Austausch des Adapters. Der HPLC-Adapter enthält eine Glaskapillare mit zwei Metallkappen, an welche die HPLC-Kapillaren mit Standardanschlüssen angeschlossen werden können. Das System bietet eine sehr hohe Trenneffizienz, Sensitivität und Selektivität für Fluorophore. Ebenso kann das Detektionssystem mit dem an der optischen Bank optimierten HPLC-Adapter als HPLC-LIF-System verwendet werden. Mit diesem HPLC-LIF-System konnte eine sehr gute Nachweisgrenze von $3 \cdot 10^{-12}$ mol/L für Coumarin 343 erzielt werden.

Zusammenfassend konnte die Miniaturisierung eines LIF-Systems zu einem kompakten Detektionssystem für die laserinduzierte,

wellenlängenaufgelöste Fluoreszenzdetektion erfolgreich abgeschlossen werden. Es konnte eine sehr hohe Variabilität bezüglich der Einsatzmöglichkeiten (CE, HPLC, IC) als auch der Anregungswellenlänge (405 nm, 445 nm, 532 nm, 635 nm und 658 nm) erreicht werden. Dazu können sowohl die Lasereinheit als auch der Emissionsfilter einfach und schnell gewechselt werden. Als nächstes sollte das Potential des Systems bezüglich kapillarelektrophoretischer und chromatographischer Trennungen evaluiert werden.

Die Leistungsfähigkeit des CE-LIF-Systems konnte an einer Trennung von sechs Rhodaminen (123, 800, 110, 6G, B und 19) innerhalb von 13 min aufgezeigt und die Vorteile einer wellenlängenaufgelösten Fluoreszenzdetektion verdeutlicht werden. Die aufgenommenen Spektren während einer Messung können mit der Software Specana eingelesen und in ein dreidimensionales Elektropherogramm umgewandelt werden. Die Analyten können auf diese Weise über ihre Fluoreszenzspektren identifiziert werden, sodass keine weiteren Messungen notwendig sind.

Die Trennung von vier Farbstoffen (Coumarin 30, Acridinorange, Coumarin 343 und 4-Dimethylamino-4'-nitrostilben) innerhalb von 9 min zeigt das Potential des HPLC-LIF/ESI-MS/MS-Systems auf. Mit der Verwendung zweier komplementärer Detektionstechniken konnten die Analyten mittels wellenlängenaufgelöster Fluoreszenzdetektion über die Spektren identifiziert werden. Zudem konnte die Zuordnung mittels MS/MS-Detektion verifiziert werden. Unter Verwendung der Auswertefunktionen von Specana konnten gute Nachweisgrenzen

zwischen $2,2 \cdot 10^{-11}$ mol/L (Coumarin 343) und $6,2 \cdot 10^{-8}$ mol/L (Nitrostilben) für die Fluoreszenzdetektion erzielt werden. Es ist also mit diesem System möglich, eine sichere Signalzuordnung mittels LIF- und MS/MS-Detektion und eine sehr sensitive Methode zu kombinieren.

In einer dritten Applikation wurde das LIF-Detektionssystem in Verbindung mit zwei verschiedenen Trenntechniken, HPLC und CE, angewendet und miteinander verglichen. Dazu wurden sieben Aminosäuren (L-Arginin, L-Lysin, D-Phenylalanin, L-Methionin, D-Alanin, DL-Serin und Glycin) mit NBD-Cl derivatisiert und analysiert. Es konnte eine kapillarelektrophoretische Trennung mit Nachweisgrenzen im Bereich von $2,2$ bis $9,4 \cdot 10^{-8}$ mol/L entwickelt werden, mit welcher alle sieben Aminosäuren sowie das Derivatisierungsreagenz innerhalb von acht Minuten getrennt werden können. Da die Aminosäurederivate aufgrund ihrer ähnlichen Fluoreszenzspektren nicht über diese identifiziert werden können, wurde die Migrationsreihenfolge mittels CE/ESI-ToF-MS ermittelt. Mit der Variabilität des kompakten LIF-Systems konnte eine HPLC-LIF-Methode zur Analyse der mit NBD-Cl derivatisierten Aminosäuren entwickelt werden. Allerdings konnten nur fünf der sieben untersuchten Aminosäuren innerhalb von 20 min voneinander getrennt werden. Die Nachweisstärke des HPLC-LIF-Systems ist im Vergleich zum CE-LIF-System mit Nachweisgrenzen von $2,3 \cdot 10^{-10}$ mol/L bis $6,0 \cdot 10^{-9}$ mol/L jedoch besser. Ein Vergleich der Nachweisgrenzen mit einem kommerziellen Fluoreszenzdetektor hat gezeigt, dass diejenigen des HPLC-LIF-Systems bis zu Faktor 129 niedriger sind. Die Retentionsreihenfolge konnte mittels MS/MS-Detektion im Anschluss an die HPLC-LIF-Analyse verifiziert

werden. Außerdem wurde β -Lactoglobulin A mit NBD-Cl umgesetzt, die Umsetzung mittels CE/ESI-ToF-MS überprüft und mittels CE-LIF analysiert, wobei eine Nachweisgrenze von $3,3 \cdot 10^{-9}$ mol/L erzielt wurde. Die Nachweisgrenzen der Analyse des Proteins bzw. der Aminosäuren sind vergleichbar mit denen des LIF-Systems auf Mikroskopbasis.

Zusammenfassend konnte das Potential des entwickelten Detektionssystems sowohl mit kapillarelektrophoretischen Methoden als auch mit flüssigchromatographischen belegt werden. Fluorophore können sehr sensitiv detektiert und über ihre Fluoreszenzspektren identifiziert werden. Eine massenspektrometrische Detektion im Anschluss liefert zusätzliche Informationen. Außerdem sind nicht fluoreszierende Analyten über eine Derivatisierung ebenfalls für die Fluoreszenzdetektion zugänglich.

6.2 Ausblick

In dieser Arbeit konnte das entwickelte Detektionssystem charakterisiert und dessen Leistungsfähigkeit veranschaulicht werden. Die erzielten Ergebnisse geben Anlass für zahlreiche interessante weiterführende Experimente, sodass diese Thematik ein großes Forschungspotential birgt.

Eine Weiterentwicklung des HPLC-LIF-Systems sollte in Zukunft erreicht werden. Im Gegensatz zum CE-Adapter, der eine reine Haltervorrichtung ist, ist der HPLC-Adapter die Schnittstelle zwischen der HPLC und dem Detektionssystem. Daher ist eine robuste Verbindung der Glaskapillare mit

den Metallanschlüssen besonders wichtig. Die bisher verwendete Klebung kann sich an beschädigten Stellen bei sehr unpolaren Laufmitteln auflösen. Hier sollte eine beständigere Klebung oder eine Dichtung eingesetzt werden. Eine geeignete Dichtung könnte die Bauteile verbinden und somit widerstandsfähig gegenüber unpolaren Lösungsmitteln sein. In Zusammenhang mit dieser Entwicklung sollte der HPLC-Adapter auch für höhere Flussraten verwendet werden können.

Da die fünfte Modellversion ein einsatzfähiges Detektionssystem für verschiedene Trenntechniken und Anregungswellenlängen ist, kann in Zukunft die Robustheit des Systems verbessert werden. Eine Möglichkeit zur Arretierung der eingestellten Positionen sollte eine versehentliche Verstellung verhindern und das System stabilisieren. Eine bessere Reproduzierbarkeit der Einstellungen und Orientierung könnte mit einer Skala an den positionierbaren Bauteilen verwirklicht werden. Die Handhabung und Nutzerfreundlichkeit spielte bei den bisherigen Prototypen eine untergeordnete Rolle, sollte jedoch mittelfristig angepasst werden. So könnte eine automatische Ausführung der Software Specana an die Software der CE oder HPLC gekoppelt werden. Mittels Specana kann zwar eine umfassende Auswertung der Daten ermöglicht werden, allerdings ist eine Weiterentwicklung der Software bezüglich einer komfortableren Handhabung möglich. Eine Automatisierung der Fokussierung bzw. der Positionierung mit einer Software auf die maximale Intensität ist ebenfalls vorstellbar. Die verstellbaren Linsen könnten ähnlich des Mechanismus eines optischen Laufwerks mittels Spulen bzw. Elektromagneten positioniert werden.

Obwohl die Flexibilität bezüglich der Anregungswellenlänge und auch der Einsatzmöglichkeit vergleichsweise hoch ist, wäre insbesondere der Einsatz eines UV-Lasers interessant. Mit einem UV-Laser und einer UV-transparenten Optik könnte native Fluoreszenz detektiert und eine Vielzahl an Verbindungen ohne vorherige Derivatisierung analysiert werden. Zur Zeit sind Laserdioden im UV-Bereich im Gegensatz zu UV-LEDs nicht kommerziell erhältlich. Bereits vorhanden ist eine 445 nm-Laserdiode mit einer optischen Ausgangsleistung von 1 W. Allerdings erfordert diese hohe Leistung eine effizientere Kühlung der Diode. Eine Abführung der Wärme über sogenannte *Heat-Pipes* und eine bessere Temperierung der Kassette könnte den Einsatz dieser Diode und somit eine höhere Sensitivität für in diesem Bereich anregbare Analyten ermöglichen. Der Einbau einer Photodiode als alleiniger oder zusätzlicher Detektor würde ein noch kompakteres und zudem deutlich kostengünstigeres System ermöglichen. Mit einer Photodiode kann zwar keine wellenlängenaufgelöste Detektion durchgeführt werden und die Sensitivität sollte deutlich schlechter sein, dennoch würde diese Konfiguration eine selektivere sowie sensitivere Alternative zum UV/Vis-Detektor darstellen. Eine weitere Einsatzmöglichkeit ergibt sich mit der Verwendung eines sehr schnell gepulsten Lasers. Mit einem entsprechend schnellen Spektrometer könnte eine zeitaufgelöste Detektion erfolgen. Es könnten auf diese Weise Fluoreszenzabklingkurven aufgenommen oder sogenannte *Gating*-Messungen durchgeführt werden. Dabei wird die emittierte Fluoreszenz erst nach dem Laserpuls gemessen, wodurch kaum Hintergrund- oder Streustrahlung die Detektion stört.

Das Potential dieser Detektionsmethode konnte an einigen Anwendungen gut verdeutlicht werden. Um in Zukunft eine schnelle Identifizierung einzelner Fluorophore in unbekanntem Proben zu ermöglichen, sollte eine Datenbank verschiedener Fluoreszenzspektren aufgebaut werden. Dabei kann ein breites Spektrum von beispielsweise pharmazeutischen Wirkstoffen mittels CE-LIF/(MS)- oder HPLC-LIF/(MS)-Methoden analysiert, identifiziert und quantifiziert werden.

Die kapillarelektrophoretische Trennung der derivatisierten Aminosäuren könnte als Grundlage für eine Methodenentwicklung zur Analyse und Quantifizierung aller Aminosäuren dienen. Dabei könnte die Effizienz der Umsetzung mit beispielsweise NBD-F weiter verbessert werden. Die flüssigchromatographische Trennung könnte mit einer anderen stationären Phase gelingen. Ein Ansatz wäre die Trennung auf einer *polar embedded*-Säule oder einer HILIC-Phase mit integrierten polaren Gruppen, um eine bessere Trennung von eher polaren Analyten zu erhalten. Auch eine Anpassung des Gradienten und der mobilen Phase müsste erfolgen. Allerdings wäre eine Aufklärung und Identifizierung der zahlreichen Nebenprodukte oder Verunreinigungen der Derivatisierung insbesondere beim Lysin notwendig.

Mit der CE-LIF-Analyse des β -LGA-Derivats konnte eine erfolgreiche Markierung und Analyse eines Proteins gezeigt werden. Auf Basis dieser Analyse könnte eine quantitative Methode zur Trennung eines derivatisierten Proteingemisches entwickelt werden. Dabei wäre es möglich, kommerzielle Markierungsreagenzien für die Fluoreszenz-

detektion zu nutzen oder kostengünstige Alternativen wie das NBD-Cl oder -F einzusetzen. Ein interessanter Ansatz wäre dabei die Markierung funktioneller Gruppen der Biomoleküle wie Thiole oder Amine mit unterschiedlichen Derivatisierungsreagenzien. Auf diese Weise könnten sogar Strukturinformationen gewonnen werden. Über die Fluoreszenzintensität könnte die Anzahl der entsprechenden Gruppen abgeschätzt werden. Mit weiteren Schritten wie dem tryptischen Verdau von Proteinen oder der Spaltung von Disulfidbrücken und einer anschließenden analytischen Trennung könnte eine Vielzahl an Informationen über die Analyten erhalten werden. So würden die Fluoreszenzspektren der unterschiedlichen eingesetzten Marker eine strukturelle Aufklärung neben den Migrations- oder Retentionszeiten des Analyten ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- [1] Pentoney, S. L., Jr., Sweedler, J. V., Landers, J. P. (Hrsg.), *Handbook of capillary electrophoresis*, CRC Press **1997**, Boca Raton (USA), 2. Auflage
- [2] Guzman, N. A., Park, S. S., Schaufelberger, D., Hernandez, L., Paez, X., Rada, P., Tomlinson, A., Naylor, S., *J. Chromatogr. B* **1997**, 697:37-66
- [3] Timperman, A. T., Sweedler, J. V., *Analyst* **1996**, 121:45-52
- [4] Hernández, L., Joshi, N., Verdeguer, P., Murzi, E., Mifsud, J. C., Guzman, N., *J. Chromatogr. A* **1993**, 652:399-405
- [5] Beale, S. C., *Anal. Chem.* **1998**, 70:279-300
- [6] Yeung, E. S., Kuhr, W. G., *Anal. Chem.* **1991**, 63:275A-282A
- [7] Götz, S., Karst, U., *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387:183-192
- [8] Xu, X., Li, L., Weber, S. G., *Trends Anal. Chem.* **2007**:126, 68-79
- [9] Nagaraj, S., Karnes, H. T., *Instrumentation Science & Technology* **2000**, 28:119-129
- [10] Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer **2006**, Luxemburg
- [11] Chen, D. Y., Adelhelm, K., Cheng, X. L., Dovichi, N. J., *Analyst* **1994**, 119:349-352
- [12] Götz, S., Revermann, T., Karst, U., *Lab on a chip* **2007**, 7:93-97
- [13] Zhang, X., Stuart, J. N., Sweedler, J. V., *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373:332-343
- [14] Götz, S., Karst, U., *Sensors. Actuat. B-Chem.* **2007**, 123:622-627
- [15] Jorgenson, J. W., Lukcs, K. D., *Anal. Chem.* **1981**, 53:1298-1302

- [16] Gey, M. H., *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, Springer **2008**, Luxemburg, 2. Auflage
- [17] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten*, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft **1994**, Wiesbaden
- [18] Simó, C., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2005**, 26:1306-1318
- [19] Kelly, J. F., Ramaley, L., Thibault, P., *Anal. Chem.* **1997**, 69:51-60
- [20] Smith, R. D., Barinaga, C. J., Udseth, H. R., *Anal. Chem.* **1988**, 60:1948-1952
- [21] Hommerson, P., Khan, A. M., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Mass Spec. Reviews* **2011**, 30:1096-1120
- [22] von Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E., *Electrophoresis* **2001**, 22:1251-1266
- [23] Maiman, T. H., *Nature* **1960**, 187:493-494
- [24] Müller, A., *Chemie in unserer Zeit* **1990**, 24:280-291
- [25] Stroppe, H., *Physik für Studenten der Natur- und Ingenieurwissenschaften*, Carl Hanser Verlag **2005**, München, 13. Auflage
- [26] Yang, B., Tan, F., Guan, Y., *LCGC North America* **2005**, 23:1110, 1112, 1114, 1116, 1118
- [27] Lange, W., *Einführung in die Laserphysik*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft **1994**, Darmstadt, 2. Auflage
- [28] Meschede, D., *Optik, Licht und Laser*, Vieweg+Teubner Verlag **2008**, Wiesbaden, 3. Auflage
- [29] Schindewolf, U., *Chemie in unserer Zeit* **1972**:6, 17-26
- [30] Melanson, J. E., Lucy, C. A., *Analyst* **2000**, 125:1049-1052
- [31] Kapon, E. (Hrsg.), *Semiconductor Lasers: Optics and Photonics*, Academic Press **1999**, San Diego California

- [32] Stokes, G. G., *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1852**, 142:463-562
- [33] Stokes, G. G., *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **1853**, 143:385-396
- [34] Camann, K. (Hrsg.), *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag **2001**, Heidelberg, 1. Auflage
- [35] Claussen, U., *Chemie in unserer Zeit* **1973**, 7:141-147
- [36] Heidel, A., *Adsorption optischer Aufheller aus Waschmitteln an Tonmineralen und tonorganischen Komplexen*, Diplomarbeit **2003**, Universität Trier
- [37] Rodat, A., Gavard, P., Couderc, F., *Biomedical Chromatography* **2009**, 23:42-47
- [38] Peng, X., Sternberg, E., Dolphin, D., *Electrophoresis* **2002**, 23:93-101
- [39] Wu, S., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr. A* **1989**, 480:141-155
- [40] Nguyen, D. C., Keller, R. A., Jett, J. H., Martin, J. C., *Anal. Chem.* **1987**, 59:2158-2161
- [41] Hernández, L., Escalona, J., Joshi, N., Guzman, N., *J. Chromatogr.* **1991**, 559:183-196
- [42] Yeung, E. S., Wang, P., Li, W., Giese, R. W., *J. Chromatogr.* **1992**, 608:73-77
- [43] Taylor, J. A., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* **1992**, 64:1741-1744
- [44] Turner, E. H., Lauterbach, K., Pugsley, H. R., Palmer, V. R., Dovichi, N. J., *Anal. Chem.* **2007**, 79:778-781
- [45] Lacroix, M., Poinso, V., Fournier, C., Couderc, F., *Electrophoresis* **2005**, 26:2608-2621
- [46] García-Campana, A. M., Taverna, M., Fabre, H., *Electrophoresis* **2007**, 28:208-232
- [47] Shan, J. W., Lang, D. B., Dimotakis, P. E., *Exp. Fluids* **2004**, 36:268-273
- [48] Schulze, P., Ludwig, M., Belder, D., *Electrophoresis* **2008**, 29:4894-4899

- [49] Revermann, T., Götz, S., Karst, U., *Electrophoresis* **2007**, 28:1154-1160
- [50] Gooijer, C., Mank, A. J. G., *Anal. Chim. Acta.* **1999**, 400:281-295
- [51] Yeung, E. S., Guzman, N. (Hrsg.), *Capillary Electrophoresis Technology*, Marcel Dekker **1993**, New York
- [52] Gooijer, C., Kok, S. J., Ariese, F., *Analisis* **2000**, 28:679-685
- [53] McWorther, S., Soper, S. A., *Electrophoresis* **2000**, 21:1267-1280
- [54] Williams, D. C., Soper, S. A., *Anal. Chem.* **1995**, 67:3427-3432
- [55] Schulze, P., Belder, D., *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393:515-525
- [56] Siméon, N., Myers, R., Bayle, C., Nertz, Stewart, J. K., Couderc, F., *J. Chromatogr. A* **2001**, 913:253-259
- [57] Johnson, M. E., Landers, J. P., *Electrophoresis* **2004**, 25:3513-3527
- [58] Timperman, A. T., Khatib, K., Sweedler, J. V., *Anal. Chem.* **1995**, 67:139-144
- [59] Bardelmeijer, H. A., Lingeman, H., de Ruiter, C., Underberg, W. J. M., *J. Chromatogr. A* **1998**, 807:3-26
- [60] Zhu, R., Kok, W. T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, 17:985-999
- [61] Waterval, J. C. M., Lingeman, H., Bult, A., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* **2000**, 21:4029-4045
- [62] Underberg, W. J. M., Waterval, J. C. M., *Electrophoresis* **2002**, 23:3922-3933
- [63] Soetebeer, U. B., Schierenberg, M. O., Möller, J. G., Schulz, H., Grunefeld, G., Andresen, P., Blaschke, G., Ahr, G., *J. Chromatogr. A* **2000**, 895:147-155
- [64] Möller, J. G., Stass, H., Heinig, R., Blaschke, G., *J. Chromatogr. B* **1998**, 716:325-334
- [65] Bannefeld, K. H., Stass, H., Blaschke, G., *J. Chromatogr. B* **1997**, 692:453-459

- [66] Giordano, B. C., Jin, L., Couch, A. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., *Anal. Chem.* **2004**, 76:4705-4714
- [67] Jemere, A. B., Oleschuk, R. D., Harrison, D. J., *Electrophoresis* **2003**, 24:3018-3025
- [68] Sandlin, Z. D., Shou, M., Shackman, J. G., Kennedy, R. T., *Anal. Chem.* **2005**, 77:7702-7708
- [69] Zinellu, A., Sotgia, S., Bastianina, S., Chessa, R., Gaspa, L., Franconi, F., Deiana, L., Carru, C., *Amino Acids* **2009**, 36:35-41
- [70] Lee, K. J., Mwongela, S. M., Kottegoda, S., Borland, L., Nelson, A. R., Sims, C. E., Allbritton, N. L., *Anal. Chem.* **2008**, 80:1620-1627
- [71] Lee, T. T., Yeung, E. S., *J. Chromatogr.* **1992**, 595:319-325
- [72] Timperman, A. T., Oldenburg, K. E., Sweedler, J. V., *Anal. Chem.* **1995**, 67:3421-3426
- [73] Albin, M., Weinberger, R., Sapp, E., Moring, S., *Anal. Chem.* **1991**, 63:417-422
- [74] Baraga, J. J., Rava, R. P., Taroni, P., Kittrell, C., Fitzmaurice, M., Feld, M. S., *Lasers Surg. Med.* **1990**, 10:245-261
- [75] Chen, R. F., *Analytical Letters* **1967**, 1:35-42
- [76] Paul, U. P., Li, L., Lee, M. L., Farnsworth, P. B., *Anal. Chem.* **2005**, 77:3690-3693
- [77] Chen, K. C., Muschik, G. M., Issaq, H. J., *Electrophoresis* **2000**, 21:2062-2066
- [78] Zhang, X., Sweedler, J. V., *Anal. Chem.* **2001**, 73:5620-5624
- [79] Schulze, P., Ludwig, M., Kohler, F., Belder, D., *Anal. Chem.* **2005**, 77:1325-1329
- [80] Lapainis, T., Scanlan, C., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V., *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387:97-105
- [81] Miller, K. J., Lytle, F. E., *J. Chromatogr.* **1993**, 648:245-250

- [82] Lieberwirth, U., Arden-Jacob, J., Drexhage, K. H., Herten, D. P., Müller, R., Neumann, M., Schulz, A., Siebert, S., Sagner, G., Klingel, S., Sauer, M., Wolfrum, J., *Anal. Chem.* **1998**, 70:4771-4779
- [83] Zhang, J. Z., Chen, D. Y., Wu, S., Harke, H. R., Dovichi, N. J., *Clinical Chemistry* **1991**, 37:1492-1496
- [84] Kok, S. J., Hoornweg, G. P., de Ridder, T., Brinkman, U. A. T., Velthorst, N. H., Gooijer, C., *J. Chromatogr. A* **1998**, 806:355-360
- [85] Kok, S. J., Isberg, I. C. K., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T., Velthorst, N. H., *Anal. Chim. Acta.* **1998**, 360:109-118
- [86] Sweedler, J. V., Bilhorn, R. B., Epperson, P. M., Sims, G. R., Denton, M. B., *Anal. Chem.* **1988**, 60:282A-291A
- [87] Sweedler, J. V., *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1993**, 24:59-98
- [88] Sweedler, J. V., Ratzlaff, K. L., Denton, M. B. (Hrsg.), *Charge-transfer devices in spectroscopy*, VCH **1994**, New York
- [89] Gauci, M. R., Vesey, G., Narai, J., Veal, D., Williams, K. L., Piper, J. A., *Cytometry* **1996**, 25:388-393
- [90] Sahnou, D. J., Feldmann, P. D., McCandliss, S. R., Mackey, E. F., *Rev. Sci. Instrum.* **1994**, 65:813-825
- [91] Khater, M. A., van Kampen, P., Costello, J. T., Monsnier, J. P., Kennedy, E. T., *Appl. Spectrosc.* **2001**, 55:1430-1433
- [92] Soetebeer, U. B., Schierenberg, M. O., Schulz, H., Grünefeld, G., Anresen, P., Blaschke, G., *J. Chromatogr. B* **2000**, 745:271-278
- [93] Hooper, S. W., Chaudhry, G. R. (Hrsg.), *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*, Dioscorides Press **1994**, Portland
- [94] Kok, S. J., Kristenson, E. M., Gooijer, C., Velthorst, N. H., Brinkman, U. A. T., *J. Chromatogr. A* **1997**, 771:331-341
- [95] Beekman, M. C., Lingeman, H., Brinkman, U. A. T., Gooijer, C., *J. Microcolumn Separations* **1999**, 11:347-352

- [96] Huhn, C., Pütz, M., Martin, N., Dahlenberg, R., Pyell, U., *Electrophoresis* **2005**, 26:2391-2401
- [97] Uhrínová, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrin, D., Sawyer, L., Barlow, P. N., *Biochemistry* **2000**, 39:3565-3574
- [98] Sienkiewicz, T., *Die Nahrung* **1981**, 25:329-334
- [99] Fotografien von www.picometrics.com, abgerufen am 31.01.2012
- [100] RASFF **2005**, *Alert notifications of the week 2005/16*, URL: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/reports/week16-2005_en.pdf, abgerufen am 03.08.2012
- [101] „Review of the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU“, *The EFSA Journal* **2005**, 263:2-71
- [102] Chen, H. S., *Forensic Science Journal* **2007**, 6:21-37
- [103] Sun, Y. B., Wen, Y. G., Yan, Y., Li, G. F., *J. Chromatogr. B* **2011**, 879:3943-3948
- [104] Müller, A., Weiss, S. C., Schulz, W., Seitz, W., Albert, R., Ruck, W. K. L., Weber, W. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24:659-666
- [105] Roscher, J., *Analytische Kopplungstechniken zur Untersuchung von Spurenbestandteilen in pharmazeutischen Proben*, Masterarbeit **2012**, Universität Münster
- [106] Christen, P., Jaussi, R., *Biochemie*, Springer **2005**, Luxemburg
- [107] Kaumkötter, M., *4-Chloro-7-nitro-2-oxo-1,3-diazol als Derivatisierungsreagenz für Aminosäuren und Proteine*, Abschlussarbeit **2010**, Universität Münster
- [108] Murray, G. M., Sepaniak, M. J., *J. Liq. Chromatogr.* **1983**, 6:931-938
- [109] Blau, K., King, G. S., *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Heyden & Son **1977**, Rheine, 1. Auflage
- [110] Uchiyama, S., Santa, T., Fukushima, T., Homma, H., Imai, K., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2165-2174
- [111] Ghosh, P. B., Whitehouse, M. W., *J. Med. Chem.* **1968**, 11:305-311

Publikationsliste

PUBLIKATIONEN

Bomke, S.; Seiwert, B.; Dudek, L.; Effkemann, S.; Karst, U.
“Liquid chromatography/mass spectrometry method for the determination of biogenic amines in food samples”
Anal. Bioanal. Chem. **393** 247-256 (2009)

BEITRÄGE AUF WISSENSCHAFTLICHEN VERANSTALTUNGEN

Dudek, L.; Karst, U. „Wellenlängenaufgelöste, laserinduzierte Fluoreszenzdetektion für die Kapillarelektrophorese“
CE-Forum 2010, **12.-13. 10.2010**, Forschungszentrum Jülich.

Dudek, L.; Kießhauer, M.; Karst, U. „Wellenlängenaufgelöste, laserinduzierte Fluoreszenzdetektion für die Kapillarelektrophorese“
Anakon 2011, **22.-25.03.2011**, ETH Zürich.

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
AcN	Acetonitril
amu	Atommasseneinheit, engl. <i>atomic mass unit</i>
CCD	<i>charge-coupled-device</i>
CE	Kapillarelektrophorese, engl. <i>capillary electrophoresis</i>
CNF	Carboxynaphthofluorescein
DAD	Diodenarraydetektor
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assays
engl.	englisch
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrosprayionisation
f	Brennweite
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IC	Ionenchromatographie
iCCD	<i>intensified charge-coupled-device</i>
iPDA	<i>intensified</i> Photodiodenarray
K_m	Michaeliskonstante
LASER	<i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	Leuchtdiode, engl. <i>light-emitting diode</i>

LIF	laserinduzierte Fluoreszenzdetektion
mbar	Millibar
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometer
NA	numerische Apertur
NBD-Cl	4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
Nitrostilben	4-Dimethylamino-4'-nitrostilben
NWG	Nachweisgrenze
∅	Durchmesser
PDA	Photodiodenarray
PMT	Photomultiplier, engl. <i>photo multiplier tube</i>
RSD	relative Standardabweichung, engl. <i>relative standard deviation</i>
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis, engl. <i>signal-to-noise ratio</i>
SD	Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
SRM	<i>single reaction monitoring</i>
TE	thermoelektrisch
ToF	Flugzeit, engl. <i>time of flight</i>
UV	Ultraviolett
Vis	visuell (Licht des sichtbaren Spektralbereichs)
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
β -LGA	β -Lactoglobulin A
λ_{em}	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{em, max}}$	maximale Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
$\lambda_{\text{ex, max}}$	maximale Anregungswellenlänge

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Promotionszeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Uwe Karst für die Möglichkeit zur Promotion danken. Es war schön an diesem facettenreichen Thema forschen zu können. Die technische Thematik ermöglichte mir meinen Horizont in vielen Bereichen zu erweitern und Interessantes zu lernen.

Besonders danke ich Dipl.-Ing. Michael Kießhauer für seinen Rat, seine Unterstützung und Anregungen in allen technischen und elektronischen Angelegenheiten. Danke auch für die kurzweiligen Stunden in der Werkstatt sowie die Programmierung von Specana.

Weiterhin möchte ich mich bei dem Team der feinmechanischen Werkstatt des Institutes für Anorganische und Analytische Chemie bedanken. Hervorzuheben sind dabei Manfred Krause und Lino von Heynitz, die nicht nur die technische Umsetzung realisierten sondern auch maßgeblich an der Entwicklung beteiligt waren. Außerdem danke ich Dieter Holthaus für die immer schnelle Hilfe und die Zusammenstellung der optischen Bank.

Des Weiteren gilt mein Dank Jürgen Berendes und Peter Holle, den beiden Glasbläsern des Institutes für Anorganische und Analytische Chemie, für die Anfertigungen der Glaskapillaren.

Bedanken möchte ich mich für die gemeinsame Zeit auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises.

Besonders Marianne Lüttmann danke ich für die vielen kleinen Dinge im Hintergrund und den steten Kampf gegen die Amtsmühlen.

Bei Rasmus Janzen möchte ich mich für die gemeinsame Zeit in E 2.19 und das gemeinsame exotische Dasein als sogenannte Einzelkämpfer der technischen Entwicklung im Bastlerlabor bedanken.

Meinem designierten Nachfolger Jörg Roscher danke ich für die Zusammenarbeit bei meinen letzten Messungen der Farbstoffe und Rhodamine.

Ein besonders großer und herzlicher Dank gilt Miriam Schwarzer für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie das Heranführen an von mir weniger genutzte analytische Methoden wie LC/MS und die Proteinanalytik.

Zu guter Letzt möchte ich mich besonders herzlich bei den Menschen bedanken, die mir persönlich sehr viel bedeuten, meinen Eltern. Danke, dass ihr mich immer unterstützt und an mich geglaubt habt.

Lebenslauf