

**Entwicklung nachweisstarker molekülspektrometrischer  
Detektionssysteme unter Verwendung von Diodenlasern für die  
Kapillarelektrophorese und verwandte Trennmethode**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Natalia Ragozina**  
aus Moskau

Marburg/Lahn 2003

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 18. Juni 2003 angenommen

Erstgutachter:

Frau PD Dr. Ute Pyell

Zweitgutachter:

Herr Prof. Dr. Andreas Seubert

Tag der mündlichen Prüfung

16. Juli 2003

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	3
<b>3</b>	<b>Grundlagen der elektrophoretischen Trennung</b>	4
	3.1 <i>Elektrophoretische Mobilität</i>	4
	3.2 <i>Elektroosmotischer Fluß (EOF)</i>	5
	3.3 <i>Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)</i>	8
	3.4 <i>Chromatographische Trenngrößen</i>	9
	3.5 <i>Aufbau einer Kapillarelektrophoreseapparatur am Beispiel des SpectraPhORESIS100-Systems (TSP100) der Firma ThermoQuest</i>	11
	3.6 <i>Detektionsverfahren in der Kapillarelektrophorese</i>	13
	3.6.1 Photometrische Detektion	14
	3.6.2 Fluoreszenzdetektion	15
	3.6.3 Photothermische Verfahren	16
	3.6.3.1 Thermische Linse (TL), Prinzip und Signalerfassung	19
	3.6.3.2 Fernfeld- und Nahfeld-Thermische-Linse	22
	3.6.3.3 Die Rolle des Mediums bei der Thermischen-Linse-Detektion	22
	3.6.4 Indirekte Detektionsmethoden in der CE	25
	3.6.4.1 Theoretische Grundlagen der indirekten photometrischen Detektion	25
	3.6.4.2 Optimierung der Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten bei den indirekten Detektionsmethoden	27
	3.6.4.3 Indirekte Fluoreszenzdetektion	29
<b>4</b>	<b>Indirekte Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion bei der Bestimmung von kleinen anorganischen Anionen</b>	32
	4.1 <i>Verwendeter Hintergrundelektrolyt</i>	34

4.2	<i>Entwicklung einer indirekten photometrischen Detektionsmethode zur Bestimmung von acht Anionen</i>	36
4.3	<i>Entwicklung einer indirekten laserinduzierten fluorimetrischen Detektionsmethode zur Bestimmung von Anionen</i>	42
4.3.1	Experimenteller Aufbau	42
4.3.2	Trennung von Azid- und Thiocyanat-Ionen unter Verwendung eines Ampholyten zur Pufferung des Trennmediums	44
4.3.3	Trennung von fünf Anionen unter Verwendung von HDB als EOF-Modifizier	47
4.3.4	Trennung von vier Anionen unter Verwendung von CTAB als EOF-Modifizier	50
4.3.5	Trennung von acht Anionen unter Verwendung einer durch kovalent fixiertes Polymer innenbeschichteten Kapillare	53
4.3.6	Photometrische Bestimmung von acht Anionen in einer mit Polyacrylamid innenbeschichteten Kapillare	58
4.3.7	Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen für ausgewählte Anionen	59
4.3.8	Übertragbarkeit der Methode auf Realproben	61
<b>5</b>	<b>Entwicklung eines kompakten und robusten Nahfeld-Thermische-Linse-Kapillarelektrophorese-Detektors zur Detektion im tiefen UV</b>	<b>67</b>
5.1	<i>Einleitung</i>	67
5.2	<i>Aufbau des Thermische-Linse-CE-Detektors</i>	67
5.2.1	Mechanik und Optik	69
5.2.2	Elektronische Messwerterfassung	70
5.3	<i>Charakterisierung des Thermische-Linse-Detektors</i>	71
5.3.1	Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung	72
5.3.2	Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz	73
5.3.3	Abhängigkeit des TL-Signals von der Fließgeschwindigkeit des EOF sowie von der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten (1,3-DNB)	75

<b>6</b>	<b>Trennung und Bestimmung von Nitroverbindungen und ihrer Metabolite bzw. Nebenprodukte mit Hilfe MEKC-NFTL-Detektion</b>	<b>78</b>
6.1	<i>Gefährdungspotentiale von Sprengstoffen</i>	78
6.2	<i>Analytische Trenn- und Bestimmungsmethoden</i>	79
6.3	<i>Struktureller Aufbau und Absorptionsspektren der untersuchen Stoffe</i>	80
6.4	<i>Trennung und Bestimmung von 15 Nitroverbindungen mit Hilfe des MEKC-NFTL-Detektors</i>	82
6.5	<i>Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen</i>	89
6.6	<i>Übertragbarkeit der Methode auf Realproben</i>	90
<b>7</b>	<b>Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Trennmethode mit Thermischer-Linse-Detektion für die Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat in Blutplasma</b>	<b>93</b>
7.1	<i>Einleitung und Aufgabenstellung</i>	93
7.2	<i>Struktureller Aufbau und Wirkungsweise der untersuchten Zytostatika</i>	94
7.2.1	Etoposid und Teniposid	94
7.2.2	Etoposidphosphat	95
7.3	<i>Analytische Bestimmungsmethoden von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid</i>	96
7.4	<i>Kapillarelektrophoretische Trennung von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid mit photometrischer UV-Detektion</i>	97
7.4.1	Absorptionsspektren von Etoposid und Teniposid	98
7.4.2	Optimierung der Trennbedingungen bei der Bestimmung der Zytostatika	99
7.5	<i>Kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat unter Verwendung des NFTL-Detektors</i>	102
7.5.1	Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung bei der Bestimmung der Zytostatika	102
7.5.2	Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz bei der Bestimmung der Zytostatika	103
7.5.3	Abhängigkeit des TL-Signals von der Wanderungsgeschwindigkeit der untersuchten Zytostatika	105

7.5.4	Bestimmung von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid mit dem TL-Detektor nach MEKC-Trennung	106
7.5.5	Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen für die untersuchten Zytostatika	110
7.5.6	Übertragbarkeit der Methode auf Realproben	111
7.5.7	Probenvorbereitungsmethode 1	112
7.5.8	Probenvorbereitungsmethode 2	115
7.6	<i>Bestimmung von Etoposidphosphat mit Hilfe der fluorimetrischen Detektion</i>	118
<b>8</b>	<b>Nachweisstarke thermo-optische Detektion bei der kapillarelektro-phoretischen Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin in Blutplasma</b>	121
8.1	<i>Einleitung und Aufgabenstellung</i>	121
8.2	<i>Struktureller Aufbau, Wirkungsweise und Absorptionsspektren der untersuchten SSRIs</i>	122
8.3	<i>Absorptionsspektren von Fluoxetin und Fluvoxamin</i>	123
8.4	<i>Analytische Trenn- und Bestimmungsmethoden für Fluoxetin und Fluvoxamin</i>	124
8.5	<i>Kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin unter Verwendung photometrischer UV-Detektion</i>	126
8.6	<i>Kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin unter Verwendung des NFTL-Detektors</i>	127
8.6.1	Abhängigkeit der TL-Signalintensität von der Wanderungsgeschwindigkeit der untersuchten Antidepressiva	127
8.6.2	Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit Hilfe des NFTL-Detektors	129
8.6.3	Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen für die untersuchten Psychopharmaka	131
8.7	<i>Optimierung der Trennbedingungen bei der Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin</i>	132
8.8	<i>Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit organisch/wässrigen Trennpuffern</i>	137
8.9	<i>Übertragbarkeit der entwickelten Methode auf Realproben</i>	141

8.10	<i>Untersuchung des Effekts mangelnder Übereinstimmung des Verhältnisses der Signalhöhen für Fluoxetin und Fluvoxamin bei der Thermische-Linse-Detektion mit dem Extinktions-Verhältnis in den Absorptionsspektren</i>	143
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	147
<b>10</b>	<b>Literatur</b>	150
<b>11</b>	<b>Anhang</b>	161
11.1	<i>Verwendete Abkürzungen</i>	161
11.1.2	<i>Abkürzungen der untersuchten Nitroaromaten</i>	162
11.2	<i>Verwendete Chemikalien</i>	163
11.3	<i>Verwendete Geräte und Software</i>	165
11.3.1	<i>CE-System 1</i>	165
11.3.2	<i>CE-System 2</i>	166
11.3.3	<i>Andere Systeme</i>	166
11.4	<i>Konditionierung der Trennkapillare vor der ersten und nach der letzten Messung</i>	167

## 1 Einleitung

In den letzten 20 Jahren sind viele neue Trennmethode entwickelt und optimiert worden. Eine davon ist die Kapillarelektrophorese (CE) – ein Trennverfahren, dessen Bedeutung immer weiter zunimmt. Die Grundlagen für die Entwicklung der Kapillarelektrophorese wurden bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts von *Tiselius* [1] durch die Einführung der *Moving-Boundary*-Elektrophorese geschaffen. Dennoch wurde die eigentliche Entwicklung der CE erst durch die Pionierarbeiten von *Mikkers* und *Everaerts* [2, 3], sowie von *Jorgenson* und *Lukacs* [4, 5] ermöglicht. Der Durchbruch der Methode wurde durch den Einsatz von Quarzkapillaren mit gleichmäßig kleinen Innendurchmessern und hoher UV-Transparenz erreicht. Dadurch konnten Trennleistungen von  $10^4$  –  $10^7$  theoretischen Böden realisiert, und die Detektion der getrennten Substanzen konnte direkt in der Kapillare durchgeführt werden [6]. Das Gebiet der DNA-Analytik erschloß die Einführung von Gelen als Trennmedien in oberflächenmodifizierten Kapillaren [7]. Die Trennung von ungeladenen Spezies durch CE haben *Terabe et al.* [8] im Jahre 1984 mit der Einführung der Mizellaren Elektrokinetischen Kapillarchromatographie (MEKC) möglich gemacht.

Kapillarelektroseparative Methoden (CE, MEKC und weitere auf elektrokinetischen Phänomenen basierende Trenntechniken) sind für viele Einsatzgebiete wegen ihrer Leistungsfähigkeit und der zu herkömmlichen chromatographischen Methoden orthogonalen Selektivität interessant. Nachteilig ist jedoch das geringe Detektionsvolumen, das sich bei vielen Detektionsmethoden ungünstig auswirkt. Die Detektion mit einem photometrischen Detektor ist die Standarddetektionsmethode in der CE und in allen kommerziell erhältlichen Geräten integriert. In der Zwischenzeit wurden viele andere Möglichkeiten für die Detektion direkt in der Kapillare (on-column) und durch Kopplung an das Kapillarende entwickelt, unter anderem Fluoreszenzdetektion, Leitfähigkeitsdetektion und massenspektrometrische Detektion.

Eine sehr nachweisstarke Möglichkeit zur direkten Detektion in der Kapillare ist die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion (LIF-detektion). Der Einsatz von leistungsfähigen Lasern ermöglicht die präzise Fokussierung der Lichtenergie in die Kapillare, was sich günstig auf die Nachweisstärke für die fluoreszierende Analyte



auswirkt. Zudem spielt die Leistungsstabilität des Lasers bei indirekter Detektion eine entscheidende Rolle.

Trotz der unbestreitbaren Vorteile der massenspektrometrischen und der LIF-Detektion werden weitere Detektionsmethoden für die CE erprobt, vor allem Methoden mit den gleichen Einsatzmöglichkeiten wie bei einem absorptionsspektrometrischen Detektor, jedoch mit einer höheren Nachweisstärke. Die photothermischen Verfahren, insbesondere die Nahfeld-Thermische-Linse-Detektion (NFTLD), stellen für die Detektion nichtfluoreszierender Analyte in kleinen Volumina eine interessante Alternative zur üblichen absorptionsspektrometrischen Detektion dar.

Die photothermischen Verfahren beruhen auf der Umwandlung der Energie elektromagnetischer Strahlung in Wärme. Nach der Absorption der Lichtstrahlung von den Analytmolekülen kann die absorbierte Energie auf verschiedenen Wegen wieder abgegeben werden. Entscheidend für das Auftreten der photothermischen Effekte ist die Stoßrelaxation. Die absorbierte Energie wird dabei strahlungslos in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Aufgrund der Lichtabsorption und der strahlungslosen Desaktivierung kommt es zur Ausbildung eines Temperaturprofils entsprechend der Intensitätsverteilung des Anregungslichtstrahls, der Wärmediffusion und der chemisch-physikalischen Probeeigenschaften. Die Einteilung der verschiedenen photothermischen Verfahren erfolgt nach den unterschiedlichen Methoden, mit denen dieser Effekt detektiert wird.

Jedoch gibt es einige Analytgruppen, zum Beispiel kleine anorganische Anionen, die nur sehr geringe oder gar keine Absorption im UV- und VIS-Bereich aufweisen. Daher lassen sie sich nicht mit den oben beschriebenen Detektionsverfahren (abgesehen von der Leitfähigkeitsdetektion) detektieren. In solchen Fällen werden indirekte Absorption-, Fluoreszenz- oder Laser-induzierte-Fluoreszenzdetektion ausgenutzt. Dabei wird der Pufferlösung ein absorbierender oder fluoreszierender Hintergrundpufferbestandteil zugefügt. Erfolgt eine Verdrängung des kationischen oder anionischen Hintergrundpufferbestandteils (Sondenion) durch Analytionen, kommt es an dieser Stelle zur einer geringeren Absorption oder Fluoreszenz des Puffers und es wird ein negativer Peak beobachtet.

## **2 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung, Charakterisierung und Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten nachweisstarker Laser-Detektionssysteme (photothermisch und fluorimetrisch) für die Kapillarelektrophorese und deren Gegenüberstellung mit den konventionellen optischen Detektionssystemen (spektrophotometrisch).

Dabei sollte eine indirekte Laser-induzierte Fluoreszenzdetektionsmethode unter Verwendung einer frequenzverdoppelten Laserdiode für die Bestimmung von kleinen anorganischen Anionen entwickelt und ihre Übertragbarkeit auf reale matrixbehaftete Proben überprüft werden. Außerdem sollte ein Vergleich der entwickelten Detektionsmethode mit der indirekten photometrischen Detektion angestellt werden.

Da die Nahfeld-Thermische-Linse (NFTL) als Detektionsprinzip in der Kapillarelektrophorese nur selten beschrieben worden ist, insbesondere bei den zur Zeit aktuellen Aufgabenstellungen im Bereich der klinischen oder umweltbezogenen Analytik, soll diese neue Detektionsmethode charakterisiert und optimiert werden, sowie ihre Eignung für die Lösung von aktuellen analytischen Problemen überprüft werden.

Zu diesem Zweck sollte zuerst eine Anwendung der CE ausgewählt werden, mit schon bekannten und optimierten Trennbedingungen. Der vorher realisierte Nahfeld-Thermische-Linse-Messkopf sollte für die Detektion bei dieser Trennung eingesetzt werden und hinsichtlich seiner Parameter optimiert werden.

Ein anderes Problem sind mangelhafte Erfahrungen bei der Analyse von matrixbehafteten Proben. Daher soll die Übertragbarkeit der Methode auf Realproben am Beispiel einer Sickerwasserprobe überprüft werden.

Schließlich ist es von Bedeutung, aktuelle Anwendungsgebiete, wie zum Beispiel im Bereich der klinischen Analytik, für die Thermische-Linse-Detektion zu erschließen und ihre Vorteile im Vergleich mit anderen Techniken zu erfassen. Dafür sollten solche Anwendungen ausgewählt werden, bei denen niedrige Arzneimittelkonzentrationen in stark matrixbehafteten Proben wie Blut und Urin

erfaßt werden müssen. Die erzielten Ergebnisse sollen mit den Ergebnissen, die mit einem UV-VIS-Detektor ermittelt worden sind, verglichen werden.

### 3 Grundlagen der elektrophoretischen Trennung

#### 3.1 Elektrophoretische Mobilität

In einem elektrischen Feld wandern geladene Teilchen in einem reibenden Medium mit einer konstanten Geschwindigkeit. Geschwindigkeit und Richtung dieses als Elektrophorese bezeichneten Vorgangs sind dabei von der Ladung und der Größe der Teilchen abhängig.

In einer Lösung, an die ein homogenes elektrisches Feld angelegt wird, werden die geladenen Teilchen beschleunigt und gleichzeitig durch Reibungskraft abgebremst. Durch Gleichsetzen dieser Kräfte wird Gleichung (1) erhalten. Im Gleichgewicht ist die vektorielle Summe dieser Kräfte Null, und es resultiert für jedes Ion eine konstante Wanderungsgeschwindigkeit  $v$ .

$$q \cdot E = -6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (1)$$

$q$  = Ionenladung

$E$  = elektrische Feldstärke

$\eta$  = Viskosität der Lösung

$r$  = hydrodynamischer Ionenradius

Die elektrische Feldstärke (homogenes elektrisches Feld) ist dabei eine Funktion der zwischen zwei Elektroden anliegenden Spannung  $U$  und der Gesamtkapillarlänge  $L_{Ges}$ .

$$E = \frac{U}{L_{Ges}} \quad (2)$$

Durch Normierung auf die elektrische Feldstärke aus Gleichung (1) wird eine stoffspezifische Größe, nämlich die elektrophoretische Mobilität  $\mu$  erhalten.

$$|\mathbf{m}| = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi \cdot \mathbf{h} \cdot r} \quad (3)$$

### 3.2 Elektroosmotischer Fluß (EOF)

Die Elektroosmose verursacht einen Fluß der Pufferlösung im elektrischen Feld, wobei dieser sogenannte elektroosmotische Fluß (EOF) die elektrophoretische Wanderung der Ionen in der Lösung überlagert. Im Falle üblicher experimenteller Anordnungen für die CE und die MEKC entsteht der elektroosmotische Fluß durch Ladungsverteilungen in der Lösung in der Nähe der Kapillaroberfläche. In wäßriger Lösung besitzen Festkörperoberflächen meist eine negative Überschußladung, die auf Protonierungs/Deprotonierungsgleichgewichte oder auf die Adsorption von Anionen zurückzuführen ist. Im Fall von Quarzglas kapillaren bei einem pH-Wert oberhalb von 4 ist die Deprotonierung endständiger Silanolgruppen für die negative Oberflächenladung verantwortlich. Die unter diesen Bedingungen resultierenden elektrostatischen Kräfte führen zu einer Attraktion von Kationen aus der Pufferlösung.

Nach der Theorie von *Stern*, bildet sich eine Doppelschicht aus, die eine starre und eine diffuse Schicht einbezieht (Abbildung 1). Die starre Grenzschicht (*Stern-* oder *Helmholtz-Schicht*) besteht aus Ionen und Lösungsmittelmolekülen, die an der Oberfläche der Kapillare fest adsorbiert sind. Die diffuse Schicht (*Gouy-Chapman-Schicht*) enthält eine positive Überschußladung aus beweglichen Ionen. Die Abnahme des elektrischen Potentials erfolgt in der starren Schicht linear und in der diffusen Schicht exponential. Das Potential an der Grenzfläche zwischen starrer und diffuser Schicht ist für die Elektroosmose verantwortlich und wird als elektrokinetisches Zeta-Potential bezeichnet.

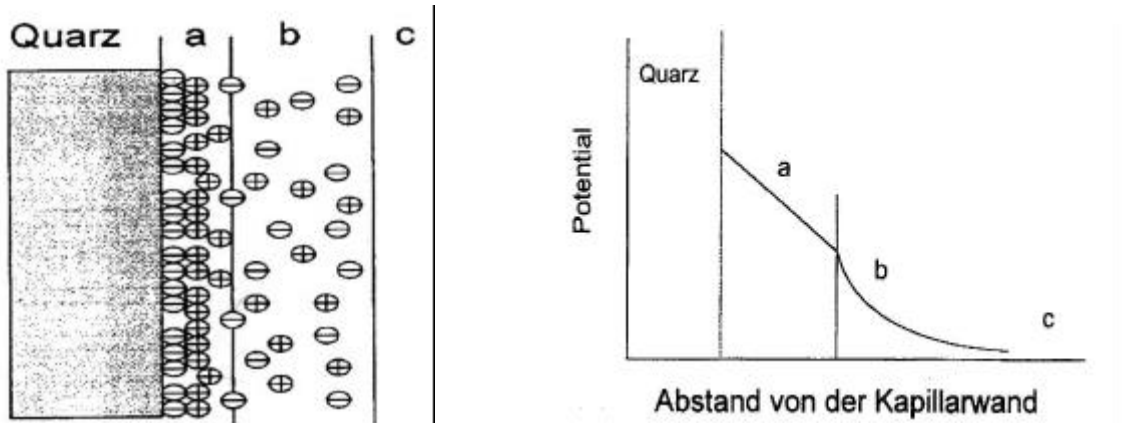


Abbildung 1: Ladungsverteilung in der Oberfläche des Quarzkapillare, Ausbildung des  $z$ -Potentials sowie die Abnahme des  $z$ -Potentials an der Grenzfläche Puffer/Quarz. **a**: starre Grenzschicht mit adsorbierten Ionen; **b**: diffuse Grenzschicht; **c**: Trennelektrolyt [9].

Wird nun auf die Kapillare ein elektrisches Feld angelegt, werden die Kationen aus der diffusen Schicht in Richtung der negativen Elektrode angezogen. Aufgrund ihrer Reibung mit der Pufferlösung in der Kapillare resultiert eine Bewegung des gesamten Elektrolyten in Richtung der Kathode. Auf diese Weise wird ein flaches Flußprofil ausgebildet, welches zu wesentlich geringeren Bandenverbreiterungen als das parabolische Flußprofil bei hydrodynamischen Flüssen führt [9]

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit des so erzeugten EOF von der angelegten Feldstärke ergibt sich aus der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung.

$$v_{eo} = \frac{\mathbf{e} \cdot E \cdot \mathbf{z}}{4\mathbf{p} \cdot \mathbf{h}} = \frac{\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{e}_r \cdot E \cdot \mathbf{z}}{\mathbf{h}} \quad (4)$$

$v_{eo}$  = elektroosmotische Strömungsgeschwindigkeit

$\epsilon$  = elektrische Durchlässigkeit

$\epsilon_0$  = elektrische Feldkonstante

$\epsilon_r$  = Dielektrizitätskonstante

$\zeta$  = elektrokinetisches Potential

Aus der Gleichung (4) ergibt sich daher für die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{eo}$ :

$$\mathbf{m}_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{\mathbf{e} \cdot \mathbf{z}}{4\mathbf{p} \cdot \mathbf{h}} = \frac{\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{e}_r \cdot \mathbf{z}}{\mathbf{h}} \quad (5)$$

Die Höhe des Zeta-Potentials wird von zahlreichen experimentellen Parametern geprägt, die zur Beeinflussung des EOF verwendet werden können. Zur Modifizierung, Unterdrückung oder Umkehrung des EOF werden verschiedene Verfahren eingesetzt, zum einen beispielsweise die Verwendung von Kapillarwandbelegungsreagenzien, zum anderen die Änderung des Deprotonierungsgrades der Kapillaroberfläche. Bei Quarzglaskapillaren sinkt die Geschwindigkeit des EOF mit steigender Ionenstärke durch die damit verbundene Verkleinerung des Zeta-Potentials, wächst jedoch mit dem Dissoziationsgrad der Oberflächensilanolgruppen, d.h. mit steigendem pH-Wert.

In Tabelle 1 sind die verschiedenen Modifikationsmöglichkeiten des EOF zusammengefaßt.

*Tabelle 1: Verschiedene Modifikationsmöglichkeiten des EOF in Quarzglaskapillaren*

<b>Parameter</b>	<b>Auswirkung auf den EOF</b>
<b>pH-Wert des Puffers</b>	EOF nimmt mit steigendem pH-Wert zu
<b>Pufferkonzentration</b>	EOF nimmt mit zunehmender Ionenstärke ab
<b>Temperatur</b>	verändert die Viskosität um 2-3% pro K und damit den EOF
<b>organische Lösungsmittel</b>	Verändern die Dielektrizitätskonstante und die Viskosität
<b>Zugabe von Tensiden</b>	Adsorption an der Kapillaroberfläche und dadurch Beschleunigung, Abbremsen oder Umkehr des EOF
<b>Neutrale hydrophile Polymere</b>	Abschirmung der Kapillaroberfläche durch hydrophobe Wechselwirkung, dadurch Abnahme oder Ausschalten des EOF
<b>Kovalent fixierte Beschichtungen</b>	Kovalente Anbindung von Molekülen oder Polymeren an die Kapillaroberfläche, ermöglicht Beschleunigung, Abbremsen, Ausschalten oder Umkehr des EOF

### 3.3 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie, die im Jahre 1984 von *Terabe et al.* [5] eingeführt wurde, stellt eine Erweiterung der elektrophoretischen Trenntechniken auf ungeladene Analyte dar.

Die Trennung der ungeladenen Analyten erfolgt in der MEKC durch polaritätsabhängige Verteilung zwischen einer polaren wäßrigen Phase und einer unpolaren pseudostationären Phase (Abbildung 2). Besitzen die zu trennenden Analyte eine elektrophoretische Mobilität ( $\mu_{ep}$ ) wird die Elutionsreihenfolge nicht nur durch Unterschiede in den Verteilungskonstanten, sondern auch durch Unterschiede in  $\mu_{ep}$  bestimmt. Neben der Verteilung wird dann auch Elektrophorese als Trennprinzip wirksam.

Die Stoffklasse der ionischen Tenside ist, wegen ihrer Tendenz, Aggregate (Mizellen) mit einem ausgeprägt lipophilen Innenraum zu bilden, als unpolare pseudostationäre Phase für die MEKC gut geeignet. Neben obengenannten Eigenschaften ist die Eigenladung dieser Aggregate als zweite Voraussetzung für den Einsatz als pseudostationäre Phase gegeben. Nur die Gegenwart von geladenen Mizellen ermöglicht die Trennung von ungeladenen neutralen Analyten, indem eine stoffspezifische Verteilung zwischen den beiden unterschiedlich schnell migrierenden Phasen Unterschiede in den Elutionszeiten bringt.

In der Regel werden anionische Tenside, und vor allem Natriumdodecylsulfat (SDS), als mizellare Phase in der MEKC eingesetzt [10], aber auch der Einsatz kationischer Tenside wie Tetradecyltrimethylammoniumbromid (TTAB) ist aus der Literatur bekannt [11].

Bei der Verwendung anionischer Tenside wie SDS ist zwar die Migrationsrichtung der Mizellen dem EOF entgegengerichtet, ihre elektrophoretische Mobilität ist aber so gering, daß bei Überlagerung mit dem elektroosmotischen Fluß eine Nettobewegung in Richtung der Kathode resultiert.

Unter diesen Bedingungen werden sehr polare Analyte, die sich nur in der wäßrigen mobilen Phase aufhalten, zuerst eluiert. Solche Substanzen, wie zum Beispiel Formamid oder Aceton [12, 13], werden daher zur Ermittlung der Durchflußzeit  $t_0$  verwendet. Stark unpolare Analyte, die sich überwiegend im Inneren der Mizellen

aufhalten, migrieren am langsamsten und werden demnach zuletzt eluiert. Die beobachtbare Geschwindigkeit dieser stark unpolaren Analyte entspricht der beobachtbaren Geschwindigkeit der Mizellen. Sie werden zur Ermittlung der Elutionszeit der Mizellen  $t_{MC}$  eingesetzt. Unter diesen Stoffen sind Sudan III [14] und Sudan IV [15] die gebräuchlichsten. Das Zeitfenster zwischen  $t_0$  und  $t_{MC}$ , in dem alle Substanzen nach abnehmender Polarität (sofern  $\mu_{ep} = 0$ ) eluiert werden, wird Retentionsfenster oder Migrationsfenster genannt (Abbildung 2). Dieser limitierte Elutions- bzw. Retentionsbereich stellt einen entscheidenden Unterschied zwischen der MEKC und den konventionellen chromatographischen Verfahren dar [14].

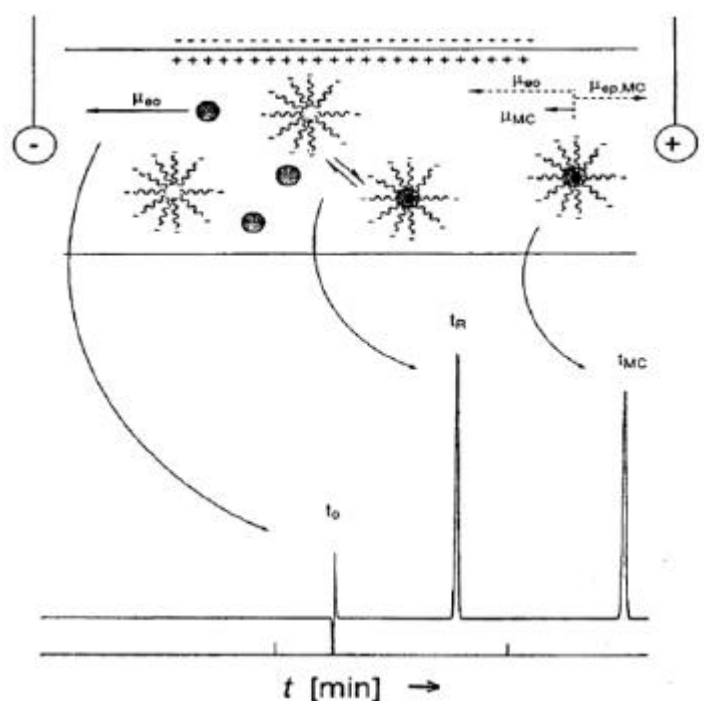


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Trennung in der MEKC [9].

### 3.4 Chromatographische Trenngrößen

Der Trennmechanismus für neutrale Verbindungen in der MEKC ist rein chromatographischer Natur und wird daher mit Hilfe modifizierter chromatographischer Kenngrößen charakterisiert.

Eine wichtige Kenngröße in der Chromatographie ist die Trennstufenzahl oder Zahl der theoretischen Böden  $N$ , die für einen Analyten mit einem chromatographischen



System erreicht werden kann. Die Anzahl der Trennstufen ist ein Maß für die Effizienz des chromatographischen Systems. N kann für symmetrische *Gaussförmige* Signale nach den folgenden Gleichungen ermittelt werden:

$$N = \frac{5,545 \cdot t_r^2}{W_h^2} \quad (6)$$

$$N = \frac{2p \cdot t_r^2 \cdot H^2}{A^2} \quad (7)$$

$t_r$  = Bruttoretentionszeit

$W_h$  = Halbwertsbreite des Peaks (in Zeiteinheiten)

H = Peakhöhe

A = Peakfläche

In der vorliegenden Arbeit wird die Trennstufenzahl unter der Annahme symmetrischer *Gaussförmiger* Signale nach Gleichung 7 berechnet.

Der Retentionsfaktor k ist ein Maß für die Verteilung des Analytes zwischen mobiler und stationärer (pseudostationärer) Phase. Für seine Berechnung hat Terabe im 1984 eine für MEKC angepaßte Formel entwickelt (Gleichung 8) [8].

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0 \cdot \left(1 - \frac{t_r}{t_{MC}}\right)} \quad (8)$$

Der Retentionsfaktor k kann somit leicht durch die Ermittlung der Durchflußzeit  $t_0$ , der Retentionszeit  $t_r$  und der Migrationszeit der Mizellen  $t_{MC}$  errechnet werden.

Ein Maß für die Selektivität eines chromatographischen Systems bezogen auf ein Analytenpaar a und b ist der Selektivitätsfaktor  $\alpha$  :

$$\mathbf{a} = \frac{k_a}{k_b} \quad k_a > k_b \quad (9)$$

$k_a$  = Retentionsfaktor für die Substanz a

$k_b$  = Retentionsfaktor für die Substanz b

Aufgrund der sehr hohen Trenneffizienz der MEKC, reichen oft schon geringe Unterschiede in den k-Werten um eine vollständige Trennung dieser Substanzen erreichen zu können. Die Güte einer solchen Trennung wird durch die Auflösung R beschrieben, deren Bestimmung direkt aus Daten des chromatographischen Laufes erfolgt. So ergibt sich R als Quotient aus dem Abstand zweier benachbarter Peakmaxima (d. h. der Differenz der beiden Migrationszeiten) und dem arithmetischen Mittel aus den beiden Basispeakbreiten:

$$R = \frac{2(t_{r,a} - t_{r,b})}{(w_{b,a} + w_{b,b})} \quad (10)$$

$t_{r,a}$  = Retentionszeit für die Substanz a

$t_{r,b}$  = Retentionszeit für die Substanz b

$w_{b,a}$  = Basispeakbreite für die Substanz a

$w_{b,b}$  = Basispeakbreite für die Substanz b

Eine vollständige Trennung bis zur Basislinie ergibt sich für Peaks ähnlicher Höhe bei einem R-Wert von 1,5. Größere Werte führen nur zu einer unnötigen Verlängerung der Analysenzeit und sind daher nicht wünschenswert. Kleinere Werte bedeuten eine Überlappung der Peaks, wobei bei Peaks mit etwa gleicher Peakhöhe für eine quantitative Auswertung eine Auflösung von 1,25 bereits ausreichend ist.

### **3.5 Aufbau einer Kapillarelektrophoreseapparatur am Beispiel des *SpectraPhORESIS100*-Systems (TSP100) der Firma *ThermoQuest***

Da in der vorliegenden Arbeit es sich um einen Vergleich verschiedener Detektionsverfahren in der CE handelt, war es wichtig, eine Kapillarelektrophoreseapparatur auszuwählen, die eine Detektion der Analyte nicht nur mit einem kommerziellen UV-VIS-Detektor sondern auch mit einem NFTL- und Fluoreszenz-Detektor ermöglicht. Aufgrund dessen wurden zwei kommerziell erhältliche CE-Systeme von der Firma *ThermoQuest* (*TSP 100*) und von der Firma

*ATI Unicam (Crystal CE System 310)* ausgewählt. Die beiden ermöglichen eine freie Führung der Kapillare und dadurch den Austausch der verschiedenen Detektionseinheiten. Da die einzelnen Geräte prinzipiell keine großen Unterschiede zeigen, wird weiter der Aufbau der CE-Apparatur am Beispiel des *TSP-100-Systems* beschrieben.

Eine schematische Darstellung der Bauteile eines Kapillarelektrophoresegeräts erfolgt in Abbildung 3.

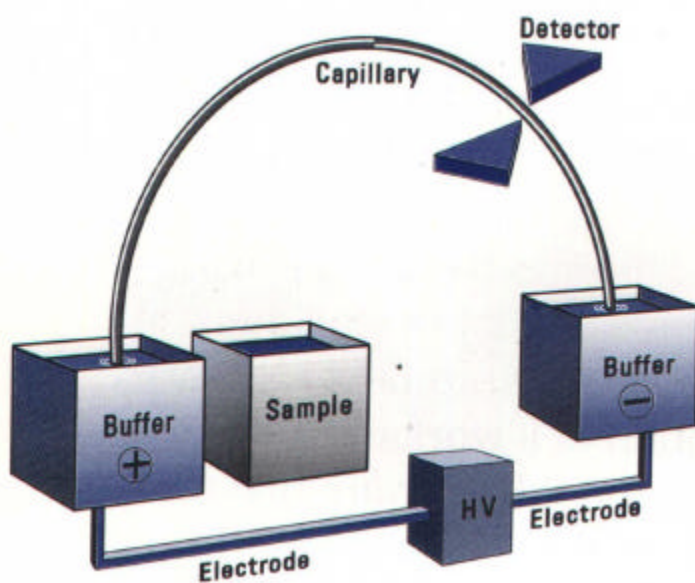


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines CE-Systems [16].

Eine Kapillarelektrophoreseapparatur besteht aus einer mit Elektrolytlösung gefüllten Kapillare, zwei Elektrolytgefäßen, einer Hochspannungsquelle und aus einer oder aus mehreren Detektionseinheiten.

Die Hochspannungsquelle ermöglicht eine stufenlose Spannungseinstellung zwischen 0 und 30 kV. Der resultierende Stromfluß wird mit der Genauigkeit von 1  $\mu\text{A}$  angezeigt. Daneben erlaubt die Meßanordnung elektrophoretische Trennungen bei konstanter Spannung oder konstanter Stromstärke, wobei bei 250  $\mu\text{A}$  das gerätetechnische Maximum erreicht wird. Die zur Trennung anionischer und kationischer Verbindungen notwendige Spannungsumkehr kann durch Umpolung der Hochspannung realisiert werden.

Der rotierende Probensteller, der über 12 wählbare Positionen an der Einlaßseite verfügt, erlaubt keine automatische Probenaufgabe, daher werden die Probengefäße durch mechanisches Rotieren der Probensteller zur Einlaßseite der Kapillare geführt. Die Probenaufgabe kann wahlweise elektrokinetisch durch kurzes Anlegen einer geringen Spannung oder hydrodynamisch durch kurzzeitiges Erzeugen eines unterhalb des Umgebungsdrucks liegenden Drucks im Auslaßgefäß erfolgen.

Zu Trennung werden Quarzglas kapillaren, die an der Außenseite mit Polyimid beschichtet sind, verwendet. Die Kapillaren besitzen üblicherweise einen Innendurchmesser von 25-100  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 20-100 cm. Zur Bildung eines Detektionsfensters wird die äußere Polyimidschicht mechanisch oder durch Abbrennen entfernt. Bei den neuerdings erhältlichen Kapillaren mit UV-durchlässiger Beschichtung fällt diese Prozedur aus.

Die Detektion erfolgt direkt in der Kapillare, da externe Detektionszellen durch ihre zusätzlichen Durchflußvolumina zu Effizienzverlusten führen würden. Bei der Detektionseinheit handelt es sich bei kommerziellen Geräten üblicherweise um einen photometrischen Detektor, dessen Meßwellenlänge sich durch Wahl der entsprechenden Lichtquelle und Regulierung des Monochromators oder Auswahl eines Transmissionsfilters einstellen läßt. Außerdem werden kommerziell Fluoreszenz-Detektoren, und elektrochemische oder massenselektive Detektoren angeboten.

Die erhaltenen Meßdaten werden normalerweise von einem Kleinrechner registriert und ausgewertet.

### **3.6 Detektionsverfahren in der Kapillarelektrophorese**

In diesem Kapitel sollen die in dieser Arbeit verwendeten optischen Detektionssysteme ausführlicher beschrieben werden.

Wegen der sehr geringen Probenaufgabevolumina erfolgt die Detektion in der CE üblicherweise direkt in der Trennkapillare, deren Dimensionen daher die Detektionsparameter festlegen. Für die optische Detektion steht demnach nur die mittlere Weite des Kapillarinne durchmessers als Schichtdicke zur Verfügung, so daß die Nachweisstärke relativ ungünstig ist.

In Tabelle 2 sind die nach der Arbeit von Pütz [17] erreichbaren Nachweisgrenzen unter Verwendung verschiedener Detektionssysteme in der CE angegeben.

Tabelle 2: Optische Detektionsverfahren in der Kapillarelektrophorese

<i>Detektionsart</i>	<i>Nachweisgrenzen</i>	
	<i>Abs. Menge(in mol)</i>	<i>Konzentration(in mol L<sup>-1</sup>)</i>
<b>UV-Absorption</b>	$10^{-15}$ - $10^{-13}$	$10^{-7}$ - $10^{-4}$
<b>Thermische-Linse-Detektion (TLD)</b>	$10^{-17}$ - $10^{-14}$	$10^{-9}$ - $10^{-5}$
<b>Indirekte UV-Absorption</b>	$10^{-16}$ - $10^{-13}$	$10^{-8}$ - $10^{-4}$
<b>Fluoreszenz</b>	$10^{-18}$ - $10^{-13}$	$10^{-9}$ - $10^{-4}$
<b>Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF)</b>	$10^{-21}$ - $10^{-17}$	$10^{-13}$ - $10^{-7}$
<b>Indirekte Fluoreszenz</b>	$10^{-16}$ - $10^{-14}$	$10^{-7}$ - $10^{-5}$

### 3.6.1 Photometrische Detektion

Durch die Adaption optischer Detektoren, welche für die HPLC entwickelt worden waren, an die Erfordernisse bei der Detektion in Kapillaren wurden die optischen Detektionsverfahren auf der Basis von Absorption in der CE etabliert. Da die Konzentrationsempfindlichkeit bei der Absorption nach dem *Lambert-Beerschen* Gesetz von der durchstrahlten Schichtdicke abhängt, ist diese demnach relativ bescheiden (30 bis 100-fach geringer als bei der HPLC). Außerdem stellt die mangelhafte Fokussierung des Lichtes und der dadurch steigende Streulichtanteil ein Problem dar. In den meisten kommerziellen Geräten werden deshalb entweder fokussierende Linsensysteme, die einen Bereich der Kapillare von 0,5 mm und weniger ausleuchten oder Spaltblenden, die eine Breite zwischen 50 µm und 200 µm und eine Länge von 100 µm und 300 µm besitzen, verwendet.

Wie in der HPLC werden für die Detektion in Kapillaren entweder Linienstrahler, z. B. eine Quecksilber- oder eine Zinkdampfampe, oder kontinuierliche Strahler wie z. B. die Deuterium- bzw. die Xenonlampe verwendet. Durch die Kombination einer Deuterium- mit einer Wolframlampe erlaubt das TSP-100-System eine optische Detektion im Wellenlängenbereich von 190 bis 700 nm.

Durch Vergrößerung der Detektionsschichtdicke kann eine Verbesserung der Empfindlichkeit bei der UV-Detektion in der CE erreicht werden. Der Einsatz von Kapillaren, in deren Ende ein kurzer Abschnitt durch Aufblasen erweitert wird, der in Form einer „bubble“ als Detektorzelle dient, führt zu einer Steigerung der Empfindlichkeit um einen Faktor von etwa 3 bis 7. Der Fluß des Puffermediums wird in dieser „bubble“ verlangsamt und die optische Weglänge erhöht. Außerdem kann durch die Verwendung von aus der Mikro-HPLC bekannten Z-Zellen, sowie rechtwinklig geformten Kapillaren die Nachweisempfindlichkeit um etwa Faktor zehn verbessert werden [9]. Der mit diesen Konstruktionen bewirkte Effizienzverlust kann in vielen Fällen toleriert werden.

### **3.6.2 Fluoreszenzdetektion**

Eine andere Möglichkeit zur Detektion in der Kapillare stellt die Fluoreszenzdetektion dar. Die ist zwar deutlich nachweisstärker als die UV-Absorption (bei der Analyse von Tryptophan wurde zum Beispiel eine Verbesserung der Nachweisstärke um einen Faktor von etwa Zehntausend erreicht [18]), setzt jedoch eine Fluorophor-Gruppe im Analytmolekül voraus. Entscheidende Unterschiede zu den HPLC-Detektoren liegen dabei auf dem Gebiet der Lichtquellen. Vor fünfzehn Jahren wurden neben den Deuterium- und Xenon-Blitzlampen auch Lasersysteme im sichtbaren Wellenlängenbereich für die Detektion in der CE konstruiert [19]. Zur Zeit werden auch Laserlichtquellen mit einer Emission in UV-Bereich eingesetzt. Hier ist die Optimierung der Kapillarhalterung und des Filtersystems von großer Bedeutung. In einem modernen LIF-Detektionssystem wird sowohl für die Fokussierung des Anregungslichts in die Kapillare als auch für die Sammlung des emittierten Fluoreszenzlichts mit Lichtwellenleiter (LWL)-Technologie gearbeitet [20]. Um die Flexibilität der LIF-Detektion zu steigern, wurden kürzlich Lasersysteme mit vierfach schaltbarer Wellenlänge (266 nm, 355 nm, 473 nm, 532 nm) als Anregungslichtquellen realisiert [21]. Für die Registrierung des Fluoreszenzlichts werden üblicherweise empfindliche Photomultiplier in Kombination mit optischen Filtersystemen zur Eliminierung von Streulicht und anderen Störlichtquellen verwendet. Beim Vergleich von konventioneller (Xenonlampe) und laserinduzierter (Festkörperlaser)

fluorimetrischer Detektion von mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Aminosäuren ergaben sich für die LIF-Detektion um einen Faktor 70 niedrigere Nachweisgrenzen [20]. Werden anstelle der im oben genannten Beispiel laserseitig verwendeten 600  $\mu\text{m}$  Lichtwellenleiter 70  $\mu\text{m}$  LWL, wie sie für viele Detektionssysteme erforderlich sind, eingesetzt, werden sogar Empfindlichkeitssteigerungen von mehr als Faktor tausend beobachtet.

Die Fluoreszenzdetektion kann auf niedermolekulare Verbindungen, die keine eigene Fluoreszenz haben, erweitert werden. Zu diesem Zweck wird in den Analyten durch einen Derivatisierungsschritt eine Fluorophor-Gruppe eingeführt. Dabei treten jedoch Nachteile wie größerer Zeitaufwand sowie teure Derivatisierungsreagenzien auf. Zu weiteren Schwierigkeiten zählen vor allem die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Zusammensetzung der Probenmatrix und das Auftreten von Reagenzpeaks, die sich mit den Peaks der Analyte überlagern können.

### **3.6.3 Photothermische Verfahren**

Seit der Einführung des Lasers in den Sechziger Jahren werden die photothermischen Verfahren zum Nachweis von Spurenstoffkonzentrationen eingesetzt. Die photothermischen Methoden sind Verfahren, bei denen eine Lichtabsorption durch eine photothermisch induzierte Linse (Gradient des Brechungsindex) in eine Strahlaufweitung bzw. eine Ortsablenkung eines Lichtzeigers übertragen wird.

Zu photothermischen Verfahren zählen die photopyroelektrische Spektrometrie (PPES), die photoakustische Spektrometrie (PAS), die photothermische Interferometrie (PI), die photothermische Ablenkungsspektrometrie (PDS) und die Thermische-Linse-Spektrometrie (TLS), die sich nach den unterschiedlichen Methoden der Effekterfassung voneinander unterscheiden.

Die photopyroelektrische Spektrometrie stellt eine direkte Erfassung photothermisch erzeugter Wärme dar. Hierbei werden mit Hilfe von pyroelektrischen Detektoren oder Thermoelementen kleinste Temperaturänderungen des Mediums gemessen [22].

Die photoakustische Spektrometrie beruht auf der Detektion von Schallwellen, die durch die photophysikalisch erzeugte Ausdehnung des Mediums entstehen. Diese Schallwellen können entweder mit einem Mikrophon oder mit einem piezoelektrischen Druckaufnehmer detektiert werden. Erfolgt die Anregung der Schallwellen mit Hilfe eines Lasers, wird die entsprechende Detektionsart laserinduzierte photoakustische Spektrometrie (LIPAS) genannt [23].

Bei der photothermischen Interferometrie wird die Brechungsindexänderung, die in Folge der Anregungslichtabsorption und der damit verbundenen Temperaturänderung in der Probe auftritt, gemessen. Zu diesem Zweck wird die Probe in einen Arm eines Zwei-Strahl-Interferometers gebracht. Nach der Bestrahlung bewirkt die Brechungsindexänderung einen Gangunterschied im Meßarm des Interferometers, der nach Überlagerung mit dem Referenzarm zu einer Intensitätsänderung des Interferenzbildes führt [24].

Das Meßprinzip der photothermischen Ablenkungsspektrometrie beruht auf der Detektion des photothermisch erzeugten Brechungsindexgradienten mit einem kontinuierlichen Detektionslaser. Der Detektionslaser erfaßt nicht das Volumen mit dem höchsten Brechungsindex, sondern das des maximalen Brechungsindexgradienten, aufgrund dessen spielt die Position der Anregungsquelle und der Detektorquelle eine entscheidende Rolle. Der Strahl des Detektionslasers wird durch den Gradienten des Brechungsindex abgelenkt und seine Ablenkung wird (in Winkeleinheiten) mit einem positionsempfindlichen Detektor erfaßt [25].

Bei der Thermische-Linse-Spektrometrie (TLS) wird nicht wie bei PDS die Ablenkung, sondern die Aufweitung des Laserstrahls erfaßt. Zu diesem Zweck wird die Intensitätsänderung des Detektionslaserstrahls hinter einer Lochblende mit definiertem Durchmesser mit einem Photodetektor gemessen [26].

Ein wesentlicher Nachteil der photothermischen Methoden und hier speziell der TLS war in den Neunziger Jahren der voluminöse Aufbau des optischen Systems, was den breiten Einsatz des Verfahrens in der Analytischen Chemie verhindert hat. Nach der Einführung der sogenannten Nahfeld-Thermische-Linse-Spektrometrie (NFTLS), die einen kompakten und robusten Aufbau des optischen Systems ermöglicht, konnte das Problem weitgehend gelöst werden [26, 27].



Als Anwendungsgebiet des photothermischen Detektionsverfahrens sind die Bestimmungen von Schadstoffen in Spurenbereich von Bedeutung. Eine Bestimmung von Schadstoffen in wäßrigen Lösungen wurde mit Hilfe der LIPAS [28], der PDS [29], der PI [30] und der TLS [31] durchgeführt. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen photothermischen Detektionsmethoden konnte gezeigt werden, daß in wäßrigen Systemen die Thermische-Linse-Spektrometrie die beste Nachweisstärke aufweist [32].

Neben den Messungen in statischen Medien kann die photothermische Detektion und insbesondere die Thermische-Linse-Spektrometrie bei Messungen in dynamischen (fließenden) Medien eingesetzt werden. So wurde in der Arbeit von *Schulz* ein miniaturisierter Nahfeld-Thermische-Linse-Detektor für die Detektion nach einer hochleistungsflüssigkeitschromatographischen (HPLC)-Trennung realisiert [31]. Bei der Bestimmung von Dinitrophenolverbindungen konnte unter Verwendung dieses Detektors eine Verbesserung der Nachweisgrenzen um einen Faktor 5 bis 10 gegenüber photometrischer Detektion bei gleicher Wellenlänge (364 nm) erreicht werden.

Der Einsatz der Thermischen Linse als Detektionssystem nach einer kapillarelektrophoretischen Trennung wurde in der Arbeit von *Steinle* beschrieben [26]. Hierbei wurden 2,4-Dinitrophenol und 2,4-Dinitro-6-methylphenol nach erfolgter Trennung in einer 75 µm (I.D.) Kapillare detektiert. Der Einsatz der Thermische-Linse-Detektion hat eine Verbesserung der Nachweisstärke gegenüber der UV-Detektion (364 nm) um einen Faktor 50 ermöglicht. *Seidel* et al. haben Bestimmungen von derivatisierten Aminosäuren mit Hilfe der Thermischen-Linse-Detektion durchgeführt [33]. Der Einsatz eines neu konstruierten TL-Detektors mit einem Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge der Emission von 458 nm als Anregungsquelle und mit Lichtwellenleiter (LWL)-Technologie ermöglichte eine Bestimmung von sechs derivatisierten Aminosäuren im Stoffmengenbereich von 10 amol absolut.

Neuerdings werden auch im Bereich der klinischen Analytik photothermische Verfahren eingesetzt. So wurden in der Arbeit von *Li* et al. fünf tryzyklische Antidepressiva mittels nichtwäßriger CE getrennt und mit Hilfe eines an die Kapillarelektrophorese adaptierten thermooptischen Absorptionsdetektors bestimmt

[34]. *Faubel* et al. [35] bestimmten wichtige Analgetika, Antirheumatika und Antiseptika nach einer kapillarelektrophoretischen Trennung unter Verwendung eines kompakten Nahfeld-Thermischen-Linse-Detektors mit einem frequenzverdoppelten Argon-Ionen Laser (257 nm) als Anregungsquelle. Dies ermöglichte eine um einen Faktor zwei bis drei nachweisstärkere Bestimmung von Papaverin, Verapamil und Tramadol im Vergleich zur konventionellen photometrischen UV-Detektion bei gleicher Wellenlänge.

Da die vorliegende Arbeit sich unter anderem mit der Optimierung der Nahfeld-Thermischen-Linse als Detektor für die CE beschäftigt, wird diese im folgenden näher erläutert.

### **3.6.3.1 Thermische Linse (TL), Prinzip und Signalerfassung**

Das Phänomen der Thermischen Linse wurde von *J. P. Gordon* [36] im Jahre 1964 erstmals beschrieben. Bei einem Versuch, die Intensität der Laser-Raman-Streuung von Benzol zu erhöhen, wurde sie eher zufällig entdeckt. Eine mit der Probenlösung gefüllte Brewster- Winkel-Küvette wurde in den Resonator eines He-Ne-Lasers eingesetzt, um die entsprechend höhere Lichtleistung auszunutzen. Dabei hat sich der Laser allerdings so verhalten, als wäre anstelle der Probe eine Linse mit einer bestimmten Brennweite eingebaut worden. Dieser Effekt wurde erkannt und seitdem als „thermal lens“ bzw. „Thermische Linse“ bezeichnet.

Die Thermische-Linse-Spektrometrie (TLS) war neben der Photoakustischen Spektrometrie (oder Optoakustischen Spektrometrie) eines der ersten in der quantitativen Analyse angewendeten photothermischen Verfahren. Die TLS kann zur Analyse von Gasen und Flüssigkeiten verwendet werden. Hierbei wird ein modulierter Anregungslichtstrahl über eine entsprechende Optik in die Probe eingebracht und von der zu untersuchenden Substanz absorbiert. Aufgrund dieser Lichtabsorption und der strahlungslosen Übergänge in den Grundzustand kommt es zur Ausbildung eines Temperaturprofils entsprechend der Intensitätsverteilung des Anregungslichtstrahls, der Wärmediffusion und der chemisch-physikalischen Probeneigenschaften. Da sich die meisten Substanzen bei Erwärmung ausdehnen, kann davon ausgegangen werden, daß sich ihr Brechungsindex infolge von Absorption von Licht verringert. Unter Gleichgewichtsbedingungen wird die

Abhängigkeit des Brechungsindex von der Temperatur bei konstantem Druck durch Gleichung 11 beschrieben.

$$\left(\frac{\partial n}{\partial T}\right)_p = \left(\frac{\partial n}{\partial T}\right)_r + \left(\frac{\partial n}{\partial r}\right)_r \cdot \left(\frac{\partial r}{\partial T}\right)_p \quad (11)$$

$p$  = Druck

$\rho$  = Dichte

$n$  = Brechungsindex

$T$  = Temperatur

Der Anteil der Brechungsindexänderung mit der Temperatur bei konstanter Dichte ist so klein, daß der Term  $(\partial n/\partial T)_p$  in Gleichung 11 vernachlässigt werden kann. Für kleine Änderungen der Temperatur  $\Delta T$  kann der Temperaturkoeffizient des Brechungsindex als konstant angesehen werden. Daher kann für die Brechungsindexänderung  $\Delta n$  folgendes geschrieben werden:

$$\Delta n = \left(\frac{dn}{dT}\right) \cdot \Delta T \quad (12)$$

Unter Berücksichtigung der durch die Lasereinstrahlung und Wärmediffusion verursachten Temperaturverteilung wird die örtliche und zeitliche Änderung des Brechungsindexes erhalten.

Durch die Änderung des Brechungsindexes bildet sich eine Thermische Linse aus, die sich wie eine Aufweitungslinse verhält. Diese Thermische Linse kann nun mit einem Detektionslaserstrahl (Meßstrahl oder Sondenlaserstrahl) erfaßt werden. Die Aufweitung des Strahls wird durch Messung der Leistung des Sondenlasers hinter einer Lochblende mit einer Photodiode registriert. Unter Einwirkung des Anregungslichts nimmt die induzierte Änderung des Brechungsindex zu, wodurch der Detektionslaserstrahl noch weiter aufgeweitet wird. Dadurch vergrößert sich der Laserstrahlradius am Ort der Lochblende. Bei konstanter Intensität des Detektionslaserstrahls und größer werdendem Strahlradius verringert sich die

Lichtleistung, welche hinter der Lochblende mit der Photodiode gemessen wird. Das eigentliche Meßprinzip der Thermischen Linse beruht auf der lokal begrenzten Messung der Lichtintensitätsänderung, welche ein Maß für die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der Probe ist (Abbildung 4).

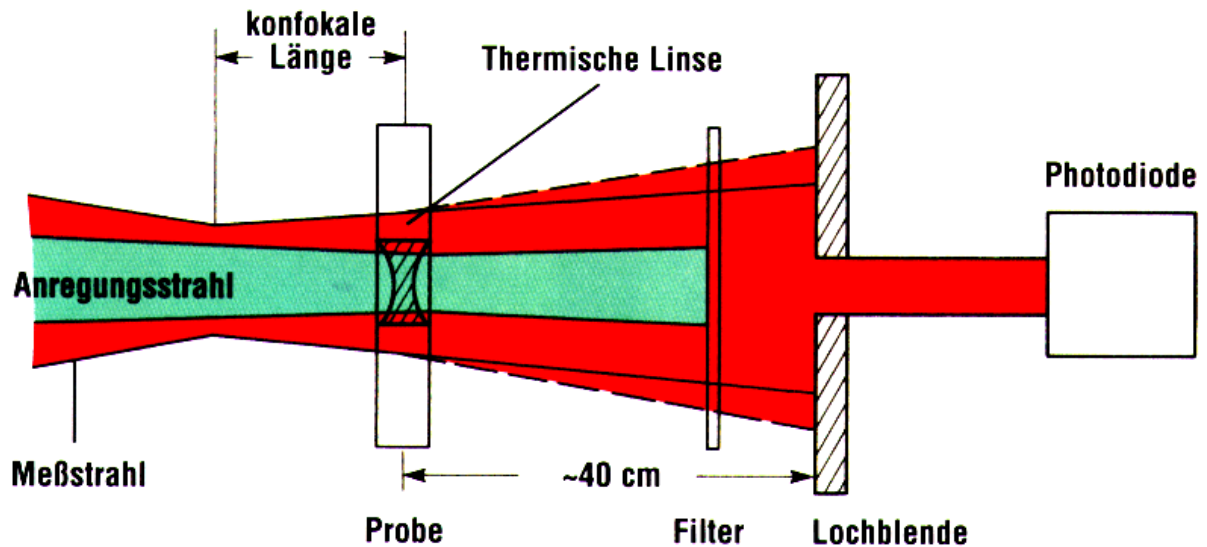


Abbildung 4: Detektion des photothermischen Effekts mit einem Detektioslaserstrahl

Die entscheidende Meßgröße, die bei der Thermischen Linse ausgewertet wird, ist die Differenz der Detektionslaserintensität in Gegenwart der Thermischen Linse  $P_D(t)$  und in Abwesenheit der Thermischen Linse  $P_D(0)$ . Das zeitabhängige Thermische Linsensignal  $S(t)$  kann somit durch folgende Formel wiedergegeben werden:

$$S(t) = \frac{P_D(t) - P_D(0)}{P_D(0)} \quad (13)$$

Diese Meßgröße ist direkt proportional zur Extinktion und somit zur Konzentration des zu bestimmenden bzw. absorbierenden Stoffes.

### 3.6.3.2 Fernfeld- und Nahfeld-Thermische-Linse

Hauptunterschiede dieser beiden Arten der Thermische-Linse-Spektrometrie liegen zum einen im Verhältnis der Strahldurchmesser von Anregungslichtstrahl und Detektionslaserstrahl am Ort der Probe und zum anderen im Abstand der Detektorebene von der Probe [37].

Bei der Fernfeld-Thermischen-Linse haben Anregungslichtstrahl und Detektionslaserstrahl im Regelfall ungefähr den gleichen Durchmesser der Strahltaile. Die Distanz der Lochblende von der Probe kann von ca 70 cm bis zu einigen Metern reichen.

Bei der sogenannten Nahfeld-Thermischen-Linse beträgt das Verhältnis zwischen beiden Lichtstrahlen (bei gekreuzter Messanordnung) an der Stelle des Kreuzungspunktes etwa 10-30 : 1 zu Gunsten des Detektionslaserstrahls. Durch die Brechungsindexverteilung in der photothermisch induzierten Linse kommt es zu einer räumlichen Phasenverschiebung des elektrischen Feldvektors des konvergierenden oder divergierenden Detektionslaserstrahls (Deformation der Oberfläche der räumlichen Wellenfront), was ein Interferenzbild in geringem Abstand (daher der Begriff "Nahfeld-TLS") hinter der Probe verursacht (Fresnel-Beugung). Unter diesen Bedingungen kann die Intensitätsänderung des einen Interferenzmaximums bzw. -minimums in Gegenwart und in Abwesenheit der Thermische-Linse detektiert werden, was die Strecke zwischen Probenvolumen und Detektionsebene auf nur wenige Millimeter reduziert [26].

### 3.6.3.3 Die Rolle des Mediums bei der Thermischen-Linse-Detektion

Gemäß der Theorie der TLS ist das Thermische-Linse-Signal  $S$  direkt proportional zur Extinktion und kann durch Gleichung 14 beschrieben werden:

$$S \equiv 2,303 \cdot E \cdot A \quad (14)$$

$A$  = Extinktion

$E$  = Enhancement oder Verstärkungsfaktor

$$E = \frac{P \cdot \left( -\frac{dn}{dT} \right)}{I \cdot k} \quad (15)$$

$\lambda$  = Wellenlänge des Anregungslasers

$k$  = spezifische Wärmekapazität des Probemediums

$P$  = Leistung des Anregungslaserstrahls

Der Faktor  $E$  (Enhancement oder Verstärkungsfaktor) ist eine Größe, die den Gewinn an Nachweistärke bei der TL-Messungen auf der Wellenlänge des Anregungslaser  $\lambda$  im Vergleich zur konventionellen Spektrophotometrie charakterisiert. Dieser ist stark von den thermooptischen Eigenschaften des erforschten Mediums abhängig. Aus Gleichung 15 wird deutlich, daß bei konstanter Leistung des Anregungslichtes unter Verwendung von Medien mit hohen  $dn/dT$  Werten und niedriger spezifischer Wärmekapazität  $k$  die höchste Empfindlichkeit erreicht werden kann.

Ein anderer Parameter, der bei der Mediumauswahl in der Thermische-Linse-Spektrometrie eine große Rolle spielt, ist die Standardabweichung der nacheinander folgenden Messungen des Thermische-Linse-Signals. Dieser Parameter ist für die TLS sehr spezifisch und wird deswegen hierbei ausführlicher erklärt.

Bei der Durchführung der Thermische-Linse-Messungen wird als Erstes die Intensität des Detektionslaserstrahls in Abwesenheit der Thermischen Linse (der Anregungslichtstrahl ist durch Chopper geschlossen) hinter einer Lochblende gemessen. Nach der Öffnung des Choppers, was zur Entwicklung der Thermischen-Linse in der absorbierenden Probe führt, wird die Intensität des aufgeweiteten Detektionslaserstrahls wieder gemessen, das TL-Signal gemäß Gleichung 13 bestimmt und der ganze Zyklus mehrfach wiederholt. Üblicherweise reicht es bei statischen Messungen, 30-40 Zyklen zu messen, um das mittlere Signal bestimmen zu können.

Während aber in der konventionellen Photometrie die Standardabweichung der Extinktion durch Meßfehler des Gerätes verursacht wird, hat diese Größe bei TL-Messungen eine ganz andere Bedeutung. Hier ist der Anteil des Gerätemeßfehlers (Laserleistungsfluktuationen, mechanisches Zittern der optischen Elemente) im Vergleich zu Einflüssen des Mediums auf die Standardabweichung des TL-Signals  $s_r$  deutlich geringer [38]. Außerdem ist  $s_r$ , welches aus den oben genannten 30-40

Meßzyklen bestimmt wird, nur geringfügig von der Extinktion der Probe und Schwankungen der Pumplaserleistung abhängig [39]. Aufgrund dessen kann  $s_r^{\cdot}$  als sogenannte Lösungsmittelkonstante betrachtet werden, die durch konvektionelle Prozesse, die Wärmekapazität und so weiter bestimmt wird. Diese Charakteristik sowie das Verhältnis von  $s_r^{\cdot}$  zu E/P für zwei unterschiedliche Medien (RE) (siehe Gleichung 16) sind für den Vergleich verschiedener Medien in der Thermische-Linse-Spektrometrie gut geeignet.

$$RE = \frac{s_{r,x}^{\cdot}}{s_{r,Wasser}^{\cdot}} \times \frac{\left(\frac{E}{P}\right)_{Wasser}}{\left(\frac{E}{P}\right)_x} \quad (16)$$

x = das untersuchte Lösungsmittel

Der positive Effekt von organisch-wäßrigen Lösungsmittelgemischen als Probemedien auf bei der TL-Detektion ist dadurch zu erklären, daß der geringe Verlust in der Empfindlichkeit (E/P) im Vergleich zu organischen Medien durch deutliche Verringerung von  $s_r^{\cdot}$  kompensiert wird [40]. In Tabelle 3 sind die statistischen Kenngrößen bei der Bestimmung von Fe(II) mit 1,10-Phenantrolin mittels TLS für mehrere Medien aufgelistet [41].

*Tabelle 3: Einige statistische Kenngrößen für die photothermische Bestimmung von Fe(II) mit 1,10-Phenantrolin. Messbedingungen: Anregungslaser Argon-Ionen-Laser (514,5 nm, 40 mW); Chopperfrequenz 4 Hz; Quarzglasküvette.*

<i>Medium</i>	<i>E/P [mW<sup>-1</sup>]</i>	<i>s<sub>r</sub><sup>·</sup> [%]</i>	<i>RE</i>	<i>NWG<sub>x</sub>/NWG<sub>Wasser</sub></i>
<b>Wasser</b>	0,28	10	1	1
<b>Chloroform</b>	8,5	25	0,08	0,1
<b>Aceton</b>	5,4	90	0,38	1,75
<b>Aceton-Wasser 4:1</b>	3,3	75	0,43	0,5
<b>Ethanol</b>	2,32	30	0,24	0,19
<b>Ethanol-Wasser 4:1</b>	2,2	25	0,20	0,15
<b>Wasser mit Triton X-100 (2,5%)</b>	0,81	20	0,63	0,6
<b>Wasser mit Triton X-100 (5%)</b>	1,13	25	0,66	0,6

Anhand der in Tabelle 3 aufgelisteten Daten wird deutlich, daß neben organisch-wäßrigen Phasen auch wässrige Lösungen von Tensiden, die hier hauptsächlich in ihrer mizellaren Form vorliegen, ein günstiges Medium für die TL-Spektrometrie sind. Da die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie auch in mizellenhaltigem Elektrolyten durchgeführt wird, ist davon auszugehen, daß die TL-Detektion nach einer MEKC-Trennung eine bessere Nachweisstärke aufweisen kann, als nach einer CE-Trennung in einer wässrigen oder organischen Phase.

### 3.6.4 Indirekte Detektionsmethoden in der CE

Die Substanzen, die über den gesamten Wellenlängen-Bereich nur extrem kleine oder gar vernachlässigbare molare Extinktionskoeffizienten besitzen, können mit Hilfe der indirekten Detektion dennoch in der CE detektiert werden.

Diese Variante der Detektion ist für die Ionenaustausch-Chromatographie seit Anfang der 80er Jahre bekannt. Dabei können mit herkömmlichen UV-Detektoren ionische nicht UV-absorbierende Substanzen bestimmt werden.

In der CE wurde die Technik der indirekten Detektion schon relativ früh beschrieben, ohne daß ihre vielseitige Anwendbarkeit erkannt wurde. Erst in den Arbeiten von *Romano* und *Jandik* [42] wurden solche Vorteile wie kurze Analysenzeiten und gute Nachweisgrenzen im Bereich von  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  bei der Bestimmung von Anionen verdeutlicht.

#### 3.6.4.1 Theoretische Grundlagen der indirekten photometrischen Detektion

Bei der indirekten Detektion wird durch Zusatz eines bei der Detektionswellenlänge absorbierenden Ions zum Pufferelektrolyten ein hohes Hintergrundsignal mit der Extinktion  $E_1$  erzeugt. Wandert nun durch das Detektionsfenster der Kapillare eine Analytzone, so wird der Hintergrundelektrolyt (BGE) proportional zur Analytkonzentration in diesem Volumensegment verdrängt, dadurch erfolgt eine Erniedrigung des Hintergrundsignals um einen Betrag  $E_3$  (Abbildung 5 und 6).



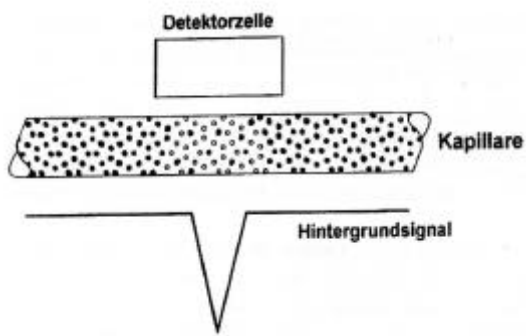


Abbildung 5: Prinzip der indirekten Detektion [9].

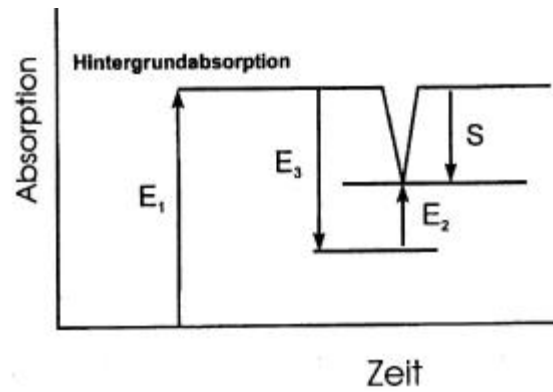


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Signalentstehung bei der indirekten Detektion [9].

Wenn zum Beispiel die Pufferkomponente eine Ladung trägt und das Probenmolekül zwei, so werden zur Erhaltung der Elektroneutralität im Elektrolyten rein rechnerisch zwei Moleküle des Hintergrundelektrolyten verdrängt. Besitzen die Analytionen eine eigene Absorption  $E_2$ , wird das indirekte Signal um diesen Betrag erniedrigt. Die höchste Empfindlichkeit wird immer dann erreicht, wenn  $E_2$  gleich Null ist, was keine Eigenabsorption der Analytionen bedeutet. Die Größe des Signals in der indirekten UV-Detektion kann durch Gleichung 17 bestimmt werden.

$$S = (e_E - e_A) \cdot c_A \cdot d \cdot TR \quad (17)$$

$\hat{a}_E$  = Extinktionskoeffizient des Elektrolyten

$\hat{a}_A$  = Extinktionskoeffizient des Analytions

$c_A$  = Konzentration des Analyten in der Probe

$d$  = Schichtdicke

$TR$  = Verdrängungsverhältnis (Transferrate) (siehe Kapitel 3.6.4.2.)

### 3.6.4.2 Optimierung der Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten bei den indirekten Detektionsmethoden

Die Optimierung der Zusammensetzung eines Trennelektrolyten spielt in der CE mit indirekter Detektion eine große Rolle.

Um eine optimale Auftrennung von Probenkomponenten sowie *Gaussförmige* Signale zu erhalten, muß die signalerzeugende Pufferkomponente eine ähnliche elektrophoretische Mobilität besitzen wie die der zu trennenden Ionen. Wandern die Probenkomponenten schneller als das verdrängte Ion, werden Peaks mit sogenanntem Leading erhalten, wandern sie langsamer, so zeigen die Peaks Tailing (Abbildung 7).

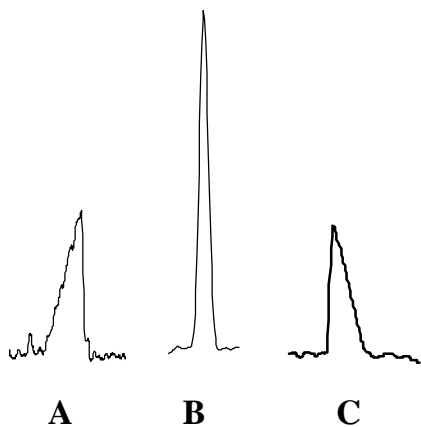


Abbildung 7: Einfluß der Mobilitätsdifferenzen zwischen Analyt und BGE auf die Peaksymmetrie

*A* Analyt wandern schneller als BGE

*B* Analyt wandern mit ähnlicher Geschwindigkeit wie BGE

*C* Analyt wandern langsamer als BGE

Für die theoretische Betrachtung der beschriebenen Phänomene sind das Verdrängungsverhältnis (TR) und die Dynamische Reserve (DR) von Bedeutung.

TR (Transferrate) wird als Anzahl der Äquivalente des Hintergrundelektrolyten, die durch ein jeweiliges Äquivalent des Analyten verdrängt werden, definiert [9]. In einem idealen Fall, bei dem die elektrophoretische Mobilität von BGE und Analyt genau übereinstimmt, wird ein Mol eines ein/zweifach geladenen Hintergrundelektrolyten durch ein Mol eines ein/zweifach geladenen Analyten verdrängt. Ist das nicht der Fall, müssen neben dem Ladungsverhältnis noch die elektrophoretischen Mobilitäten der am Verdrängungsprozess beteiligten Ionen berücksichtigt werden (Gleichung 18).

$$TR = \frac{z_b \cdot m_a \cdot (m_b + m_x)}{z_a \cdot m_b \cdot (m_a + m_x)} \quad (18)$$

$z_a$  = Ladung des Analyten

$z_b$  = Ladung des BGE

$\mu_a$  = elektrophoretische Mobilität des Analyten

$\mu_b$  = elektrophoretische Mobilität des BGE

$\mu_x$  = elektrophoretische Mobilität des Gegenions

Die dynamische Reserve (DR) wird als Verhältnis der Höhe des Hintergrundsignals zum Rauschen dieses Signals definiert und aus Gleichung 19 berechnet:

$$DR = \frac{\epsilon_E \cdot L \cdot c_m}{AN} \quad (19)$$

$\epsilon_E$  = Extinktionskoeffizient des Elektrolyten

$L$  = Länge des optischen Lichtwegs

$c_m$  = Konzentration des BGE

$AN$  = Rauschen des BGE-Signals

Mit der Hilfe von TR und DR kann die Nachweisgrenze ( $c_{\min}$ ) für einen Analyten ausgerechnet werden (Gleichung 20).

$$c_{\min} \cong \frac{c_m}{DR \cdot TR} \quad (20)$$

Bei einem  $TR = 1$ , ergibt sich aus (19) und (20) die Gleichung 21:

$$c_{\min} \cong \frac{AN}{\epsilon_E \cdot L} \quad (21)$$

Aus der Gleichung 21 geht hervor, daß das Rauschen des Hintergrundsignal und somit die Qualität der Lichtquelle und des Detektors eine entscheidende Rolle für

Nachweisgrenzen bei der indirekten Detektion spielt. Außerdem ist  $c_{\min}$  unabhängig von  $c_m$ . Diese Unabhängigkeit ermöglicht das Arbeiten mit relativ hoher Konzentration des BGE. Verbessert wird die Nachweisgrenze durch Wahl eines BGE mit hohem Extinktionskoeffizienten und durch Verlängerung des optischen Lichtwegs.

Zusammenfassend sind bei der Optimierung der Zusammensetzung eines Hintergrundelektrolyten (BGE), der in der CE mit indirekter photometrischer Detektion eingesetzt werden soll, folgende Prinzipien zu beachten:

1. Die Arbeitswellenlänge soll im Bereich hoher Extinktion des BGE und geringer Extinktion des Analyten liegen
2. Der Extinktionskoeffizient des BGE soll möglichst hoch sein. Die Länge des optischen Lichtwegs ist apparativ vorgegeben und oft nicht variierbar.
3. Die elektrophoretischen Mobilitäten des BGE und der Analyten sollen ähnlich sein. Das ist die Voraussetzung für annähernde *Gauss*förmige Signale.
4. Um niedrigere Nachweisgrenzen zu erzeugen, muß das Basislinierauschen durch eine entsprechende Instrumentierung und durch Optimierung der Trennbedingungen niedrig gehalten werden.

#### 3.6.4.3 Indirekte Fluoreszenzdetektion

Bei der Analyse von nichtabsorbierenden Substanzen kann neben der indirekten Absorption auch die indirekte Fluoreszenzdetektion eingesetzt werden. Hierbei muß ein geeigneter Fluorophor ausgewählt werden, der als Hintergrundelektrolyt in der CE verwendet werden kann. Dieser sollte wie im Fall der indirekten Absorption eine elektrophoretische Mobilität aufweisen, der derjenigen der Analyte ähnlich ist. Außerdem ist eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute des BGE von großer Bedeutung. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz  $I_F$  ist durch Gleichung 22 gegeben:

$$I_F = 2,3 \cdot \epsilon \cdot Q \cdot L \cdot c_F \cdot I_0 \cdot G \quad (22)$$

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient des Fluorophors

$Q$  = Quantenausbeute der Fluoreszenz

$L$  = Länge des optischen Lichtwegs

$I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichts

$c_F$  = Konzentration des Fluorophors

$G$  = Geometriefaktor (abhängig von der Detektionseinheit)

Da die optische Länge  $L$  durch den Kapillariendurchmesser festgelegt ist, sowie  $Q$  eine molekülspezifische Konstante ist, kann die Fluoreszenzintensität nur durch Änderung der Konzentration des Fluorophors  $c_F$ , der Fluoreszenzquantenausbeute  $Q$ , sowie der eingestrahnten Lichtintensität  $I_0$  variiert werden. Da das Rauschen des Hintergrundsignals  $AN$  bei der Fluoreszenzdetektion direkt proportional zur Konzentration des Fluorophors ist, ist die dynamische Reserve  $DR$  in diesem Fall unabhängig von  $c_F$  (Gleichung 23). Demzufolge ist die Nachweisgrenze wiederum unter Berücksichtigung von Gleichung 20 direkt proportional zur Konzentration des Fluorophors (Gleichung 24). Aus diesem Grund muß die Konzentration der fluoreszierenden Pufferkomponente  $c_F$  bei der indirekten Fluoreszenzdetektion so niedrig wie möglich gewählt werden, um niedrige Nachweisgrenzen zu erzielen.

$$DR = \frac{I_F}{I_F \cdot const} \quad (23)$$

$$c_{\min} \cong \frac{c_F}{TR \cdot const} \quad (24)$$

Außerdem kann die Fluoreszenzquantenausbeute durch Änderung der Zusammensetzung des Trennpuffers beeinflusst werden. Zum Beispiel kann durch den Zusatz einer hohen Konzentration von Tensiden, die als EOF-Modifikatoren oder als pseudostationäre Phase in der MEKC verwendet werden die Quantenausbeute stark beeinflusst werden [43]. Um ein möglichst hohes Fluoreszenzsignal zu erhalten, soll also  $I_0$  hoch gewählt werden, indem ein möglichst großer Anteil des eingestrahnten Lichts ins Kapillarinere gebracht wird.

Außerdem soll die Lichtquelle eine hohe Stabilität der Lichtintensität aufweisen, was für die Erniedrigung der Nachweisgrenzen eine große Rolle spielt. Aufgrund dessen sind leicht fokussierbare intensitätsstabile Laser ideale Strahlungsquellen für indirekte Fluoreszenzdetektion in Verbindung mit der Kapillarelektrophorese [44].

## 4 Indirekte Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion bei der Bestimmung von kleinen anorganischen Anionen

Die Trennung und Bestimmung anorganischer Anionen ist unter anderem im Bereich der Trink- und Mineralwasser-Analytik sowie bei der industriellen Prozessanalytik, zum Beispiel der Bestimmung der Gegenionenzusammensetzung basischer Pharmazeutika [45] oder der Überwachung des Anionengehalts von Prozesswässern (beispielsweise im Kühlwasserkreislauf von Kernkraftwerken) von großer Bedeutung.

Da die Anionen gegen den sich in Quarzkapillaren einstellenden EOF migrieren, ist die Trennung in der CE mit dem Detektor auf der Seite der Kathode ziemlich problematisch. Dabei werden nur diejenigen Ionen detektiert, deren Betrag der Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode geringer ist als der Betrag der Lineargeschwindigkeit des zu Kathode gerichteten EOF. Aufgrund dessen ist die Detektion von schnell wandernden Anionen unter diesen Bedingungen nicht möglich. Durch Umpolung der Spannungsquelle können zwar diese schnellen Anionen erfasst werden, jedoch wandern dann die langsamen Anionen mit dem EOF ins Kathodengefäß zurück (Abbildung 8) [9].

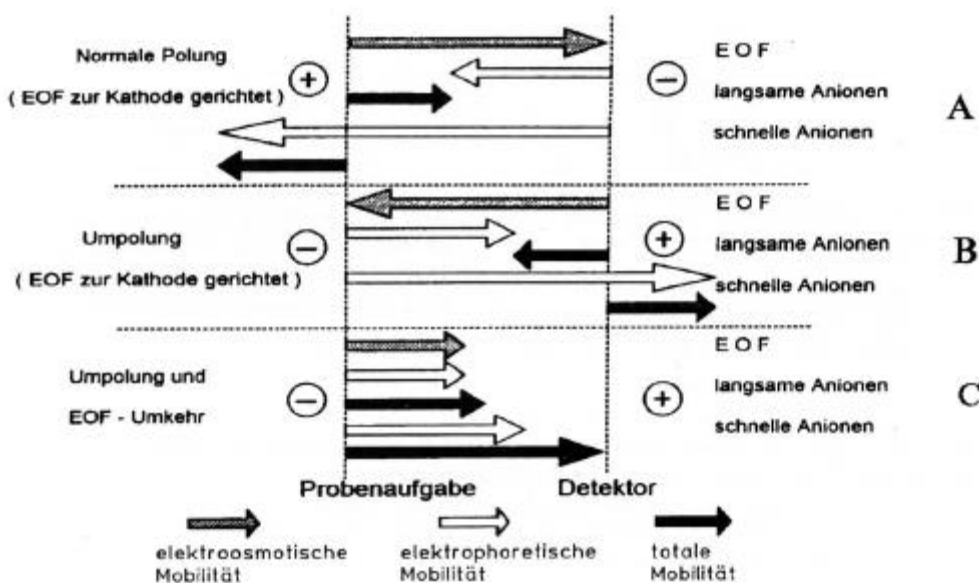


Abbildung 8: Wanderungsrichtungen bei der Anionentrennung in der CE [9].

Aus diesem Grund muß bei der Bestimmung von sowohl langsamen als auch schnellen Anionen der EOF unterdrückt oder in seiner Richtung umgekehrt werden. Zu diesem Zweck werden zu dem Trennpuffer kationische Bestandteile, z. B. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), Hexadimetribromid (HDB) oder Hexamethoniumhydroxid (HmOH), zugesetzt. Dadurch wird eine ungeladene oder positiv geladene Schicht auf der Kapillaroberfläche gebildet (Abbildung 9), was zur Unterdrückung oder zur Umkehr des EOF führt (Kapitel 3.2).

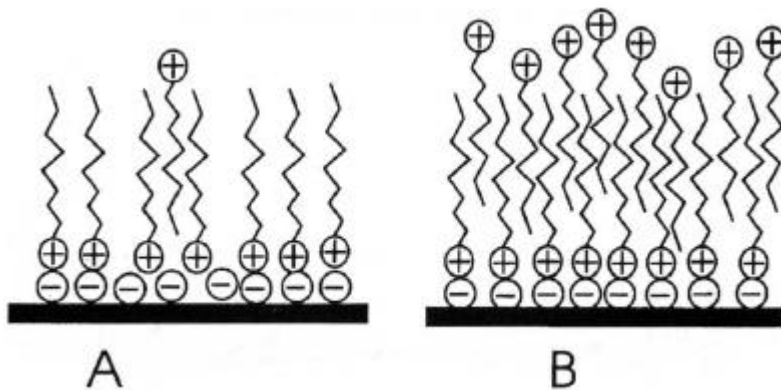


Abbildung 9: Adsorption von kationischen Tensiden an der Kapillaroberfläche. **A** einfach adsorbierte Tensidschicht, **B** Tensiddoppelschicht [9].

Für die Zusammensetzung des UV-absorbierenden Hintergrundelektrolyten bei der indirekten photometrischen Detektion anorganischer Anionen werden mehrere Möglichkeiten beschrieben. In der Literatur werden viele Beispiele gegeben, in denen Chromat als Hintergrundelektrolyt (BGE) verwendet wurde [46, 47]. Ein großer Nachteil dieser Verfahren liegt in der Toxizität chromathaltiger Lösungen, welche besonders hohe Entsorgungskosten der Abfälle verursacht. Außer Chromat werden Benzoesäure, Phthalsäure, 2-Sulfobenzoesäure, Pyromellitsäure und *o*-Benzylbenzoesäure (vollständig oder teilweise deprotoniert) als BGE zu indirekten Detektion von Anionen verwendet [48-50].

Zur Verbesserung der Nachweisstärke im Vergleich zur indirekten photometrischen Detektion ist die indirekte fluorimetrische Detektion aussichtsreich [9]. Frühe Versuche zur indirekten fluorimetrischen Detektion in der CE wurden von *Gross* und *Yeung* [51] vorgenommen, als Hintergrundelektrolyt wurde hierbei Natriumsalicylat verwendet. Außerdem wurde bei der Bestimmung von Phenolen



[52], Kationen (in Form von Komplexen mit EDTA) [53], organischen und anorganischen Anionen mit geringen elektrophoretischen Mobilitäten auch Fluorescein als BGE eingesetzt [54].

Auch indirekte laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF) wurde bereits in der Literatur beschrieben, so zum Beispiel wurde ein HeCd-Laser als Anregungsquelle bei der indirekten Detektion von Aminosäuren eingesetzt [55]. Organische Säuren wurden indirekt detektiert, indem eine Lösung von Bromkresolgrün als BGE eingesetzt wurde und Fluoreszenzanregung durch einen He-Ne-Laser ( $\lambda = 632,8$  nm) erfolgte [56]. In der Arbeit von *Melanson* et al. [44] wurde eine indirekte laserinduzierte Fluoreszenzdetektionsmethode zur Bestimmung fünf anorganischer Anionen unter Verwendung einer leistungstabilen Laserdiode ( $\lambda = 415$  nm) zur Anregung der Fluoreszenz entwickelt. Die unter Verwendung dieser Detektionsart erzielbaren Nachweisgrenzen lagen im Bereich von 0,5 bis 0,8  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , was eine Größenordnung niedriger war, als bei der indirekten photometrischen Detektion.

Ein grundsätzliches Problem bei der Auswahl eines geeigneten Hintergrundelektrolyten für die indirekte fluorimetrische Detektion von Anionen ist die üblicherweise relativ geringe elektrophoretische Mobilität (Beweglichkeit) fluoreszierender organischer Moleküle. Fluorescein beispielsweise liegt im alkalischen Bereich als Dianion vor und hat mit einem Molekulargewicht von 330,3  $\text{g mol}^{-1}$  demzufolge eine wesentlich geringere elektrophoretische Mobilität als die zu bestimmenden Anionen und ist somit mehr zur Detektion größerer, beispielsweise organischer Anionen (Benzoat, Salicylat), geeignet. Aus diesem Grund ist es wichtig, solche Verbindungen zu erproben, die als fluoreszierender und schnell migrierender Hintergrundelektrolyt bei der indirekten Fluoreszenz-Detektion in der CE eingesetzt werden können. Eine solche Verbindung ist 1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure (HPTS), die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde und im folgenden Kapitel beschrieben wird.

#### **4.1 Verwendeter Hintergrundelektrolyt**

In der vorliegenden Arbeit wurde 1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure (HPTS, Molekulargewicht: 524,4  $\text{g mol}^{-1}$ ) in Form ihres Trinatriumsalzes als

Hintergrundelektrolyt für die indirekte fluorimetrische und photometrische Bestimmung anorganischer Anionen ausgewählt [57] (Abbildung 10).

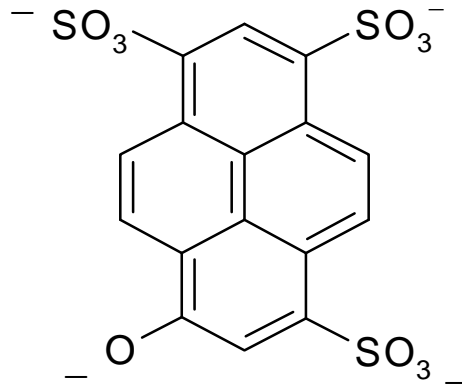


Abbildung 10: Strukturformel der deprotonierten 1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure.

In Abhängigkeit vom pH-Wert liegt HPTS in unterschiedlichen Deprotonierungsgraden vor, der pKs-Wert für die Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe liegt bei 7,0 [44]. Geeignet als BGE für die indirekte Detektion von Anionen sind die dreifach deprotonierte Form [57] im pH-Bereich von 2 bis 6 sowie die vierfach deprotonierte Form (pH-Bereich von 8 bis 14) [57]. Letztere weist eine elektrophoretische Mobilität auf, die der vieler kleiner anorganischer Anionen ähnlich ist. Die dreifach deprotonierte Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 403 nm, das Absorptionsmaximum der vierfach deprotonierten Form hingegen liegt bei 454 nm. Das vierfach negativ geladene HPTS-Anion liefert bei Excitationswellenlängen von 440 bis 470 nm ein stabiles Fluoreszenzsignal (Abbildung. 11). *Melanson* et al. [44] verwendeten eine bei 410 nm emittierende Laserdiode zur Fluoreszenzanregung der dreifach deprotonierten Form bei einem pH-Wert von 3,2. Für die vorliegende Arbeit wurde aufgrund der Notwendigkeit der Ähnlichkeit der effektiven elektrophoretischen Mobilität des Sondenions mit der effektiven elektrophoretischen Mobilität der zu bestimmenden anorganischen Anionen die vierfach deprotonierte Form des HPTS bei pH 9,5 und Fluoreszenzanregung mit einer frequenzverdoppelten Laserdiode bei 452 nm verwendet.

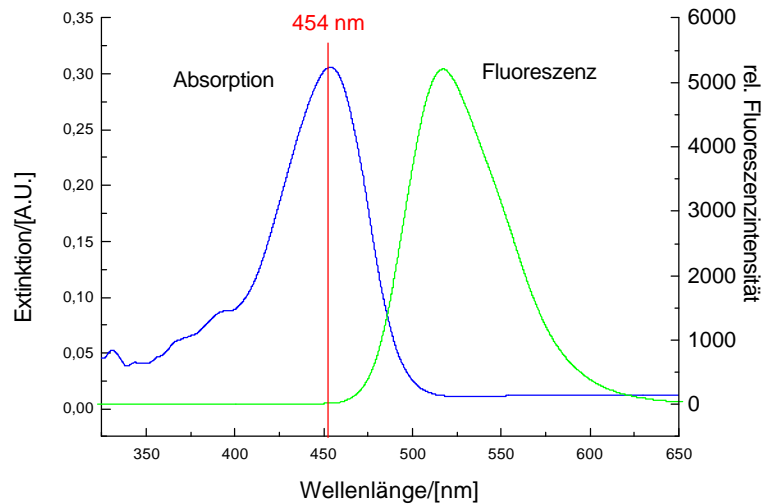


Abbildung 11: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von HPTS. Messbedingungen:  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  HPTS in  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumcarbonat; pH 9. Anregungslichtquelle: frequenzverdoppelte Laserdiode 452nm. Quarzglasküvette 1 cm. Detektion des Fluoreszenz-Lichts in  $90^\circ$  zur optischen Achse des Anregungslichts (Dioden-Array-Detektor) [20].

## 4.2 Entwicklung einer indirekten photometrischen Detektionsmethode zur Bestimmung von acht Anionen

Zu Beginn der Untersuchungen wurden Messungen zur indirekten Bestimmung anorganischer Anionen mit einem konventionellen photometrischen Detektor durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Trennelektrolyt auf der Basis von Dinatriumtetraborat als Pufferkomponente erprobt. Der für die ersten Studien eingesetzte Trennelektrolyt hatte folgende Zusammensetzung:

**$1 \text{ mmol L}^{-1}$  HPTS**

**$3 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat**

**pH 9,5**

Zur Herstellung der Pufferlösung wurden die entsprechenden Substanzen eingewogen, in einen Messkolben gebracht und in Milli-Q-Wasser unter Rühren gelöst. Die fertige Lösung wurde bis zur Kolbenmarke mit dem Milli-Q-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert des Elektrolytsystems mit einem Präzisions-pH-Meter gemessen. Der Wert betrug 9,5 pH-Einheiten.

Als Stammlösungen wurden wäßrige Lösungen von Kaliumsalzen der einbezogenen Anionen mit Ausnahme von Ammoniumheptamolybdat in der Konzentration von  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  bis  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  verwendet. Bei der Herstellung der in der CE verwendeten Standardmischungen wurden  $10 \text{ }\mu\text{L}$  von jeder Stammlösung in ein Eppendorf-Gefäß gebracht und mit Wasser auf  $2 \text{ mL}$  aufgefüllt.

Zur Wahl der Meßwellenlänge wurde ein Absorptionsspektrum der Lösung von HPTS im hergestellten Puffer mittels Dioden-array-Detektor (DAD) aufgenommen (Abbildung 11). Das Absorptionsmaximum lag bei  $454 \text{ nm}$ . Aus diesem Grund wurde diese Wellenlänge als Meßwellenlänge für die indirekte photometrische Bestimmung von kleinen Anionen ausgewählt. In Abbildung 12 ist eine Trennung von sechs Anionen unter Verwendung von HPTS als Hintergrundelektrolyt mit einem photometrischen Detektor dargestellt.

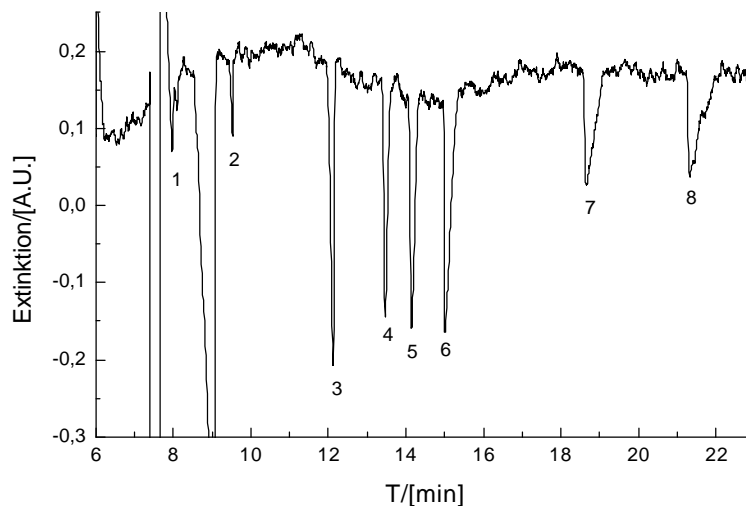


Abbildung 12: Trennung von sechs Anionen mit indirekter photometrischer Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  HPTS,  $\text{pH}$  9,5; Trennungsspannung  $30 \text{ kV}$ ; Kapillarlänge  $76,5 (60,2) \text{ cm}$ ,  $75 \mu\text{m}$  I.D.; photometrische Detektion  $454 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch  $3 \text{ s}$   $25 \text{ mbar}$ ; Analyte: **1** Systempeak, **2** Systempeak, **3** Chlorat ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **4** Thiocyanat ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **5** Azid ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **6** Heptamolybdat ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **7** Nitrat ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **8** Nitrit ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Aus Abbildung 12 wird deutlich, daß sich für die zuletzt migrierenden Anionen Nitrit und Nitrat ein Tailing zeigt, was auf unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeiten des Hintergrundelektrolyten (HPTS) und der Analyte

zurückzuführen ist. Außerdem können starke Schwankungen des Basisliniensignals beobachtet werden. Zur Lösung des Problems wurde die Konzentration von Dinatriumtetraborat in der Pufferlösung von  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  auf  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  herabgesetzt. In Abbildung 13 ist eine Trennung von acht Anionen unter Verwendung der neuen Pufferkonzentration präsentiert.

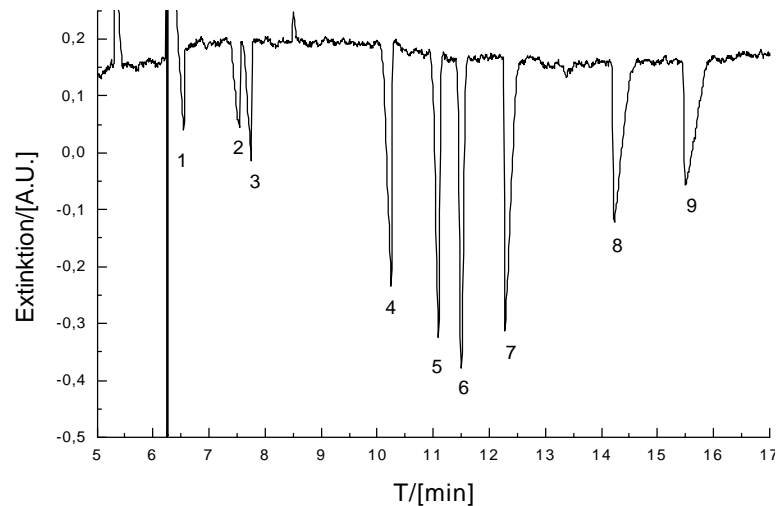


Abbildung 13: Trennung von acht Anionen mit indirekter photometrischer Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  HPTS, pH 9,5; Trennspannung 30 kV; Kapillarlänge 76,5 (60,2) cm,  $75 \mu\text{m}$  I.D.; photometrische Detektion 454 nm; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar; Analyte: **1** Systempeak, **2** Acetat ( $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **3** Fluorid ( $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **4** Chlorat ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **5** Thiocyanat ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **6** Azid ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **7** Heptamolybdat ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **8** Nitrat ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **9** Nitrit ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Aus Abbildung 13 geht hervor, daß unter Verwendung einer Pufferlösung mit niedrigerer Konzentration an Dinatriumtetraborat eine stabileres Basisliniensignal sowie eine vollständige Trennung der Acetat- und Fluorid-Ionen vom Systempeak erreichbar sind. Zudem weisen die Nitrit- und Nitrat-Peaks nicht mehr ein so stark ausgeprägtes Tailing wie bei der höheren Dinatriumtetraborat-Konzentration (siehe Abbildung 12) auf.

Für die in Abbildung 13 präsentierte Trennung wurden die Wiederholpräzision der Migrationszeiten, der Peakflächen und der Peakhöhen, sowie die Trennstufenzahlen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

*Tabelle 4: Wiederholpräzision der Migrationzeiten, der Peakhöhen und der Peakflächen, sowie die Trennstufenzahlen bei der Bestimmung von acht Anionen in einer 75 µm weiten Kapillare für fünf nacheinanderfolgende Trennungen (experimentelle Bedingungen sowie die Analytkonzentrationen wie in Abbildung 13)*

<b>Anion</b>	<b>F</b>	<b>RSD, [%]</b>	<b><math>t_m</math></b>	<b>RSD, [%]</b>	<b>H</b>	<b>RSD, [%]</b>	<b>N</b>
<b>Azetat</b>	0,0152	3,6	7,57	0,54	0,145	2,6	18800
<b>Fluorid</b>	0,0163	2,1	7,78	0,38	0,205	1,3	23300
<b>Chlorat</b>	0,0427	2,9	10,30	0,53	0,422	2,6	58800
<b>Thiocyanat</b>	0,0439	4,2	11,15	0,49	0,506	1,9	85000
<b>Azid</b>	0,0478	5,0	11,56	0,47	0,554	1,9	116000
<b>Heptamolybdat</b>	0,0600	1,6	12,34	0,38	0,484	1,5	37500
<b>Nitrat</b>	0,0534	3,9	14,31	0,55	0,275	2,3	28400
<b>Nitrit</b>	0,0512	0,75	15,59	0,55	0,220	1,5	10200

F = mittlere Peakfläche

$t_m$  = mittlere Migrationszeit

H = mittlere Peakhöhe

RSD = relative Standardabweichung

N = mittlere Trennstufenzahl.

Aus Tabelle 4 geht hervor, daß unter den genannten Bedingungen die Peakflächen, die Peakhöhen sowie die Migrationszeiten sich gut wiederholen lassen. Die Trennstufenzahlen sind jedoch relativ niedrig und aufgrund der unterschiedlichen Relation der elektrophoretischen Mobilitäten der Analytmolekülen zur elektrophoretischen Mobilität des BGE für die einzelnen Analyten stark unterschiedlich, dies trifft jedoch prinzipbedingt auf alle indirekten Detektionsmethoden in der CE zu.

Die entwickelte Trennung von acht Anionen wurde auch in einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von 100 µm durchgeführt. Das entsprechende Elektropherogramm ist in Abbildung 14 dargestellt.

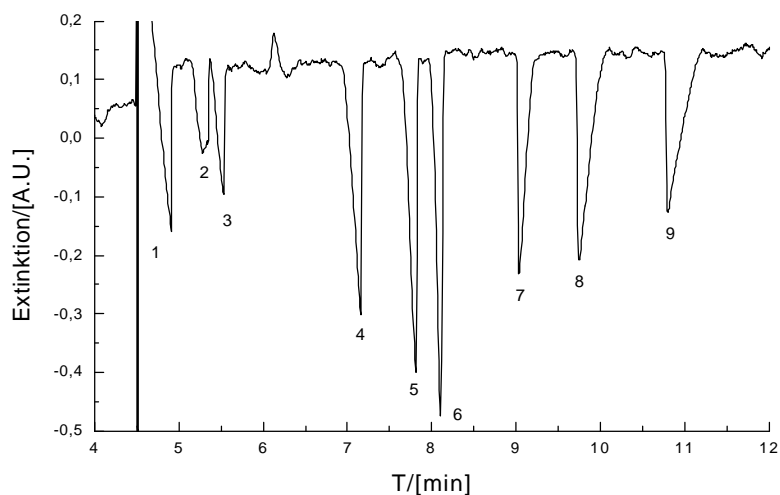


Abbildung 14: Trennung von acht Anionen mit indirekter photometrischer Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  HPTS, pH 9,5; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 76,5(60,2)cm,  $100 \mu\text{m}$  I.D.; photometrische Detektion 454 nm; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar; Analyte: **1** Systempeak, **2** Azetat ( $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **3** Fluorid ( $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **4** Chlorat ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **5** Thiocyanat ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **6** Azid ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **7** Heptamolybdat ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **8** Nitrat ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **9** Nitrit ( $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

In Abbildung 14 ist erkennbar, daß die Trennung der anorganischen Anionen mit indirekter photometrischer Detektion und HPTS als Hintergrundelektrolyt ebenfalls in einer  $100 \mu\text{m}$ -Kapillare durchgeführt werden kann. Allerdings zeigt sich hierbei im Vergleich zu Messungen in einer  $75 \mu\text{m}$ -Kapillare eine deutlich schlechtere Effizienz, die auch auf die längere Probenaufgabezone bei weiterer Kapillare (identische Injektionsparameter, hydrodynamische Injektion) zurückgeführt werden kann.

Für diese Trennung wurden ebenfalls die Wiederholpräzision der Migrationszeiten, der Peakflächen und der Peakhöhen, sowie die Trennstufenzahlen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 präsentiert.

*Tabelle 5: Wiederholpräzision der Migrationzeiten, der Peakhöhen und der Peakflächen, sowie die Trennstufenzahlen bei der Bestimmung von acht Anionen in einer 100 µm weiten Kapillare für fünf nacheinanderfolgende Trennungen (experimentelle Bedingungen sowie die Analytkonzentrationen wie in Abbildung 14)*

<b>Anion</b>	<b>F</b>	<b>RSD, [%]</b>	<b>t<sub>m</sub></b>	<b>RSD, [%]</b>	<b>H</b>	<b>RSD, [%]</b>	<b>N</b>
<b>Azetat</b>	0,0195	2,9	5,28	2,0	0,143	1,3	6860
<b>Fluorid</b>	0,0178	9,8	5,53	1,9	0,204	8,3	14000
<b>Chlorat</b>	0,0441	5,4	7,16	1,8	0,429	2,5	19700
<b>Thiocyanat</b>	0,0455	1,9	7,81	1,5	0,528	1,8	41700
<b>Azid</b>	0,0440	3,2	8,11	1,4	0,615	2,0	74300
<b>Heptamolybdat</b>	0,0348	3,9	9,03	1,3	0,374	1,9	37300
<b>Nitrat</b>	0,0517	5,9	9,75	1,3	0,356	2,8	23400
<b>Nitrit</b>	0,0504	4,8	10,8	0,96	0,272	2,1	17800

F = mittlere Peakfläche

t<sub>m</sub> = mittlere Migrationszeit

H = mittlere Peakhöhe

RSD = relative Standardabweichungen

N = mittlere Trennstufenzahl.

Im Vergleich zu den Messungen in einer 75 µm weiten Kapillare hat sich die Wiederholpräzision der Migrationszeiten bei der Trennung in einer 100 µm weiten Kapillare deutlich verschlechtert. Außerdem sind die Trennstufenzahlen für Acetat, Fluorid sowie Nitrit relativ niedrig. Damit stellt sich unter den genannten Bedingungen die Verwendung von Kapillaren mit einem 75 µm Innendurchmesser als geeigneter heraus. Aus diesem Grund wurden weitere elektrophoretische Trennungen anorganischer Anionen in einer 75 µm weiten Kapillare durchgeführt. Einschränkend ist jedoch hinzuzufügen, daß möglicherweise bei Verkleinerung der Probenzone (z. B. durch kürzere Probenaufgabedauer) auch in einer 100 µm weiten Kapillare größere Trennstufenzahlen als die oben beschriebenen erreicht werden könnten.



### **4.3 Entwicklung einer indirekten laserinduzierten fluorimetrischen Detektionsmethode zur Bestimmung von Anionen**

Wie schon in Kapitel 3.6.2 erwähnt, sind Laser wegen ihrer guten Fokussierbarkeit sehr gut als Anregungsquelle für die indirekte Fluoreszenzdetektion geeignet. Ein Ziel dieses Arbeitsteils war es daher, eine elektrophoretische Trennmethode mit indirekter laserinduzierter fluorimetrischer Detektion (LIF) zur Trennung und Bestimmung von anorganischen Anionen zu entwickeln. Zu diesem Zweck sollten die Trennbedingungen (BGE-Konzentration, Pufferzusammensetzung, EOF-Modifizier) optimiert werden und es sollte untersucht werden, ob eine am Fachbereich Chemie (Universität Marburg) konzipierte und realisierte Detektionseinheit mit frequenzverdoppeltem Diodenlaser als Fluoreszenz-Anregungsquelle vorteilhaft eingesetzt werden kann.

#### **4.3.1 Experimenteller Aufbau**

Bei dem experimentellen Aufbau wurde eine frequenzverdoppelte Laserdiode (Wellenlänge 452 nm) der Firma *Crystal GmbH*, die eine hohe Signalstabilität bei einer emittierten integralen Leistung von 10  $\mu\text{W}$  zeigt, als Fluoreszenzanregungsquelle eingesetzt. Für die Fluoreszenzlichtsammlung wurde hierbei ein an der Universität Marburg entwickelter Selbstbau-Detektor mit einem Photosensormodul der Firma *Hamamatsu* verwendet [58]. Abbildung 15 zeigt ein Foto der verwendeten Detektionseinheit. In der Ausschnittsvergrößerung ist eine Detailaufnahme der optischen Einheit aus Lichtwellenleiter und Linsensystem abgebildet. Über die in der Detailaufnahme dargestellte Rändelmutter kann der Abstand der Optik (eine verkittete Zweikomponenten-Optik bestehend aus einer plan-konvexen und einer plan-konkaven Linse (Achromat)) zur Kapillare variiert werden. Über die in der Gesamtaufnahme erkennbare seitlich angeordnete Schraube kann eine Vertikalverschiebung des Fokus erreicht werden. Die Fixierung der Kapillare erfolgt über sogenannte Micro-Fittings aus PEEK der Firma *Upchurch* (Oak Harbor, USA), die in der Gesamtansicht am oberen sowie am unteren Bildrand zu erkennen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Laserlicht über eine an der Universität Marburg gebaute in drei Achsen positionierbare Einkopplungseinheit [58] in einen

Lichtwellenleiter mit 50  $\mu\text{M}$  Core-Durchmesser eingekoppelt (Abbildung 16) und mittels der oben beschriebenen Optik in die Kapillare fokussiert.

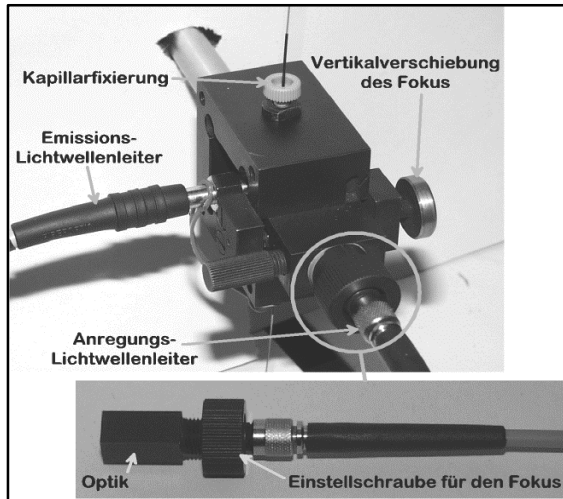


Abbildung 15: Selbstbau-Detektor mit einem Emissionslichtwellenleiter [58]. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Einkopplung des Fluoreszenzlichts nur für einen Lichtwellenleiter dargestellt, ein zweiter Lichtwellenleiter kann in einem Winkel von  $180^\circ$  dazu angeordnet werden.

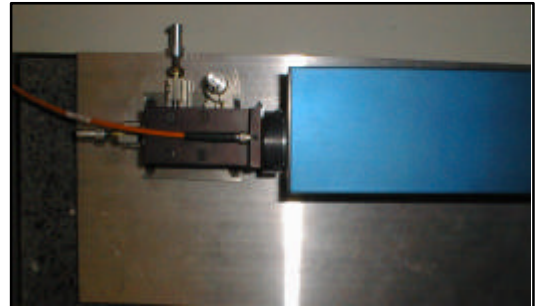


Abbildung 16: frequenzverdoppelte Laserdiode (Wellenlänge 452nm) mit der Einkopplungseinheit in einen Lichtwellenleiter [20].

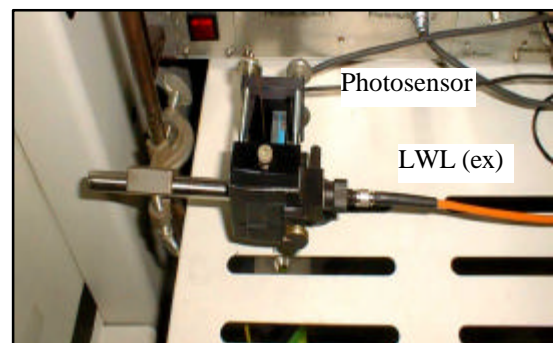


Abbildung 17: Selbstbau-Detektor mit einem Photosensormodul.

Das emittierte Fluoreszenzlicht kann entweder in einem Winkel von  $90^\circ$  zur optischen Achse des Anregungslichts in zwei Emissionslichtwellenleiter eingekoppelt und zu je einem Photomultiplier geführt werden. Die andere Möglichkeit besteht darin, die Intensität des angeregten Fluoreszenzlichts mit Hilfe eines senkrecht zur optischen Achse angeordneten Photosensormoduls (miniaturisierter Photomultiplier mit integrierter Hochspannungsversorgung) direkt hinter der Kapillare zu registrieren (Abbildung 17). In der vorliegenden Arbeit wurde die zweite Möglichkeit zur Detektion des Fluoreszenzlichtes ausgewählt. Zur

Reduktion des Laserstreulichts wurde unmittelbar vor dem aktiven Fenster des Photosensormoduls ein Kantenfilter (Langpass-Filter OG 515 der Firma *Schott*, Durchmesser: 9,8 mm, Dicke: 1,0 mm) positioniert. Ein Photo des gesamten Aufbaus ist in Abbildung 18 präsentiert.

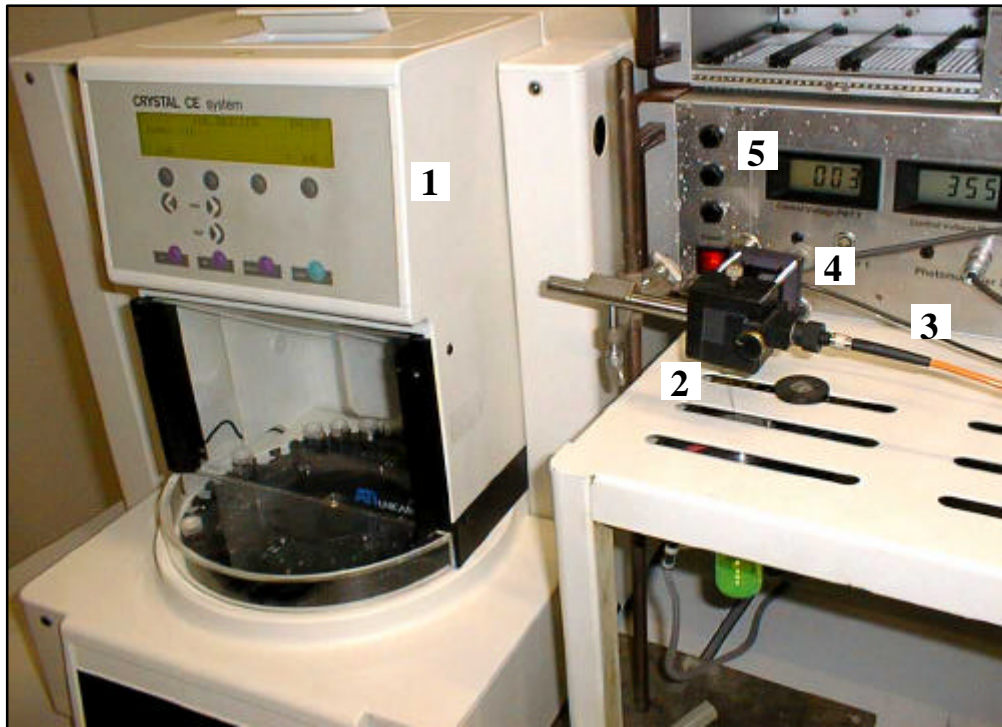


Abbildung 18: Experimenteller Aufbau 2; 1 CE-Anlage, 2 Detektionseinheit, 3 optischer Lichtwellenleiter (LWL), 4 Photosensormodul, 5 Kapillare

#### 4.3.2 Trennung von Azid- und Thiocyanat-Ionen unter Verwendung eines Ampholyten zur Pufferung des Trennmediums

Während die mit der indirekten photometrischen Detektion erreichbaren Nachweisgrenzen in erster Näherung unabhängig von der Konzentration des fluoreszierenden Pufferbestandteils (Sondenion) sind (siehe Gleichung 21), sind bei der indirekten Fluoreszenz-Detektion die erzielbaren Nachweisgrenzen bei konstantem Verdrängungsverhältnis direkt proportional zur Konzentration des Sondenions (siehe Gleichung 24). Aufgrund dessen wurde zur Erzielung niedriger

Nachweisgrenzen bei der indirekten Fluoreszenzdetektion die Konzentration von HPTS von  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  auf  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  herabgesetzt.

Zunächst wurden Messungen zur Bestimmung von zwei Anionen (Azid und Thiocyanat) mit indirekter fluorimetrischer Detektion unter Verwendung von Dinatriumtetraborat ( $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) als Pufferkomponente durchgeführt. Hierbei wurden starke Schwankungen des Basisliniensignals beobachtet, so daß die Analytpeaks nicht mehr erkennbar waren. Somit stellte sich Dinatriumtetraborat zur Pufferung des Trennelektrolyten unter den beschriebenen Bedingungen als wenig geeignet heraus. Es ist hierbei zu bedenken, dass das Anion der puffernden Komponente in Konkurrenz mit dem Sondenion das Verdrängungsverhältnis bei der indirekten Detektion drastisch herabsetzt. Daher wurde versucht, Ampholyte als puffernde Komponente einzusetzen.

Wenn ein Ampholyt in reinem Wasser aufgelöst wird, ist der pH-Wert der entstehenden Lösung nahe dem isoelektrischen Punkt (pI) des betreffenden Ampholyten. Unter diesen Bedingungen liegt der Ampholyt als Zwitter-Ion vor und trägt infolge seiner Elektroneutralität nicht zur Leitfähigkeit der Lösung bei [59]. Gleichzeitig ist die effektive elektrophoretische Mobilität des Ampholyten vernachlässigbar, somit auch das Verdrängungsverhältnis für schnelle Anionen. Daher sind Ampholyten ideal zur Pufferung von Trennelektrolyten für die indirekte Detektion, weil durch diesen Puffer keine Verschlechterung des Verdrängungsverhältnis Analytion/Sondenion erfolgt [59]. Aufgrund dessen kann ein Ampholyt in ausreichenden Konzentrationen zum Trennpuffer zugesetzt werden um eine hohe Pufferkapazität zu gewährleisten.

Da HPTS nur im stark alkalischen pH-Bereich vollständig deprotoniert und somit vierfach negativ geladen vorliegt, sollten in der vorliegenden Arbeit zur Pufferung des BGE-Systems Ampholyte mit einem relativ hohen pI-Wert ausgewählt werden. Dazu zählt die Aminosäure Lysin (pI = 9,7 [59]), die bei den weiteren Messungen zur Pufferung eingesetzt wurde. Die wäßrige Lösung von Lysin (*Sigma*, Taufkirchen, Deutschland) hatte ein pH-Wert von 9,9.

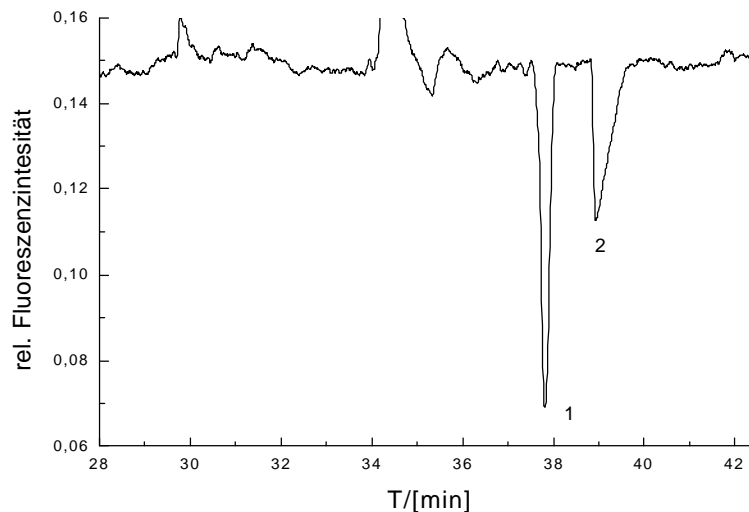
Abbildung 19 zeigt eine Trennung von Azid- und Thiocyanat-Ionen unter Verwendung oben beschriebenen experimentellen Aufbaus (siehe Kapitel 4.3.1)

sowie Lysin zur Pufferung des Trennmediums. Der verwendete Hintergrundelektrolyt hatte folgende Zusammensetzung:

***10 mmol L<sup>-1</sup> Lysin***

***50 µmol L<sup>-1</sup> HPTS***

***pH 9,9***



*Abbildung 19: Trennung von zwei Anionen mit indirekter LIF-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer 10 mmol L<sup>-1</sup> Lysin, 50 µmol L<sup>-1</sup> HPTS, pH 9,9; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 76,5 (60,2) cm, 75 µm I.D.; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode 1 = 452 nm; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar. Analyte: 1 Azid (0,25 mmol L<sup>-1</sup>), 2 Thiocyanat (0,25 mmol L<sup>-1</sup>)*

Aus der Abbildung geht hervor, daß im Unterschied zu den Messungen mit Dinatriumtetraborat als Pufferkomponente bei Verwendung von Lysin ein stabiles Basisliniensignal und vollständig aufgelöste Peaks bei der Trennung von Azid und Thiocyanat erhalten werden. Weiterhin ist jedoch ersichtlich, daß sich unter den vorgestellten Trennbedingungen die Analysenzeiten deutlich verlängert haben, so daß schneller wandernde Anionen wie Nitrat und Nitrit nicht mehr detektiert werden konnten. Dies wird durch die Verringerung der Lineargeschwindigkeit des zur Kathode gerichteten EOF verursacht. Dabei werden nur diejenigen Ionen detektiert, deren Betrag der Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode noch geringer ist als der Betrag der Geschwindigkeit des EOF. Um dieses Problem lösen zu können, musste der EOF unterdrückt oder sogar umgekehrt werden. Dies kann

durch Modifikation der Kapillaroberfläche erreicht werden. So ist es möglich, coelektroosmotisch unter Umpolung der Spannungsquelle zu arbeiten. Unter diesen Bedingungen sind sowohl schnelle als auch langsame Anionen in einem Lauf der Detektion zugänglich.

### 4.3.3 Trennung von fünf Anionen unter Verwendung von HDB als EOF-Modifizier

Zu dynamischen Modifizierung der Kapillaroberfläche wurde 1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylenpolymethobromid (Polybren, HDB) (Abbildung 20) ausgewählt [60].

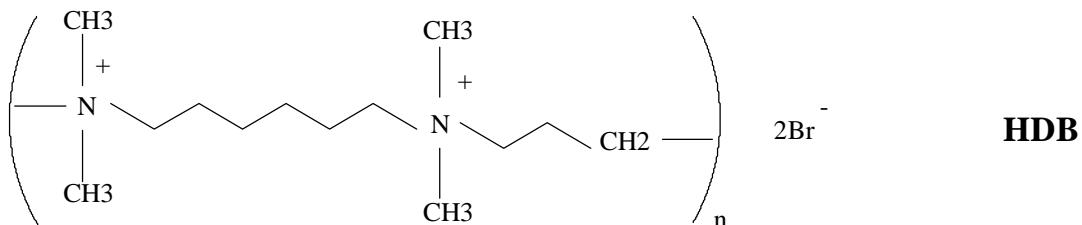


Abbildung 20: Struktur von HDB

Die Kapillare wurde mit der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Pufferlösung, die zusätzlich 0,001 % v/m HDB enthielt, 20 min unter konstanter Druckdifferenz durchgespült. Die Geschwindigkeit des EOF wurde mit Hilfe von Thioharnstoff (polar, und ungeladen) gemessen. Bei einer Spannung von -30 kV war der EOF mit der Geschwindigkeit von  $1,9 \text{ mm s}^{-1}$  zur Anode gerichtet, was auf eine überwiegend positive Ladung der Kapillaroberfläche hindeutet.

Die nachfolgende Abbildung zeigt eine Trennung von fünf Anionen, die in einer auf diese Weise vorbehandelten Kapillare durchgeführt wurde.

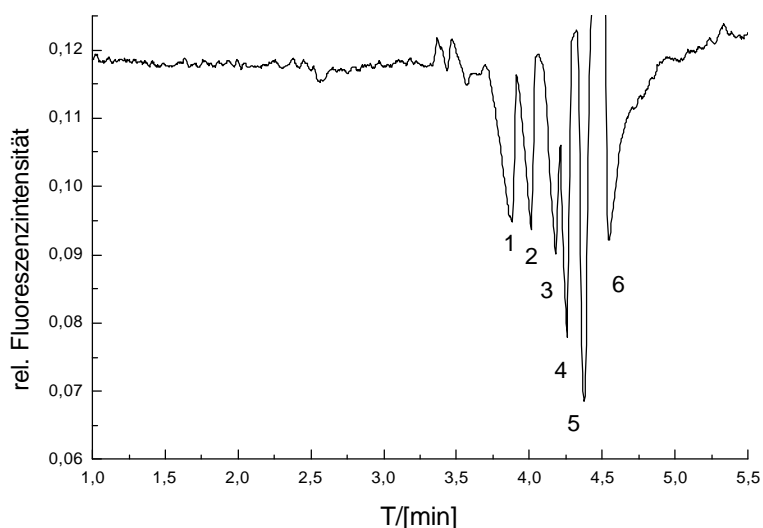


Abbildung 21: Trennung von fünf Anionen mit indirekter LIF-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS, 0,001% HDB, pH 9,9; Trennungsspannung  $-30 \text{ kV}$ ; Kapillarlänge 71,5 (54,0) cm,  $75 \text{ } \mu\text{m}$  I.D.; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar. Analyte: 1 Nitrat ( $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 2 Heptamolybdat ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 3 Azid ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 4 Thiocyanat ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 5 Chlorat ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 6 Systempeak.

Aus Abbildung 21 geht hervor, daß unter Verwendung von HDB zur Modifizierung der Kapillaroberfläche die Retentionszeiten sich deutlich verringert haben. Die Migrationsreihenfolge hat sich umgekehrt. Azid und Thiocyanat sind jedoch nicht bis zur Basislinie getrennt. Außerdem waren bei der Durchführung der Messungen einige Trennparameter nicht wiederholbar. Das Basisliniensignal hat sich nach zehn aufeinanderfolgenden Messungen fast verdoppelt. Außerdem sind die Peakhöhen für alle Analyte um einen Faktor zwei niedriger geworden. Diese Änderungen haben vermutlich mit Adsorptionsprozessen von HPTS an der Kapillaroberfläche zu tun. Um das zu bestätigen, wurden folgende Messungen durchgeführt:

eine Kapillare wurde zunächst 20 Minuten mit einer Lösung von Natronlauge ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) und anschließend 20 Minuten mit der Pufferlösung ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin, 0,001% HDB, pH 9,9) konditioniert. Dann wurde zur Pufferlösung HPTS gegeben, und die Kapillare wurde mit der HPTS-haltigen Pufferlösung ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS, 0,001% HDB, pH 9,9) vollständig gefüllt. Eine Druckdifferenz von 1000 mbar wurde auf die Kapillarenden angelegt, und unter konstanter Druckdifferenz wurde die Kapillare durchgespült. Bei dieser Spülung wurde das

Fluoreszenzsignal aufgenommen. Folgende Abbildung 22 zeigt die dabei beobachtete Änderung des Fluoreszenzsignals.

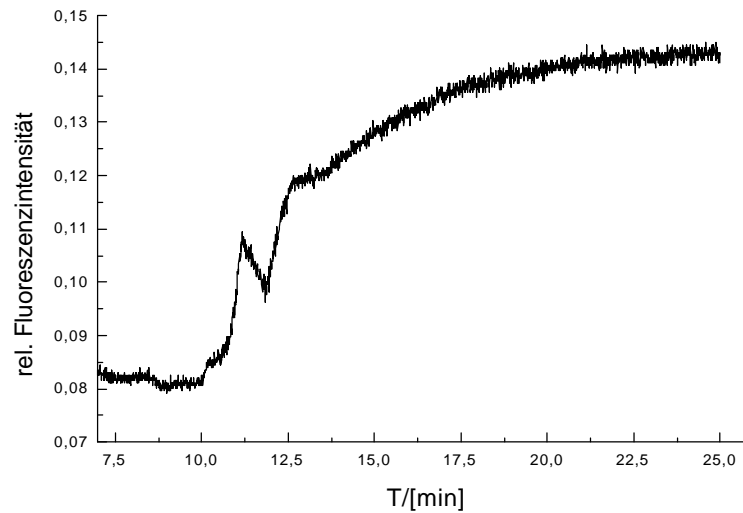


Abbildung 22: Adsorptionseffekt an der Kapillaroberfläche. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS,  $0,001\%$  v/m HDB, pH 9,9; Kapillare  $71,5 (54,0) \text{ cm}$ ,  $75 \text{ } \mu\text{m}$  I.D., vollständig mit dem Trennpuffer gefüllt; Druckdifferenz  $1000 \text{ mBar}$ ; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ .

Aus Abbildung 22 wird deutlich, dass nach der 25-minütigen Spülung der Kapillare eine Zunahme des Fluoreszenzsignals zu beobachten ist. Die Abnahme der Signalintensität bei 12 min und die weitere Zunahme bei 12,5 min waren für zwei aufeinanderfolgende Messungen wiederholbar. Der beobachtete Effekt kann als Bestätigung des Auftretens von Adsorptionsprozessen an der Kapillaroberfläche betrachtet werden.

Eine weitere experimentelle Bestätigung für Adsorption von HPTS an der Kapillaroberfläche stellt folgender Experiment dar (Abbildung 23):

Zu Beginn der Messungen wurde eine mit Natronlauge ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) vorbehandelte Kapillare mit einer Lösung von Lysin ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) und HDB ( $0,001\%$ ) vollständig gefüllt und 5 Minuten unter Druckdifferenz von  $1000 \text{ mbar}$  damit gespült (erste Stufe in Abbildung 24). Danach wurde eine Lösung, die  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin und  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS enthielt, 10 Minuten durch die Kapillare durchgepumpt (zweite Stufe in Abbildung 23), und schließlich wurde die Kapillare mit Milli-Q Wasser



gespült (dritte Stufe in Abbildung 23). Die Änderung des Fluoreszenzsignals ist in Abbildung 24 dargestellt.

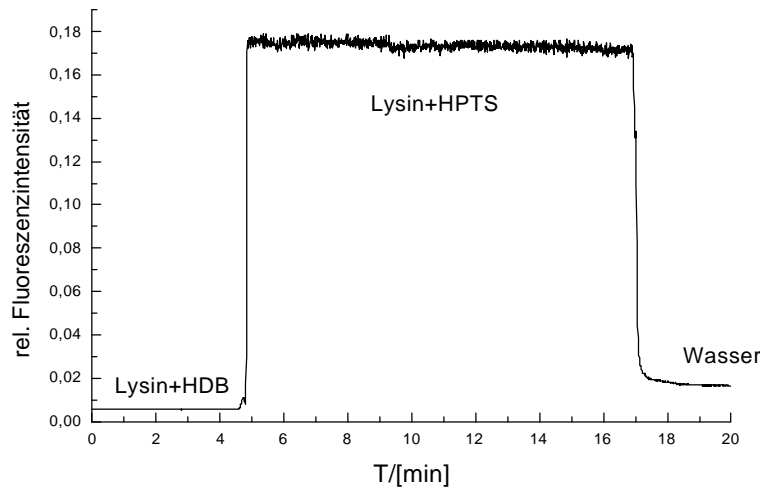


Abbildung 23: Adsorptionseffekt an der Kapillaroberfläche. Messbedingungen: Trennpuffern verschiedene Lösungskombination von  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS,  $0,001\%$  v/m HDB, pH 9,9; Kapillare 71,5 (54,0) cm,  $75 \text{ } \mu\text{m}$  I.D., vollständig mit den verschiedenen Pufferlösungen gefüllt; Druckdifferenz 1000 mbar; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ .

Aus der Abbildung geht hervor, daß das Fluoreszenzsignal nach der Spülung der Kapillare mit einer Mischung aus Lysin und HPTS und anschließend mit Wasser ungefähr dreimal höher ist, als vor der Spülung mit Lysin und HPTS. Das deutet darauf hin, daß HPTS an der Kapillaroberfläche adsorbiert worden ist und erst langsam wieder desorbiert wird.

Zusammenfassend hat sich HDB als ungeeigneter EOF-Modifizierer bei der indirekten Bestimmung anorganischer Anionen mittels LIF-Detektion unter Verwendung von HPTS als Sondenion herausgestellt.

#### 4.3.4 Trennung von vier Anionen unter Verwendung von CTAB als EOF-Modifizierer

Als weiterer EOF-Modifizierer wurde das Tensid Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) getestet (Abbildung 24). Dieses kationische Tensid kann ähnlich wie HDB durch die Adsorption an der

Kapillaroberfläche und Bildung von Hemimizellen die Richtung und Geschwindigkeit des EOF beeinflussen [54].

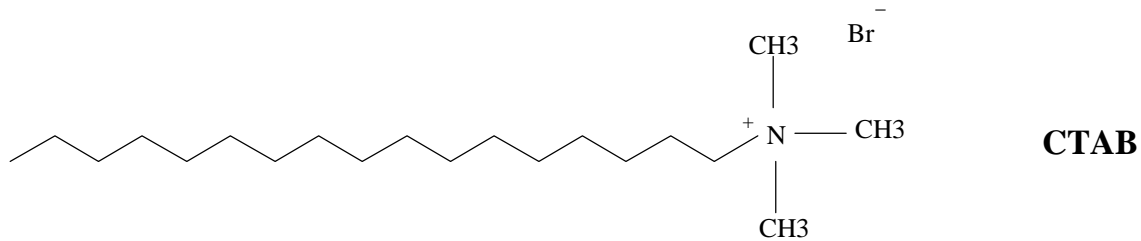


Abbildung 24: Struktur von CTAB

Mit einer Pufferlösung, welche CTAB in einer Konzentration von  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  enthielt, wurde die Kapillare 20 min gespült. Danach wurde die Geschwindigkeit des EOF mit Hilfe von Thioharnstoff bestimmt. Bei einer Spannung von  $-30 \text{ kV}$  war der EOF zur Anode mit der Geschwindigkeit von  $2,0 \text{ mm/s}$  gerichtet.

Abbildung 25 zeigt eine Trennung von vier Anionen unter Verwendung einer mit CTAB vorbehandelten Kapillare.

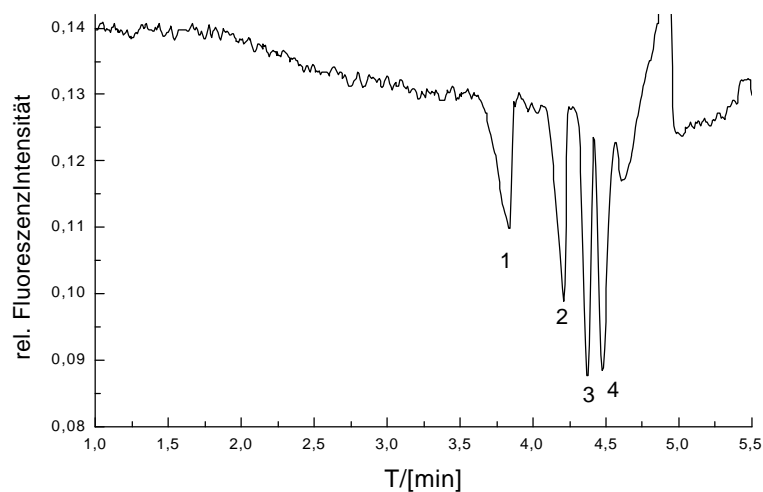


Abbildung 25: Trennung von vier Anionen mit indirekter LIF-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS,  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB, pH 9,9; Trennungsspannung  $-30 \text{ kV}$ ; Kapillarlänge 71,5 (54,0)cm,  $75 \mu\text{m}$  I.D.; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar. Analyte: **1** Nitrat ( $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **2** Heptamolybdat ( $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **3** Azid ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **4** Thiocyanat ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ )

Durch Abbildung 25 wird ersichtlich, daß unter Verwendung von CTAB als EOF-Modifizier eine schnelle Trennung der vier Anionen möglich ist. Jedoch waren die Trennparameter hierbei auch wie im Fall von HDB nicht reproduzierbar, nach ungefähr zehn aufeinanderfolgenden Trennungen nahm die Intensität des Basisliniensignals zu. Gleichzeitig wurde eine Abnahme der Peakhöhen für alle Analyte beobachtet. Vermutlich ist hier eine wie im Fall von HDB schon beobachtete Adsorption von HPTS an der Kapillaroberfläche aufgetreten. Um das zu bestätigen, wurde eine mit Natronlauge ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) und anschließend mit der Pufferlösung ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB, pH 9,9) vorbehandelte Kapillare mit einer Lösung, die CTAB und HPTS enthielt, vollständig gefüllt und unter einer konstanter Druckdifferenz von 1000 mbar 10 Minuten gespült. Bei dieser Spülung wurde das Fluoreszezsinal aufgenommen. Die Zunahme des Signals ist in Abbildung 26 dargestellt.

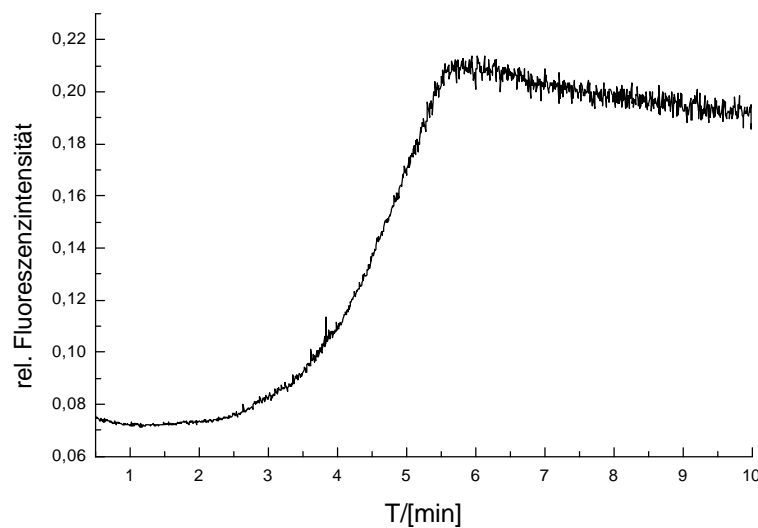


Abbildung 26: Absorptionseffekt an der Kapillaroberfläche. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS,  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  CTAB, pH 9,9; Kapillare 71,5 (54,0) cm,  $75 \mu\text{m}$  I.D., vollständig mit dem Trennpuffer gefüllt; Druckdifferenz 1000 mbar; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ .

Der Verlauf des aufgezeichneten Fluoreszenz-Signals in Abbildung 26 lässt darauf schließen, daß CTAB genauso wie HDB an der Kapillaroberfläche adsorbiert wird. Die registrierte Fluoreszenzintensität steigt während der Spülung von 0,07

apparativen Einheiten auf 0,21 Einheiten, was CTAB als EOF-Modifizier für diese Anwendung ausschließt.

#### **4.3.5 Trennung von acht Anionen unter Verwendung einer durch kovalent fixiertes Polymer innenbeschichteten Kapillare**

Eine andere Möglichkeit den EOF zu kontrollieren, ist die Belegung der Kapillaroberfläche mit einem Polymer. Gleichzeitig wird dadurch die mögliche Adsorption von Probenbestandteilen oder Bestandteilen des Hintergrundelektrolyten an der Kapillaroberfläche stark vermindert. Damit wird auch die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der Analyse verbessert. Dieses Verfahren wird sehr oft bei der kapillarelektrophoretischen Trennung von Proteinen eingesetzt, um deren Adsorption an der Kapillarwand zu verhindern [9].

Für die chemische Belegung von Kapillaren stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Eine davon ist die Beschichtung der Kapillare durch lineares Polyacrylamid. Polyacrylamid ist hierbei kovalent an die Kapillaroberfläche gebunden und führt durch seine hohe Viskosität zur kompletten Eliminierung des EOF [61].

In der vorliegenden Arbeit wurde folgendes Verfahren zur Beschichtung der Kapillare gewählt:

##### **Vorbehandlung**

Zur Vorbehandlung wurde eine unbeschichtete Quarzglas-Kapillare mit verschiedenen Lösungen unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe gespült. Die Zusammensetzung der Spülflüssigkeit sowie die Spüldauer sind im folgenden aufgelistet:

- a) Aceton, 15 min
- b)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  Salzsäure, 15 min
- c)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  Natronlauge, 15 min
- d) 30 min mit Kapillarenden in der Natronlauge-Lösung stehen gelassen
- e) Milli-Q Wasser, 15 min
- f) Aceton, 15 min
- g) Luft, 30 s

- h) 30% (v/v) Bindsilan\* in Aceton gelöst, 15 min
- i) über Nacht mit Kapillarenden im Bindsilan-Gemisch stehen gelassen
- j) Aceton, 10 min
- k) Milli-Q Wasser, 10 min

\* (Bindsilan - Methacrylsäure-3-trimethoxysilylpropylester)

### **Beschichtung**

Zur Beschichtung der vorbehandelten Kapillare wurde eine Lösung von Acrylamid (4% (w/V)) in Phosphatpuffer (50 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumhydrogenphosphat, 50 mmol L<sup>-1</sup> Natriumdihydrogenphosphat, pH 7,0) hergestellt und anschließend durch Unterdruck entgast. Zu der entgasten Acrylamid-Lösung wurden 7 µL der wäßrigen TEMED\*- (10% (v/v)) sowie 7 µl der wäßrigen APS\*-Lösung (10% (w/v)) zugegeben.

Die vorbehandelte Kapillare wurde mit dem Gemisch unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe 20 min gespült. Die Enden der Kapillare wurden mit Silikonpaste verschlossen, und die gefüllte Kapillare wurde über Nacht liegen gelassen. Anschließend wurde die Silikonpaste mit Hilfe von Aceton entfernt, und die Kapillarenden wurden um etwa 1 cm gekürzt. Das in der Kapillare entstandene Gel wurde mit Wasser unter Verwendung einer HPLC-Pumpe (100 bar) herausgepreßt. Danach wurde die Kapillare mit Luft getrocknet.

\* (TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, APS = Ammoniumperoxodisulfat)

Für weitere elektrophoretische Trennungen wurden so modifizierte Kapillaren, die keinen EOF mehr vorweisen, eingesetzt. Da die Polyacrylamidschicht thermisch nicht stabil ist, stellt die Bildung eines Detektionsfensters durch Abbrennen der Polyimidschicht in der Kapillare ein Problem dar. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit die Bildung des Detektionsfensters durch Entfernen der Polyimidschicht mit Hilfe eines Skalpell vorgenommen.

In einer mit Polyacrylamid beschichteten Kapillare wurde eine Trennung von acht anorganischen Anionen durchgeführt (Abbildung 27). Um Trennbedingungen zu optimieren, wurde die Konzentration von Lysin im Trennpuffer im Bereich von 5 bis 15 mmol L<sup>-1</sup> sowie die von HPTS im Bereich von 25 bis 100 µmol L<sup>-1</sup> variiert.

Für die zwei Pufferbestandteile gilt, daß das Signal/Rausch-Verhältnis sich mit abnehmender Konzentrationen an Lysin und an HPTS verbessert. Einschränkend ist jedoch hinzuzufügen, daß der Systempeak bei niedrigen Konzentrationen von Lysin oder HPTS mit relevanten Analytionen komigriert. Daher wurden mittlere Konzentrationen für die beiden Pufferbestandteile gewählt, die mit denen bei den Messungen in einer unbeschichteten Kapillare identisch waren.

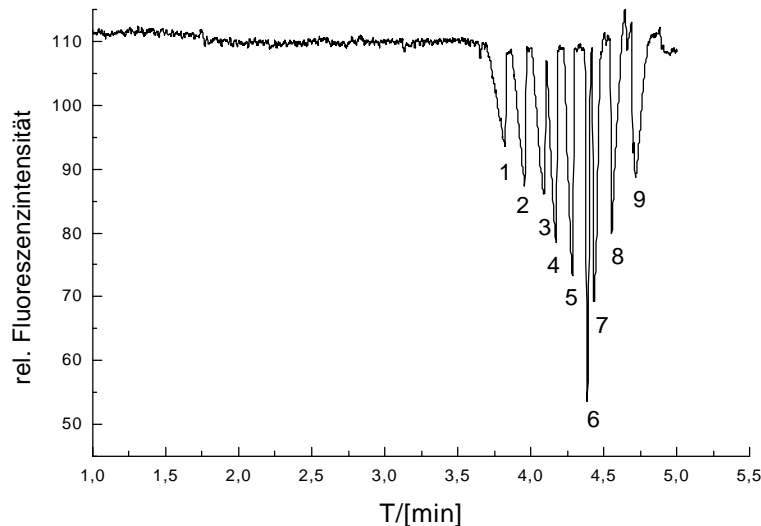


Abbildung 27: Trennung von acht Anionen mit indirekter LIF-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS, pH 9,9; Trennungsspannung  $-30 \text{ kV}$ ; mit Polyacrylamid beschichtete Kapillare, Kapillarlänge 71,5 (54,0) cm,  $75 \text{ } \mu\text{m}$  I.D.; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar. Analyte: **1** Bromid ( $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **2** Sulfat ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **3** Nitrit ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **4** Nitrat ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **5** Heptamolybdat ( $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **6** Azid ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **7** Thiocyanat ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **8** Chlorat ( $0,025 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **9** Systempeak.

Aus Abbildung 27 wird deutlich, daß unter Verwendung einer chemisch modifizierten Kapillare das Signal/Rausch-Verhältnis, die Stabilität des Basisliniesignals sowie die Auflösung der Peaks sich deutlich verbessert haben. Die mit den EOF-Modifiern (HDB und CTAB) beobachtete Steigung des Basisliniensignals ist hierbei nicht aufgetreten. Das lässt darauf schließen, daß bei den unter Verwendung von Polyacrylamid innenbeschichteten Kapillaren keine Adsorption des HPTS an der Kapillaroberfläche stattfindet.

In Tabelle 6 sind die elektrophoretischen Mobilitäten für die getrennten Anionen sowie für HPTS unter Annahme eines vernachlässigbaren EOF ( $\mu_{eo} = 0$ ) dargestellt. Die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität von HPTS wurde durch die Injektion einer Probe mit  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS in Wasser durchgeführt. Zur Berechnung der Beweglichkeiten wurden Gleichungen 25 und 26 verwendet.

$$m_{obs} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{V \cdot t_m} \quad (25)$$

$\mu_{obs}$  = beobachtete Mobilität

$L_{eff}$  = effektive Kapillarlänge

$L_{ges}$  = gesamte Kapillarlänge

$V$  = Trennungsspannung

$t_m$  = Migrationszeit

$$m_{ep} = m_{obs} - m_{eo} \quad (26)$$

$\mu_{ep}$  = elektrophoretische Mobilität

$\mu_{eo}$  = elektroosmotische Mobilität

*Tabelle 6: Berechnete elektrophoretische Mobilitäten für mehrere ausgewählte anorganische Anionen sowie für HPTS. Experimentelle Bedingungen siehe Abbildung 27.*

<b>Anion</b>	<b><math>\mu_{ep} [10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]</math></b>
<b>Bromid</b>	-5,73
<b>Sulfat</b>	-5,54
<b>Nitrit</b>	-5,32
<b>Nitrat</b>	-5,24
<b>Heptamolybdat</b>	-5,11
<b>Azid</b>	-4,99
<b>Thiocyanat</b>	-4,94
<b>Chlorat</b>	-4,83
<b>HPTS</b>	-5,02

Wie aufgrund der Peakformen (siehe Abbildung 27) zu erwarten war, liegt die elektrophoretische Mobilität von HPTS in der gleichen Größenordnung wie die der getrennten anorganischen Anionen und ist mit der elektrophoretischen Mobilität von Azid nahezu gleich, was die symmetrische Peakform für Azid erklärt.

Für die in Abbildung 27 dargestellte Trennung wurden die Wiederholpräzision der Migrationszeiten, der Peakflächen, der Peakhöhen, sowie die Trennstufenzahlen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 präsentiert.

*Tabelle 7: Wiederholpräzision der Migrationzeiten, der Peakhöhen, der Peakflächen, sowie die Trennstufenzahlen bei der Bestimmung von acht Anionen in einer mit Polyacrylamid innenbeschichteten Kapillare für fünf aufeinanderfolgende Trennungen (Versuchsbedingungen sind aus Abbildung 27 zu entnehmen)*

<i>Anion</i>	<i>F</i>	<i>RSD, [%]</i>	<i>t<sub>m</sub></i>	<i>RSD, [%]</i>	<i>H</i>	<i>RSD, [%]</i>	<i>N</i>
<b>Bromid</b>	0,00114	7,9	3,82	0,67	0,0182	1,3	12600
<b>Sulfat</b>	0,00066	9,2	3,95	0,59	0,0153	3,7	24000
<b>Nitrit</b>	0,00115	4,6	4,09	1,0	0,0205	4,9	30600
<b>Nitrat</b>	0,00126	2,9	4,17	0,64	0,0310	2,2	31800
<b>Heptamolybdat</b>	0,00146	3,6	4,28	0,66	0,0370	2,6	50100
<b>Azid</b>	0,00113	6,5	4,39	0,60	0,0575	3,0	171000
<b>Thiocyanat</b>	0,00128	5,2	4,44	0,75	0,0410	4,2	89000
<b>Chlorat</b>	0,00114	5,1	4,56	0,63	0,0330	5,5	56800

F = mittlere Peakfläche

t<sub>m</sub> = mittlere Migrationszeit

H = mittlere Peakhöhe

RSD = relative Standardabweichungen

N = mittlere Trennstufenzahl.

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß die Migrationszeiten eine ausreichend hohe Wiederholpräzision aufweisen. Die Trennstufenzahlen sind aufgrund der unterschiedlichen Relation der elektrophoretischen Mobilitäten der Analytmolekülen zur elektrophoretischen Mobilität des BGE für die einzelnen



Analyte stark unterschiedlich. Dies ist jedoch prinzipbedingt und trifft auf alle indirekten Detektionsmethoden in der CE zu.

#### 4.3.6 Photometrische Bestimmung von acht Anionen in einer mit Polyacrylamid innenbeschichteten Kapillare

Um die Nachweisstärke des verwendeten Fluoreszenz-Detektors einschätzen zu können, wurde eine Referenzmessung mit einem handelsüblichen photometrischen Detektor mit einer mit Polyacrylamid innenbeschichteten Kapillare durchgeführt. Die Parameter der Injektion und der Trennung waren konstant gehalten worden (siehe Abbildung 27). Die Meßwellenlänge lag im Absorptionsmaximum von HPTS und betrug 454 nm. In Abbildung 28 ist das entsprechende Elektropherogramm dargestellt.

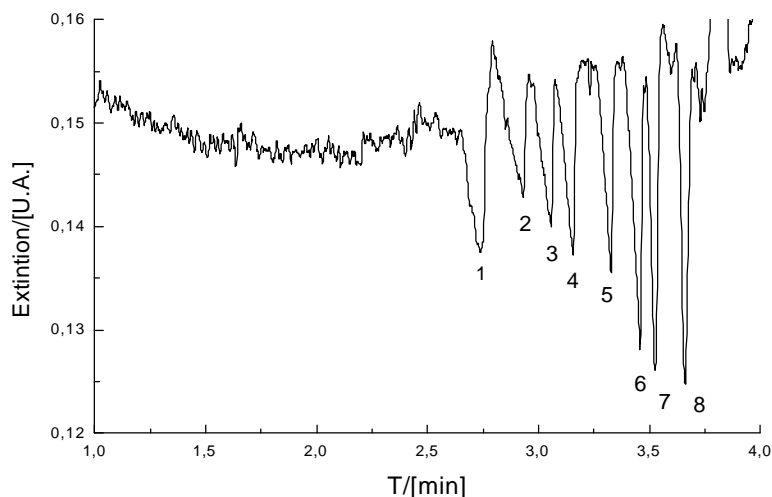


Abbildung 28: Trennung von acht Anionen mit indirekter photometrischer Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS, pH 9,9; Trennungsspannung  $-30 \text{ kV}$ ; Acrylamid beschichtete Kapillare, Kapillarlänge  $54,5 (38,5) \text{ cm}$ ,  $75 \text{ } \mu\text{m}$  I.D.; photometrische Detektion  $\lambda = 454 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch  $3 \text{ s } 25 \text{ mbar}$ . Analyte: **1** Bromid ( $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **2** Sulfat ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **3** Nitrit ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **4** Nitrat ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **5** Heptamolybdat ( $0,005 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **6** Azid ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **7** Thiocyanat ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), **8** Chlorat ( $0,025 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Da die bei der LIF-Detektion verwendete Länge der Kapillare nicht mehr gegeben war, mußten die Messungen mit einer kürzeren Kapillare durchgeführt werden. Dadurch wurde die Probenzone bei kürzerer Kapillare im Vergleich zu der bei

längerer Kapillare verlängert. Aufgrund dessen können die mit den zwei Detektionsarten erzielbaren Nachweisgrenzen nur bedingt verglichen werden.

In Tabelle 8 sind die Nachweisgrenzen für die getrennten Anionen bei Fluoreszenz- und UV-VIS-Detektion gegenüber gestellt.

*Tabelle 8: Vergleich der Nachweisgrenzen für ausgewählte Anionen ermittelt durch indirekte Fluoreszenz- bzw. indirekte photometrische Detektion. Die experimentellen Bedingungen für die Fluoreszenz-Detektion sind wie in Abbildung 27. Die experimentellen Bedingungen für die photometrische Detektion entsprechen denen in Abbildung 28.*

<b>Anionen</b>	<b>Fluoreszenz-Detektor</b> <b>[<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>]</b>	<b>Fluoreszenz-Detektor</b> <b>[<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>]</b>	<b>UV-VIS-Detektor</b> <b>[<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>]</b>	<b>UV-VIS-Detektor</b> <b>[<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>]</b>
<b>Bromid</b>	18	1460	48	3870
<b>Sulfat</b>	2,5	240	14	1330
<b>Nitrit</b>	4,7	216	24	1100
<b>Nitrat</b>	3,7	229	19	1190
<b>Heptamolybdat</b>	0,15	158	0,81	858
<b>Azid</b>	1,0	44,0	6,4	280
<b>Thiozyanat</b>	1,4	81,2	5,3	307
<b>Chlorat</b>	0,88	73,5	2,7	245

Aus Tabelle 8 kann entnommen werden, daß unter den für indirekte Fluoreszenz-Detektion optimierten Trennbedingungen die Nachweisgrenzen bei der indirekten Fluoreszenz-Detektion um einen Faktor drei bis sechs niedriger sind, als bei der indirekten photometrischen Detektion. Hierbei es ist anzunehmen, daß bei identischer Gesamtlänge der Kapillare die Nachweisgrenzen für die indirekte photometrische Detektion noch ungünstiger ausgefallen wären.

#### **4.3.7 Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen für ausgewählte Anionen**

Zur weiteren Überprüfung der Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode wurde für die acht getrennten Anionen eine Kalibration durchgeführt. Ausgehend von acht Stammlösungen (Konzentration von 0,1 bis 2,5 mmol L<sup>-1</sup>) wurden durch

Verdünnung mit dem Milli-Q Wasser 24 Lösungen (Analytkonzentration von 0,5 bis 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) mit der Mischung von je zwei Anionen, hergestellt. Die Kalibration wurde unter den in Abbildung 27 dargestellten Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 29 sind die Kalibriergeraden für Nitrit und Azid als Beispiel präsentiert.

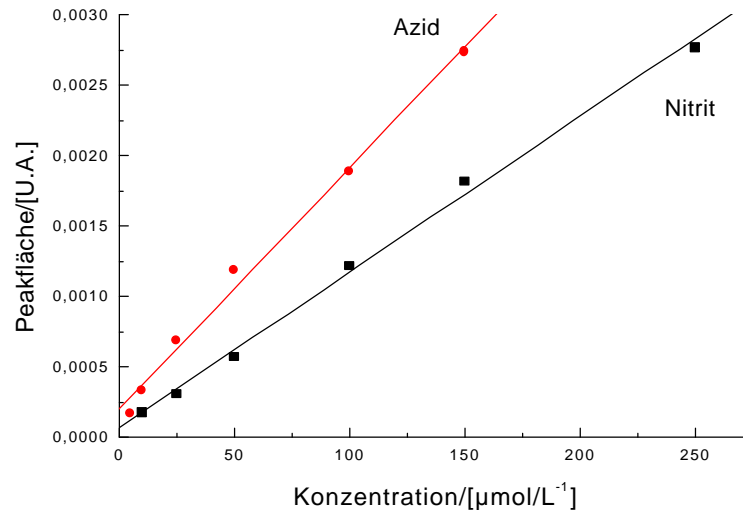


Abbildung 29: Kalibriergeraden für Nitrit- und Azid. Trenn- und Detektionsbedingungen siehe Abbildung 27.

Die Linearität einer Kalibrierfunktion kann mit Hilfe des Anpassungstests nach *Mandel* (F-Test) überprüft werden. Dieser basiert auf einem Vergleich der Reststandardabweichung der möglichen linearen ( $s_{y1}$ ) und quadratischen ( $s_{y2}$ ) Kalibrierfunktion mit einem tabellierten F-Prüfwert [62]. Mit Hilfe der aus den Regressionsrechnungen ermittelten  $s_{y1}$  und  $s_{y2}$  Werten kann mit Gleichung 27 und 28 der Prüfwert PW berechnet werden.

$$F_{ber} = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (27)$$

$$DS^2 = (N-2) \cdot s_{y1}^2 - (N-3) \cdot s_{y2}^2 \quad (28)$$

N = Zahl der Punkte der Kalibrierfunktion

In Tabelle 9 ist der Vergleich von berechneten F-Werten  $F_{ber}$  und von tabellierten F-Werten  $F_{tab}$  [63] für die Kalibrierfunktionen der getrennten Anionen dargestellt.

*Tabelle 9: F-Test für die Kalibrierfunktion von der getrennten Anionen  
(Signifikanzniveau 95%)*

<i>Anion</i>	<i>N</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>F<sub>ber</sub></i>	<i>F<sub>tab</sub>(95%,1,3)</i>
<b>Bromid</b>	6	0,9983	0,35	10,13
<b>Sulfat</b>	6	0,9973	1,43	10,13
<b>Nitrit</b>	6	0,9982	4,23	10,13
<b>Nitrat</b>	6	0,9959	0,61	10,13
<b>Heptamolybdat</b>	6	0,9978	2,91	10,13
<b>Azid</b>	6	0,9972	2,05	10,13
<b>Thiocyanat</b>	6	0,9950	8,12	10,13
<b>Chlorat</b>	6	0,9974	5,91	10,13

Die Tabelle zeigt, dass durch eine Kalibrierfunktion zweiten Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht werden kann und somit die Linearität der Kalibrierfunktionen angenommen werden darf.

#### **4.3.8 Übertragbarkeit der Methode auf Realproben**

Um vollständig die Methode zu charakterisieren, musste ihre Anwendbarkeit für reale matrixbehaftete Proben überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Trinkwasserproben und zwei Leitungswasserproben mit dem entwickelten CE-Verfahren analysiert.

Unter den in Abbildung 27 dargestellten Bedingungen komigrieren Chlorid und Sulfat. Da es bekannt ist, dass sowohl Trinkwasser als auch Leitungswasser Sulfat- und Chlorid-Ionen enthalten, war es notwendig, die Methode weiter zu optimieren, um die beiden Anionen trennen zu können. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Zugabe zweifach geladener Kationen zum Trennpuffer zu einer selektiven Abnahme der elektrophoretischen Mobilität des Sulfat-Ions vermutlich durch

Bildung von Komplexen führt. *Groh* und *Bächmann* [64] haben berichtet, daß es durch Zusatz von Bleiacetat zum BGE bei der Bestimmung von anorganischen und organischen Anionen mittels CE mit indirekter Fluoreszenzdetektion gelang, die Migrationszeit von Sulfat selektiv zu verschieben während die Migrationszeiten für Nitrat und Chlorid in erster Näherung unverändert waren. In der Arbeit von *Röder* und *Bächmann* [37] wurde eine selektive Abnahme der Mobilität des Sulfat-Ions durch Bildung von Assoziaten mit  $\text{Ba}^{2+}$  beobachtet, wodurch die Trennung von Nitrat und Sulfat (die zuvor komigrierten) in einem Trennpuffer der  $70 \mu\text{mol L}^{-1}$  Bariumhydroxid enthielt, ermöglicht wurde.

Um den Zusatz toxischer Kationen zum Trennpuffer zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit Calciumhydroxid zur selektiven Beeinflussung der elektrophoretischen Mobilität des Sulfat-Ions gewählt. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, erhöht sich die Migrationszeit für Sulfat selektiv. Die Konzentration von Calciumhydroxid wurde so niedrig wie möglich bei  $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$  gehalten. Bei dieser Konzentration ist die Trennung von Chlorid-, Sulfat- und Nitrat-Ionen möglich. Hierbei ist zu vermerken, daß unter den genannten Bedingungen eine Aufspaltung des Chlorid-Peaks in zwei Peaks mit konstantem Flächenverhältnis unabhängig von der Konzentration von Chlorid in der Probe beobachtet wurde. Der zweite Peak komigriert mit dem Sulfat-Peak. Daher mußte für quantitative Analysen die Fläche des Sulfat-Peaks um die Fläche des komigrierenden zweiten Chlorid-Peaks korrigiert werden. Dies war möglich, da die Fläche des ersten Chlorid-Peaks störungsfrei korrekt bestimmt werden konnte.

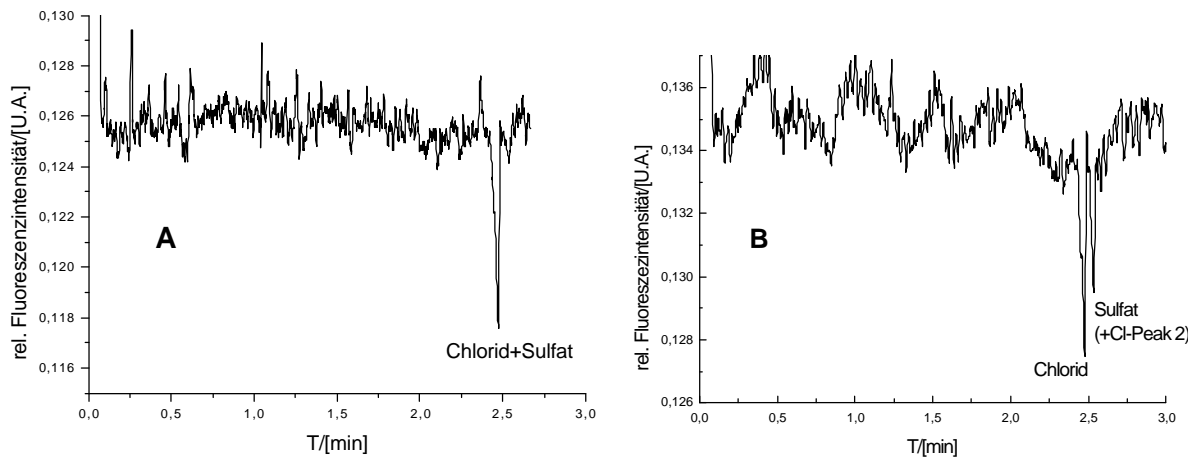


Abbildung 30: Trennung von Chlorid und Sulfat mit indirekter Fluoreszenz-Detektion **A** ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ; **B** mit  $\text{Ca}^{2+}$ . Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS,  $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$  Calciumhydroxid (im Fall von **B**), pH 9,9; Trennungsspannung  $-30 \text{ kV}$ ; beschichtete Kapillare, Kapillarlänge 54,0 (38,5) cm,  $75 \mu\text{m}$  I.D.; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar.

Bei der in Abbildung 30 B genannten Pufferzusammensetzung wurde eine Analyse von vier Realproben durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Leistungswasser aus der Stadt Amöneburg und aus der Stadt Marburg entnommen und mit dem Milli-Q Wasser um einen Faktor zwei verdünnt. Außerdem wurde das käufliche Trinkwasser Bonaqa sowie das Mineralwasser Selters Leicht nach Verdünnung um einen Faktor zwanzig kapillarelektrophoretisch analysiert. In den Abbildungen 31 und 32 sind die entsprechenden Elektropherogramme dargestellt.

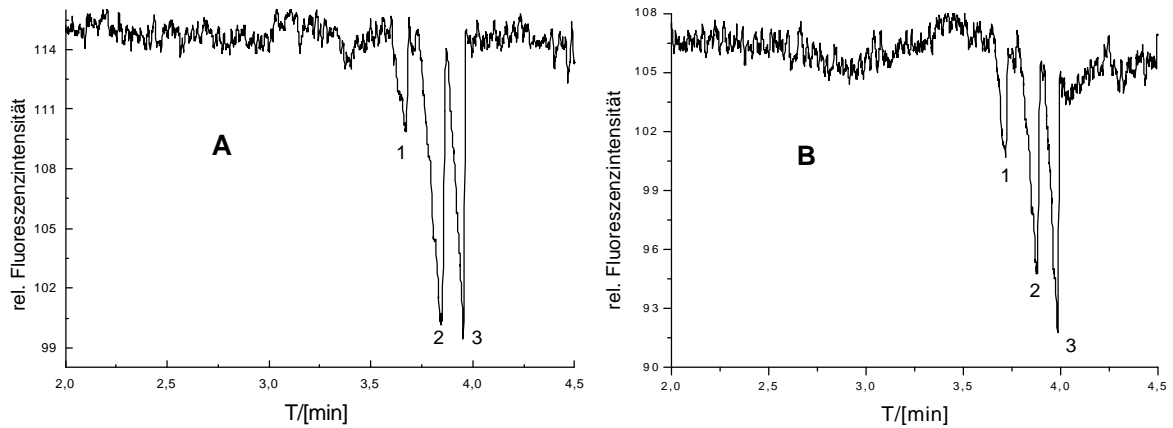


Abbildung 31: Analyse von Leitungswasser aus **Marburg** (A) und aus **Amöneburg** (B) mit indirekter LIF-Detektion nach kapillarelektrophoretischer Trennung. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS,  $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$  Calciumhydroxid, pH 9,9; Trennungsspannung  $-30 \text{ kV}$ ; beschichtete Kapillare, Kapillarlänge 71,5 (54,0) cm,  $75 \text{ } \mu\text{m}$  I.D.; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar. Analyte: **1** Chlorid, **2** Sulfat, **3** Nitrat.

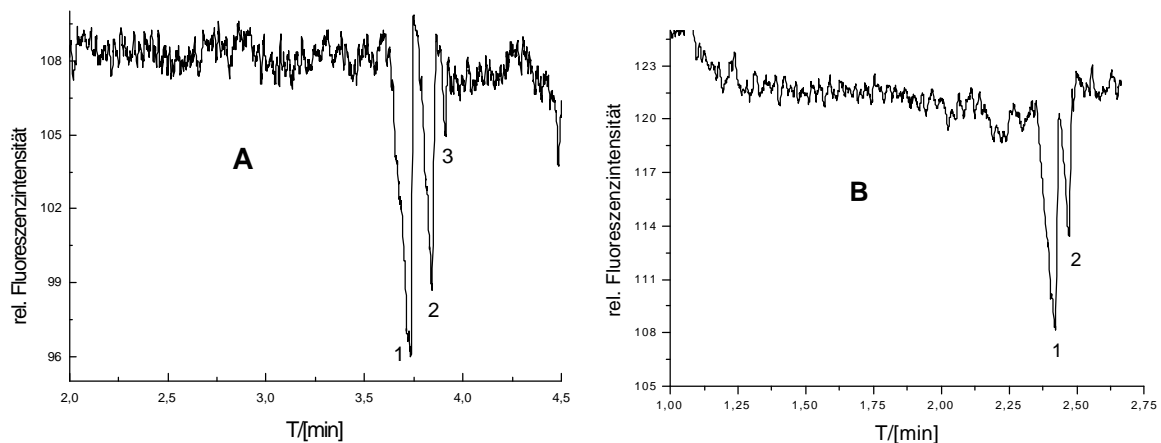


Abbildung 32: Analyse der Mineralwässer **Bonaqa** (A) und **Selters Leicht** (B) mit indirekter LIF-Detektion nach kapillarelektrophoretischer Trennung. Messbedingungen: Trennpuffer  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Lysin,  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  HPTS,  $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$  Calciumhydroxid, pH 9,9; Trennungsspannung  $-30 \text{ kV}$ ; beschichtete Kapillare, Kapillarlänge 71,5 (54,0) cm bei A und 54,0 (38,5) cm bei B,  $75 \text{ } \mu\text{m}$  I.D.; Fluoreszenzanregung frequenzverdoppelte Laserdiode  $\lambda = 452 \text{ nm}$ ; Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s 25 mbar. Analyte: **1** Chlorid, **2** Sulfat, **3** Nitrat.

Die Identifizierung der einzelnen Anionen wurde durch einen Vergleich der Migrationszeiten durchgeführt. Die aus dem Vergleich erhaltene

Elutionsreihenfolge wurde zusätzlich durch die Zugabe von Einzelstandards abgesichert. Konzentrationen der Analytionen wurden durch externes Kalibrierkurvenverfahren bestimmt. Die Kalibrierfunktionen für Nitrat und Sulfat für einen Calciumhydroxid enthaltenden Trennpuffer wurden erneut bestimmt. Zu diesem Zweck wurden sechs Standardlösungen mit Analytkonzentrationen von 50 bis 245  $\mu\text{mol/L}$  verwendet, die Linearität der Kalibrierfunktion wurde mit Hilfe des F-Tests überprüft (siehe Kapitel 4.3.7). Für die Kalibriermessungen für Chlorid (2 Peaks) wurden Standardlösungen mit der Analytkonzentrationen von 0,25 bis 1,25  $\text{mmol/L}$  verwendet, auch in diesem Fall wurde Linearität der Kalibrierfunktion mit Hilfe des *Mandels* Tests gesichert.

Zur Kontrolle wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Seubert (Universität-Marburg) eine Ionenchromatographie-Referenzanalyse (IC) der vier Realproben durchgeführt. Hierbei wurde ein Ionenchromatographie-System *Compact IC 761* der Firma *Metrohm* (Herisau, Schweiz) mit einem Supressor, einem Leitfähigkeitsdetektor und geeigneter Meßsoftware verwendet. Die Abmessungen der Trennsäule (*Shodex 61504D*) betragen  $4 \times 150$  mm. Die mobile Phase bestand aus einer wäßrigen Lösung von 3,2  $\text{mmol L}^{-1}$  Dinatriumcarbonat und 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  Natriumhydrogencarbonat. Die Fließgeschwindigkeit betrug  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  und das Injektionsvolumen 20  $\mu\text{L}$ . Die registrierten Peaks wurden durch einen Vergleich der Retentionszeiten den Analytionen zugeordnet. Die Konzentrationen der Analytionen (Fluorid, Chlorid, Bromid, Nitrat, Nitrit, Sulfat, Phosphat) wurden durch ein externes Kalibriergeradenverfahren bestimmt. Dabei wurden wäßrige Standardlösungen von Fluorid, Chlorid, Bromid, Nitrat, Sulfat und Phosphat mit Konzentrationen von 1 bis 10  $\text{mg L}^{-1}$  verwendet. Die Konzentrationen der Standardlösungen von Nitrit betragen 0,05 bis 0,2  $\text{mg L}^{-1}$ . Alle Standardlösungen wurden durch Verdünnung von Stammlösungen mit Wasser hergestellt.

In Tabelle 10 ist der Vergleich der mit CE/Fluoreszenz-Detektion und IC/Leitfähigkeits-Detektion ermittelten Konzentrationen für mit diesen Verfahren bestimmbare Anionen in der Wasserproben dargestellt.



*Tabelle 10: Vergleich der mit der CE-LIF-Detektion (CE-LIF-D) und IC-Leitfähigkeit-Detektion (IC-L-D) ermittelten Konzentrationen an Anionen in mg L<sup>-1</sup> in der Wasserproben.*

<i>Anion</i>	<i>Leitungswasser Marburg</i>		<i>Leitungswasser Amöneburg</i>		<i>Bonaqa</i>		<i>Selters Leicht</i>	
	<i>CE-LIF-D</i>	<i>IC-L-D</i>	<i>CE-LIF-D</i>	<i>IC-L-D</i>	<i>CE-LIF-D</i>	<i>IC-L-D</i>	<i>CE-LIF-D</i>	<i>IC-L-D</i>
<b>Fluorid</b>	-*	0,4	-*	0,4	-*	0,4	-*	1,1
<b>Chlorid</b>	18,5±4,2	25,1	16,3±2,2	23,8	305,0±16,2	282,9	280,0±20,2	254,8
<b>Bromid</b>	-*	0,2	-*	0,2	-*	n.n.	-*	0,3
<b>Nitrate</b>	14,5±0,7	14,3	9,3±1,1	9,9	6,2±0,5	6,7	n.n.	0,3
<b>Sulfat</b>	34,7±3,1	34,2	21,4±1,9	22,6	57,6±3,5	58,3	30,0±5,4	23,3

n.n - nicht nachweisbar

\* - kann mit dem CE-Verfahren nicht bestimmt werden

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die ermittelten Ionenkonzentrationen für beide angewendeten Verfahren für alle Realproben mit Ausnahme der ermittelten Konzentrationen für Chlorid-Anionen im Leitungswasser aus Amöneburg und Marburg (hier Störung durch hohe Sulfat-Konzentration) gut übereinstimmen.

## 5 Entwicklung eines kompakten und robusten Nahfeld-Thermische-Linse-Kapillarelektrophorese-Detektors zur Detektion im tiefen UV

### 5.1 Einleitung

Die Aufgabenstellung für den weiteren Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Eignung der Nahfeld-Thermische-Linse-Detektion für kapillarelektromigrative Methoden zu demonstrieren und der UV-Detektion gegenüber zu stellen. Zu diesem Zweck sollte ein neuentwickelter Nahfeld-Thermische-Linse-Detektor (NTLD), der für die Detektion in der Kapillare geeignet ist, charakterisiert und getestet werden. Als weiteres Ziel sollten die Leistungsparameter des charakterisierten Detektors am Beispiel der Bestimmung von nitroaromatischen Verbindungen erfasst werden.

### 5.2 Aufbau des Thermische-Linse-CE-Detektors

Den schematischen Aufbau des in Vorarbeiten am Forschungszentrum Karlsruhe entwickelten Thermische-Linse-Detektors für die Kapillarelektrophorese zeigt Abbildung 33.

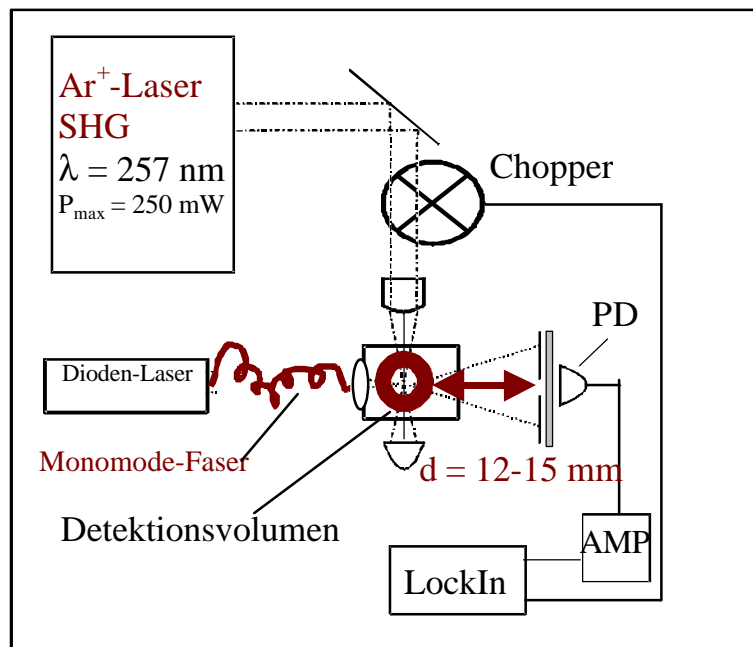


Abbildung 33: Schematischer Aufbau des Thermische-Linse-Detektors für die Kapillarelektrophorese. Ar<sup>+</sup> SHG -frequenzverdoppelter Argonionenlaser, PD-Photodiode, AMP-Amplifier (Verstärker).

Als Anregungslaser diente ein frequenzverdoppelter Argon-Ionen-Laser bei einer Wellenlänge von 257 nm mit einer maximalen Laserleistung von 250 mW am Laserausgang. Die Modulation des Anregungslaserstrahls erfolgte durch einen mechanischen Chopper mit einer Chopperfrequenz zwischen 30 Hz und 100 Hz. Als Detektionslaser kam eine Laserdiode (633 nm) zum Einsatz. Die beiden Laserstrahlen wurden in einem Winkel von 90° zueinander über eine entsprechende Optik in die Kapillare hinein fokussiert. Zur Detektion diente eine hinter einer Lochblende mit einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  angeordnete Photodiode. Der Messaufbau wurde mit einer CE-Anlage (TSP 100) gekoppelt. Folgende Abbildung 34 zeigt ein Photo des beschriebenen Detektors angekoppelt an eine CE-Anlage (TSP 100) .

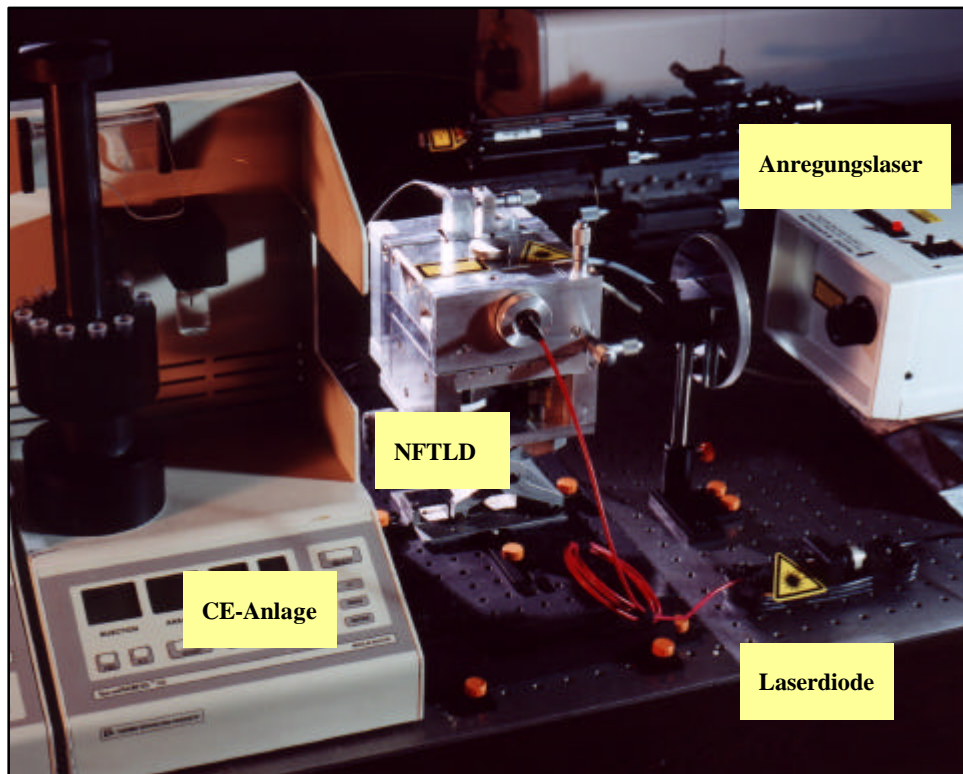


Abbildung 34: Experimenteller Aufbau des Nahfeld-Thermische-Linse-Detektors für die Detektion in Kapillaren.

### 5.2.1 Mechanik und Optik

In Abbildung 35 ist eine Zeichnung des verwendeten Nahfeld-Thermischen-Linse-Detektors (NTLD) dargestellt [65].

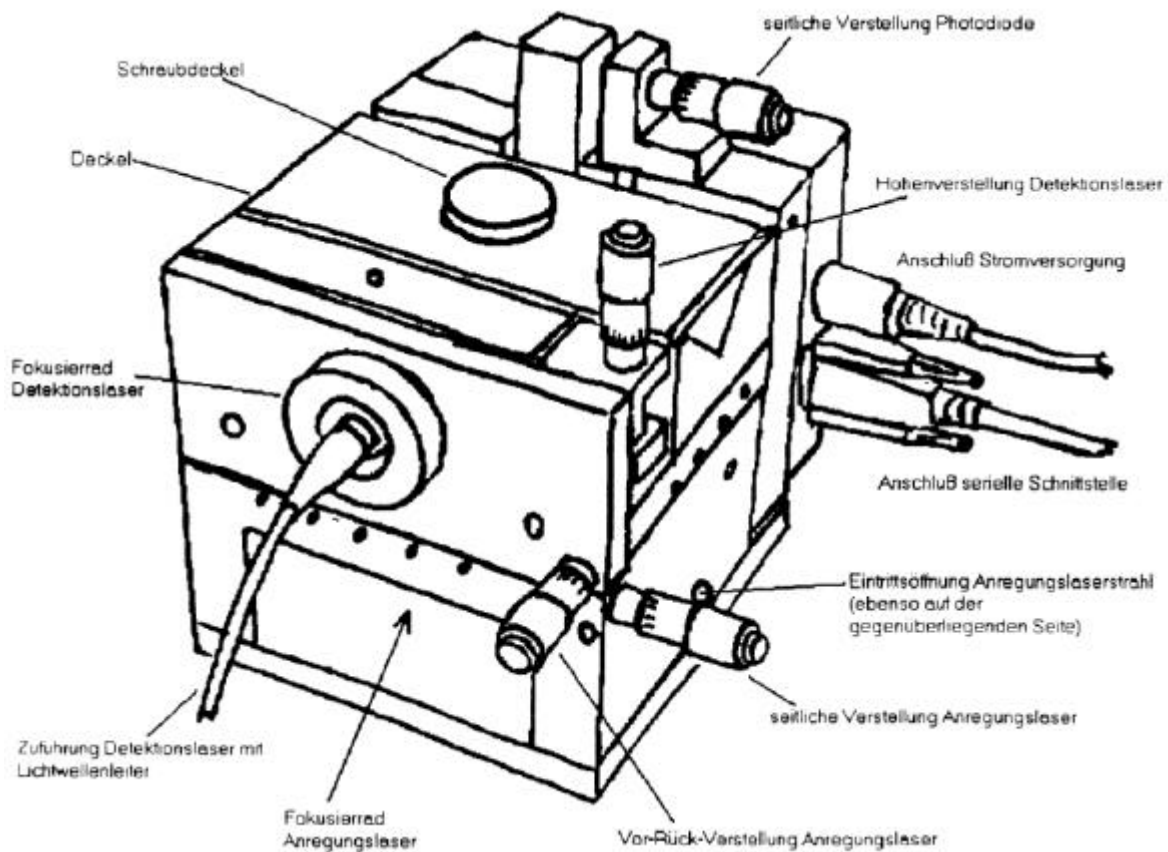


Abbildung 35: Zeichnung der verwendeten Nahfeld-Thermischen-Linse-Detektors (NTLD) [65]

Zur Befestigung der Trennkapillare diente ein Kapillarhalter der aus zwei Blöcken mit einer 90° V-Nut, in die die Kapillare eingelegt wird, bestand. Die Kapillare wurde dort durch vier Gummi-O-Ringe, die durch einen federnden Deckel in die Nut auf die Kapillare gedrückt wurden, fixiert.

Die Fokussiereinheit für den Anregungslaser, die an einer X-Y-Verstelleinheit angebracht wurde, bestand aus einer plankonvexen Quarzlinse mit einer Brennweite von 15 mm oder 25,4 mm. Die X-Y-Verstelleinheit wurde mit Kugellinienlagern für ein möglichst ruckfreies Einstellen und sowie einer Hebelmechanik für eine

Verdopplung der Präzision der Mikrometerschrauben ausgestattet. Die Fokuseinstellung erfolgte mit einer großen Rändelmutter über ein Feingewinde.

Der Detektionslaserstrahl wurde in eine Monomodefaser von einem Laserdiodenmodul eingekoppelt und mit einem FC-Stecker (Auskopplung) an die Fokussieroptik angeschlossen. Diese wurde an einem Hebel, der in seinem Drehpunkt spiel- und ruckfrei durch ein Kreuzfedergelenk gelagert ist, befestigt. Die Fokuspunktverstellung des Detektionslaserstrahls erfolgte ebenfalls durch eine Rändelmutter mit Feingewinde. Die Fokussieroptik bestand aus zwei Achromaten von je 10 mm oder 20 mm Brennweite.

Der Photodiodenkopf, der in seinem Abstand zur Kapillare verschoben werden konnte, wurde ähnlich der Optik für den Detektionslaserstrahl an einem Hebel mit Kreuzfedergelenk und Präzisionsverdopplung befestigt. Vor der Photodiode befand sich eine Lochblende mit wahlweise 100  $\mu\text{m}$  oder 200  $\mu\text{m}$  Durchmesser, hinter der ein OG 590 Farbfilter befestigt war.

### **5.2.2 Elektronische Messwerterfassung**

Das Photodiodensignal wird von einem Vorverstärker mit integriertem Strom-Spannungs-Wandler aufgenommen. Dieses Signal enthält einen Gleichanteil und das Thermische-Linse Signal als Wechselanteil. Der Gleichanteil wird mit Hilfe eines nach dem Vorverstärker folgenden Tiefpaßfilters mit einer Grenzfrequenz von 10,6 Hz unterdrückt. Der zweite Vorverstärker ist als invertierender Verstärker geschaltet und verstärkt das Wechselsignal nochmals um den Faktor 10. Als Referenzsignal für den nach dem invertierenden Verstärker folgenden Lock-In-Verstärker wurde die Chopperfrequenz verwendet. Der Lock-In-Verstärker wurde mit einer Zeitkonstante betrieben, die etwa dem zehnfachen Wert der Chopperfrequenz entspricht [65]. Der nach dem Lock-In-Verstärker folgende Delta Sigma Analog-Digital-Wandler (ADC) wandelt die Differenzspannung zwischen dem mit dem invertierenden Verstärker bearbeiteten Signal und dem Thermische-Linse Signal nach dem Lock-In-Verstärker. Die Steuerung des ADC erfolgt vollständig durch einen eingebauten Microcontroller. Dessen Programmierung erlaubt das Ablesen des AD-Wandlers im 1/10 Sekundenzyklus und die Absendung der gemessenen Werte an einen Personal-Computer.

Außerdem kann mit Hilfe eines Speicheroszilloskops das Signal sowohl von zwei Vorverstärkern, vom Lock-In-Verstärker als auch vom Chopper dargestellt werden. Abbildung 36 zeigt ein aufgezeichnetes zeitabhängiges Vorverstärkersignal und die Position des Choppers auf einem Oszilloskop.

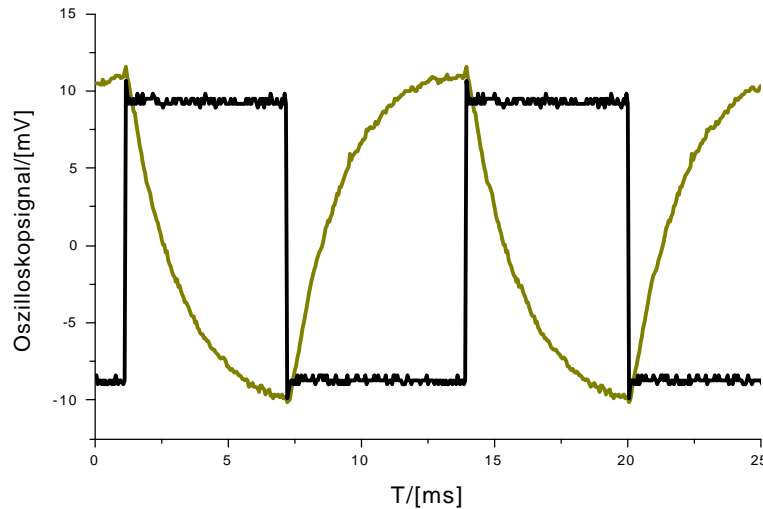


Abbildung 36: Das zeitabhängige Thermische-Linse Signal nach dem Vorverstärker überlagert mit dem Choppersignal. Messbedingungen: Chopperfrequenz 80 Hz, Trennmedium: Kapillare: 104 (68) cm, 75  $\mu\text{m}$  I.D., vollständig gefüllt mit einer Lösung von 1,3-Dinitrobenzol ( $c = 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ ) im Trennpuffer; Trennpuffer: Dinatriumtetraborat  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , Borsäure  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , SDS  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 8,9.

Aus der Abbildung geht hervor, daß im Zeitabschnitt, wo der Chopper den Anregungslaserstrahl schließt, das Thermische-Linse-Signal zunimmt, was der Zunahme der detektierten Intensität auf der Photodiode entspricht. Bei geöffnetem Anregungslaserstrahl hingegen nimmt die Intensität des detektierten Strahls ab, was zur Abnahme des Vorverstärkersignals führt. Der beschriebene Vorgang der Signaländerung stimmt mit der Theorie der Thermischen Linse überein.

### 5.3 Charakterisierung des Thermische-Linse-Detektors

Um den Einfluß verschiedener Parameter wie z. B. die Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz und von der Ausgangleistung des Anregungslasers experimentell zu bestimmen, wurden Messungen unter Variation obengenannter Parameter mit einer vollständig gefüllten Kapillare 107 (68) cm

(gesamte Kapillarlänge  $L_{\text{ges}}$  107 cm, Kapillarlänge vom Einlaß bis zum Detektionsfenster  $L_{\text{ef}}$  68 cm) durchgeführt. Bei diesen Messungen wurde die Kapillare mit einer Lösung von einer bei der Wellenlänge 257 nm absorbierenden Substanz vollständig gefüllt. Entweder wurde die zwischen den Puffergefäßen angelegte Hochspannung oder es wurde die Modulationsfrequenz variiert. Als absorbierende Substanz wurde 1,3-Dinitrobenzol (1,3-DNB) ( $c = 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ ) gelöst in einem Puffer ( $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure und  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS, pH 8,9) verwendet. In Abbildung 37 ist das Absorptionsspektrum von 1,3-DNB dargestellt. Aus der Abbildung wird deutlich, daß die Substanz bei der Meßwellenlänge von 257 nm ein relativ hohes Absorptionssignal aufweist, was ihre Eignung für die Charakterisierung des Thermischen-Linse-Systems bestätigt.

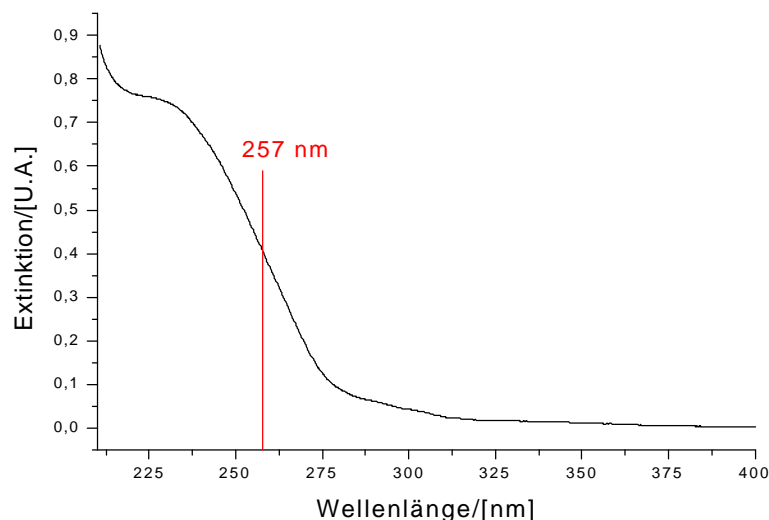


Abbildung 37: Absorptionsspektrum von 1,3-Dinitrobenzol in Acetonitril; Messbedingungen: 1,3-Dinitrobenzol  $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Quarzglasküvette 1 cm.

### 5.3.1 Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung

Aus der Theorie der Thermischen Linse folgt ein linearer Zusammenhang zwischen der TL-Signalintensität und der eingestrahlteten Anregungslaserenergie. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurden die Thermische-Linse Messungen in einer  $75 \mu\text{m}$ -Kapillare bei verschiedenen Laserleistungen durchgeführt. Abbildung 38

zeigt die Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung bei einer Chopperfrequenz von 100 Hz und einer Hochspannung von 30 kV.

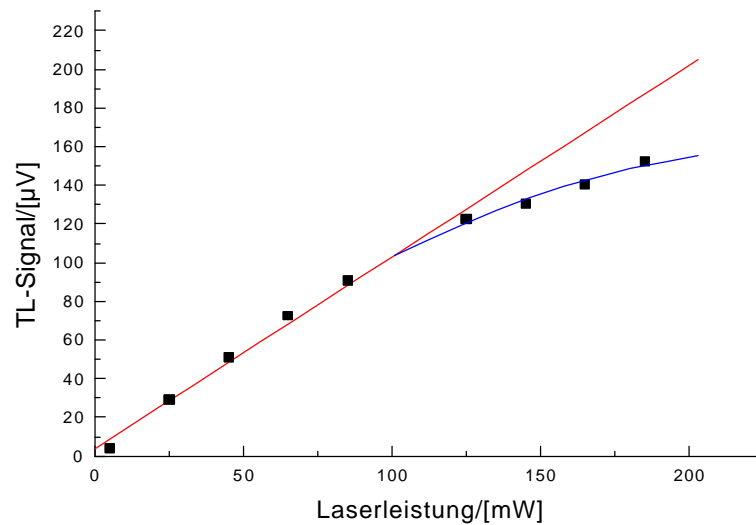


Abbildung 38: Abhängigkeit des TL-Signals von der Leistung des Pump-Lasers. Messbedingungen: Chopperfrequenz 100 Hz, Spannung 30 kV, vollständig gefüllte Kapillare; Innendurchmesser der Kapillare: 75 µm. Analyt: 1,3-DNB 0,04 mg mL<sup>-1</sup>.

Aus der Abbildung wird deutlich, daß bis zu einer Leistung des Pump-Lasers von 105 mW ein linearer Zusammenhang zwischen dem TL-Signal und der Laserenergie zu beobachten ist. Das Abflachen der Kurve oberhalb 105 mW ist vermutlich auf die photochemische Zerstörung der Analytmoleküle unter Einwirkung des Laserlichtes zurückzuführen; aufgrund dessen wurde für weitere Messungen eine Leistung des Pump-Lasers von 105 mW ausgewählt.

### 5.3.2 Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz

Durch die Chopperfrequenz wird die Dauer von Anregungs- (Erwärmungs)- und Abkühlphase festgelegt, daher ist eine Erhöhung des TL-Signals mit abnehmender Chopperfrequenz zu erwarten. Bei den folgenden Messungen mit einer vollständig gefüllten Kapillare wurde die Frequenz des Choppers zwischen 30 Hz und 100 Hz variiert. Kleinere Modulationsfrequenzen waren aus meßelektronischen Gründen und zwar wegen der eingeschränkten Funktion des Lock-In-Verstärkers nicht möglich. Abbildung 39 zeigt die Abhängigkeit der TL-Signalhöhe von der Chopperfrequenz in einer 75 µm-Kapillare bei verschiedenen Hochspannungen.



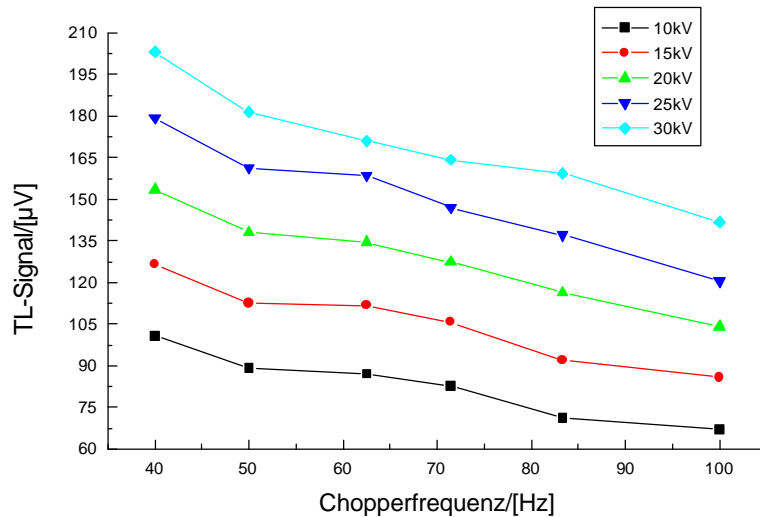


Abbildung 39: Abhängigkeit der TL-Signalthöhe von der Chopperfrequenz unter verschiedenen Hochspannungen. Kapillare vollständig mit dem Analyt gefüllt Innendurchmesser der Kapillare: 75 $\mu$ m. Analyt: 1,3-Dinitrobenzol 0,04 mg mL<sup>-1</sup>

Da bei steigender Chopperfrequenz die Anregungsphasen kürzer werden und somit insgesamt weniger Energie pro Zyklus in die Kapillare eingestrahlt wird, nimmt die Größe des TL-Signals ab. Außerdem wird aus Abbildung 30 deutlich, daß bei zunehmender Hochspannung und damit steigender Fließgeschwindigkeit in der Kapillare eine Erhöhung des TL-Signals meßbar ist. Dieses Phänomen wird ausführlicher in Kapitel 5.3.3 beschrieben.

Ein weiterer Aspekt für die Wahl der optimalen Chopperfrequenz ist die Abhängigkeit des relativen TL-Signalrauschens von der Modulationsfrequenz (Abbildung 40): oberhalb der Chopperfrequenz von 70 Hz fällt das Signalrauschen von 1,0% auf ca. 0,7% der gesamten Signalintensität ab und bleibt bis zur Frequenz von 100 Hz relativ konstant. Der in der Literatur oft beschriebene Effekt der starken Erhöhung des relativen Rauschens bei einer Frequenz von 50 oder 100 Hz (einfache bzw. doppelte Netzfrequenz) [26], wurde hier nicht beobachtet. Da das Signal/Rausch-Verhältnis entscheidend für die Erzeugung niedriger Nachweisgrenzen ist, wurde als optimale Arbeitsfrequenz eine Frequenz von 85 Hz festgelegt.

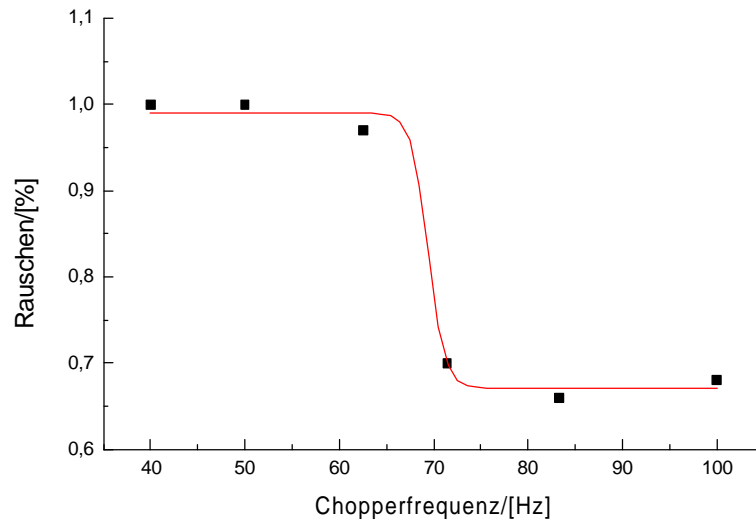


Abbildung 40: relatives Signalrauschen in Abhängigkeit von der Chopperfrequenz. Kapillare vollständig mit dem Analyt gefüllt; Innendurchmesser der Kapillare:  $75\mu\text{m}$ ; Hochspannung 30 kV. Analyt: 1,3-Dinitrobenzol  $0,04\text{ mg mL}^{-1}$ .

### 5.3.3 Abhängigkeit des TL-Signals von der Fließgeschwindigkeit des EOF sowie von der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten (1,3-DNB)

Das Anlegen einer Hochspannung zwischen den Enden einer in Puffergefäße getauchten und mit einer Elektrolytlösung gefüllten Quarzglas Kapillare führt zur Entstehung des elektroosmotischen Flusses im Kapillarrinneren, der durch erzwungene Konvektion der Lösung in der Kapillare die Ausbildung der Thermischen Linse beeinflussen kann. Die Abhängigkeit des TL-Signals von der Fließgeschwindigkeit des EOF  $v_{eo}$  (als EOF-Marker wurde hierbei Acetonitril verwendet) sowie von der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten  $v$  bei unterschiedlichen Chopperfrequenzen ist in Abbildung 41 A und B dargestellt.

Zur Messung der Abhängigkeit des TL-Signals von diesen Größen wurde die Kapillare mit einer Lösung von 1,3-Dinitrobenzol vollständig gefüllt, und es wurde eine Hochspannung von 10 bis 30 kV angelegt. Die Fließ- bzw. Wanderungsgeschwindigkeiten wurden nach Gleichungen 29 und 30 aus der Kapillarlänge vom Einlaß bis zum Detektiosfenster  $L_{ef}$ , der Migrationszeit für den Marker des EOF  $t_{eo}$  sowie der Migrationszeit des Analyten  $t_m$  berechnet.

$$v_{eo} = \frac{L_{ef}}{t_{eo}} \quad (29)$$

$$v = \frac{L_{ef}}{t_m} \quad (30)$$

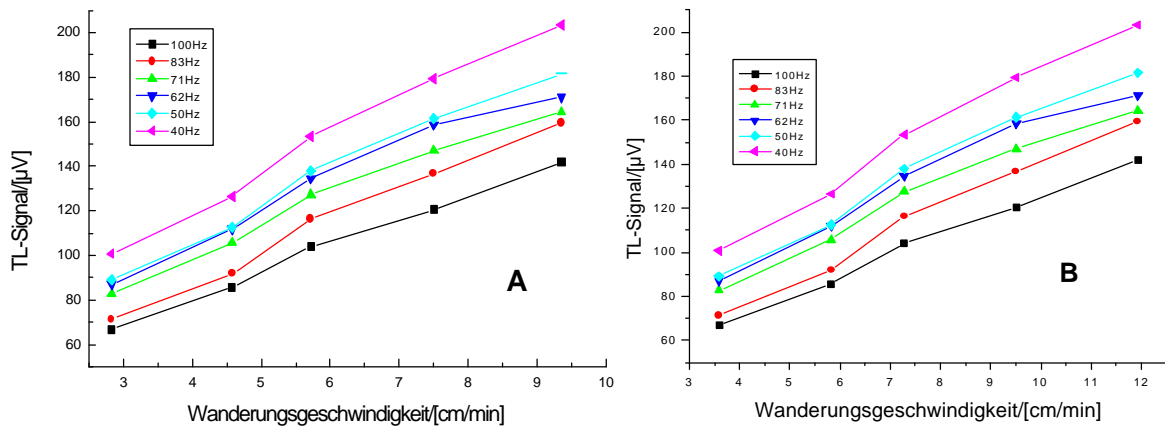


Abbildung 41: TL-Signal in Abhängigkeit von der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten (A) und von der Fließgeschwindigkeit des EOF (B) bei verschiedenen Chopperfrequenzen. Messbedingungen: Trennpuffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Pump-Laserleistung 105 mW; Kapillare vollständig mit dem Analyt gefüllt; Innendurchmesser der Kapillare  $75 \mu\text{m}$ . Analyt: 1,3-Dinitrobenzol  $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ ;

Wie Abbildung 41 zeigt, nimmt das TL-Signal mit zunehmender Fließgeschwindigkeit des EOF sowie mit zunehmender Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten zu. Die bei vorherigen Arbeiten unter Anwendung von hydrodynamisch erzeugtem Fluß (HPLC-Durchflußküvette) beobachtete parabolische Abhängigkeit des Signals (Erreichen eines Maximalwerts bei mittlerer Fließgeschwindigkeit) von der Wanderungsgeschwindigkeit [26] konnte in eigenen Messungen unter Verwendung kleinerer elektroosmotischer Flüsse in einer Quarzglaskapillare nur im ansteigenden linearen Kurvenbereich reproduziert werden. Es wäre interessant, bei höheren Fließgeschwindigkeiten zu messen, um den weiteren Verlauf der Kurve zu beobachten. Dies ließe sich durch eine Erhöhung der angelegten Spannung oder durch Kürzung der Kapillare erzielen.

Aus technischen Gründen konnte bei dem vorliegenden Messaufbau weder die Spannung erhöht noch die Kapillare gekürzt werden.

Unter Berücksichtigung der Optimierung des TL-Detektors ergeben sich bei der Bestimmung von 1,3-DNB folgende optimalen Detektionsparameter: Anregungslaserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 85 Hz und Trennspannung 30 kV.

## 6 Trennung und Bestimmung von Nitroverbindungen und ihrer Metabolite bzw. Nebenprodukte mit Hilfe MEKC-NFTL-Detektion

### 6.1 Gefährdungspotentiale von Sprengstoffen

Nitroaromaten, als Bestandteile, Nebenprodukte oder Metabolite von Nitroverbindungen, sind bedeutsame Analyte im Hinblick auf die Luft und Grundwasserverschmutzung in der Nähe von Rüstungsaltslasten. Bereits ältere Untersuchungen an den Beschäftigten in der Sprengstoff- und Munitionsherstellung belegen die Giftwirkung dieser Substanzen nach langfristiger Aufnahme [66]. Die Mengen, die den Menschen über die Lunge und die Haut erreichen, stellen in der Regel keine akute Gefährdung dar, daher wird die toxikologische Bewertung durch die langfristige Exposition mit kleinen und kleinsten Mengen erheblich erschwert [10]. Trotz dieser Schwierigkeiten sind von der US-amerikanischen Umweltbehörde EPA (Environmental Protection Agency) Trinkwassergrenzwerte für einige Nitroaromaten und Nitroamine erlassen worden [10], Tabelle 11:

*Tabelle 11: Von der EPA erlassene Trinkwassergrenzwerte für einige Nitroaromaten*

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration [<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>]</i>
<b>2,6-Dinitrotoluol</b>	0,007
<b>2,4-Dinitrotoluol</b>	0,1
<b>2,4,6-Trinitrotoluol</b>	1,0
<b>Hexogen (RDX)</b>	0,3
<b>Octogen (HMX)</b>	400

Aufgrund der besonderen Rolle des 2,4,6-Trinitrotoluols (TNT) in der Altslastenproblematik stellen die Nitroaromaten bezüglich ihrer Toxizität, Mutagenität und Kanzerogenität die am besten untersuchte Klasse der Sprengstoffe dar. TNT besitzt neben durch zellphysiologische Untersuchungen belegten cytotoxischen Effekten zahlreiche humantoxische Wirkungen, die nachweislich zur Schädigung des hämatologischen Systems und der Leber führen [67]. Die Giftwirkungen anderer Nitroaromaten wie der Mono- und Dinitrotoluole unterscheiden sich nur unerheblich von der des TNT, wobei für praktisch alle

Nitroaromaten durch Verwendung bakterieller und tierischer Zelltestsysteme mutagene Eigenschaften nachgewiesen werden konnten [68].

Die humantoxische Wirkung der Nitroaromaten steht in engem Zusammenhang mit ihrer Metabolisierung im menschlichen Körper. Derzeit wird davon ausgegangen, daß die Aminogruppen, die nach der enzymatisch katalysierten Umwandlung der Nitrogruppen entstehen, die Ursache der Toxizität und Mutagenität der Nitroaromaten darstellen [68].

## 6.2 Analytische Trenn- und Bestimmungsmethoden

Für die Trennung und Bestimmung von Sprengstoffrückständen in Umweltmatrizes spielen chromatographische Verfahren eine entscheidende Rolle. In den letzten zwanzig Jahren wurden bereits einige Trenn- und Bestimmungsmethoden auf der Basis der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC), die nach dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie oder auch mit Hilfe der Normalphasenchromatographie vorgenommen wurden, entwickelt. Aufgrund der relativ hohen Extinktionskoeffizienten der Nitroverbindungen im UV-Bereich des Spektrums ( $\lambda_{\max} \approx 230 \text{ nm}$ ) wird hierbei als Detektionsverfahren in der Regel die photometrische Detektionsmethode mit einer Deuteriumlampe als UV-Lichtquelle eingesetzt [10].

Daneben existieren verschiedene gaschromatographische (GC) Verfahren mit Flammenionisationsdetektion [69], electron-capture-Detektion [70], oder der massenselektiven Detektion [71].

Die beiden oben beschriebenen Trennverfahren besitzen aber einige Nachteile. Die thermische Instabilität der Aminoabbauprodukte des TNTs, aber auch der Nitroamine erschwert die gaschromatographische Bestimmung dieser Substanzen. Die HPLC ermöglicht zwar die Bestimmung der nicht GC-gängigen Substanzen, bietet aber eine ungenügende Trennleistung [10].

In der Arbeit von *Mussenbrock* [10] wurde ein Verfahren der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie (MEKC) mit einer photometrischen UV-Detektion als eine Alternative zur HPLC für die Trennung und Bestimmung von Nitroaromaten in Umweltmatrizes entwickelt. Die Methode zeichnet sich durch gute Auflösung in sehr kurze Zeit und durch hohe Matrixtoleranz aus. Nachteilig

sind jedoch relativ hohe Nachweisgrenzen im Vergleich zu den Nachweisgrenzen, die mit herkömmlichen HPLC-Verfahren erzielt werden können.

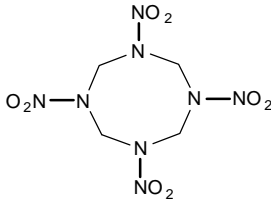
Daher ist es von Bedeutung, die erwiesenermaßen leistungsfähige MEKC-Trennmethode mit den neuen nachweisstärkeren Detektionsverfahren zu kombinieren. Aufgrund dessen wurde die Trennung und Bestimmung von Nitroaromaten unter Zugrundelegen des Verfahrens von Mussenbrock als Modellanwendung für die Kombination des entwickelten und charakterisierten Thermische-Linse-Detektors mit der in Quarzglas Kapillaren ausgeführten MEKC-Trennmethode ausgewählt. Zudem sind die bei der MEKC häufig eingesetzten Pufferlösungen aufgrund der Anwesenheit ionischer Detergenzien ein besonderes geeignetes Medium für die Ausbildung eines stabilen Thermische-Linse-Signals (siehe Kapitel 3.6.3.3).

### **6.3 Struktureller Aufbau und Absorptionsspektren der untersuchten Stoffe**

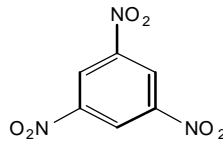
Die Auswahl der Nitroaromaten in der vorliegenden Arbeit umfaßt die Vor-, Neben- und Abbauprodukte des TNTs, die als potentielle Kontaminanten eine besondere Bedeutung in der umweltbezogenen Analytik haben, außerdem werden die Nitramine, die vor allem in der Vergangenheit Verwendung fanden, erfaßt.

In Abbildung 43 ist eine Auflistung der Namen, Abkürzungen und Strukturformel der untersuchten Nitroverbindungen zu finden.

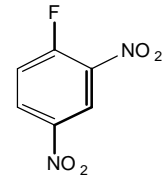
Um in der Zukunft Qualifizierung und Quantifizierung der einzelnen Nitroverbindungen in einer Realprobe zu erleichtern, mußte ein interner Standard ausgewählt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das nicht in der Umwelt vorkommende 1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol (*Sanger`s* Reagenz) als interner Standard eingesetzt (Abbildung 42).



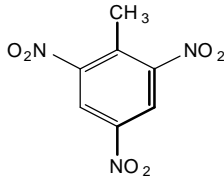
**1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyclooctan (HMX)**



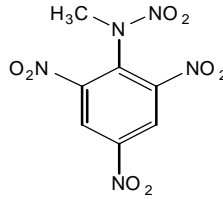
**1,3,5-Trinitrotoluol (1,3,5-TNB)**



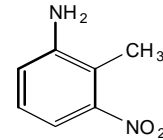
**1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (1-F-2,4-DNB)**



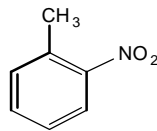
**2,4,6-Trinitrotoluol (2,4,6-TNT)**



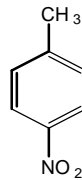
**2,4,6,N-Tetranitro-N-methylanilin (Tetryl)**



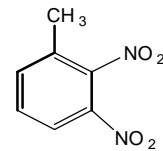
**2-Methyl-3-nitroanilin (2-M-3-NA)**



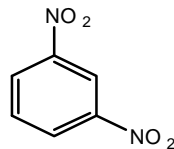
**2-Nitrotoluol (2-NT)**



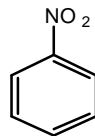
**4-Nitrotoluol (4-NT)**



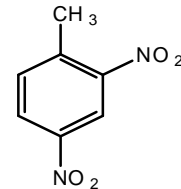
**2,3-Dinitrotoluol (2,3-DNT)**



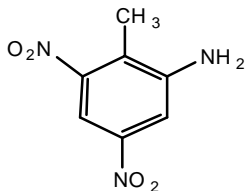
**1,3-Dinitrobenzol (1,3-DNB)**



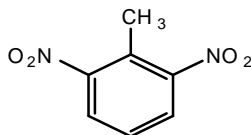
**Nitrobenzol (NB)**



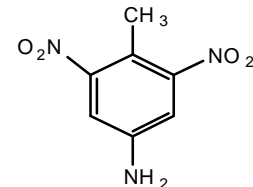
**2,4-Dinitrotoluol (2,4-DNT)**



**2-Amin-4,6-dinitrotoluol (2-A-4,6-DNT)**



**2,6-Dinitrotoluol (2,6-DNT)**



**4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-A-2,6-DNT)**

Abbildung 42: Chemische Strukturen der untersuchten Nitroverbindungen



## 6.4 Trennung und Bestimmung von 15 Nitroverbindungen mit Hilfe des MEKC-NFTL-Detektors

Zu Beginn der Untersuchungen wurde basierend auf den Ergebnissen von *Mussenbrock* [10] ein Elektrolytssystem auf der Basis von Borsäure und Dinatriumtetraborat hergestellt. Die verwendete Pufferlösung besaß folgende Grundzusammensetzung:

***2,5 mmol L<sup>-1</sup> Borsäure***

***12,5 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumtetraborat***

Als pseudostationäre Phase wurde *Natriumdodecylsulfat* (SDS) in der Konzentration von ***25 mmol L<sup>-1</sup>*** verwendet.

Zur Herstellung der Pufferlösung wurden die entsprechende Substanzen eingewogen, in einen Messkolben gebracht und mit Milli-Q-Wasser unter Rühren gelöst. Die fertige Lösung wurde bis zur Rückbildung des Schaumes stehengelassen und bis zur Kolbenmarke mit dem Milli-Q-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert des Elektrolytsystems mit einem Präzisions-pH-Meter gemessen. Der Wert betrug ***8,9 pH***-Einheiten.

Für die Herstellung der Stammlösungen wurden jeweils 40 mg der ausgewählten Nitroverbindungen in 10 mL Acetonitril gelöst, im Fall von 2,4,6-TNT, 1,3,5-TNB, Tetryl und HMX wurden fertige Lösungen in Acetonitril mit einer Konzentration von ***1 mg mL<sup>-1</sup>*** vom Handel erhalten. Bei der Herstellung der MEKC-Standardmischungen wurden 20 µL der Stammlösung von 2,4,6-TNT, 1,3,5-TNB, Tetryl und HMX; 15 µL der Stammlösung von NB, 4-NT, 2-NT sowie 10 µL der von 1,3-DNB, 2-M-3-NA, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2,3-DNT, 2-A-4,6-DNT, 4-A-2,6-DNT in ein Eppendorfgefäß gebracht und mit der Pufferlösung auf 2 mL aufgefüllt, so daß die Endkonzentration von Acetonitril in der Standardmischung ***10,25 %*** betrug.

Die instrumentellen Trennparameter für die MEKC-Trennung von Nitroverbindungen wurden basierend auf der Arbeit von *Mussenbrock et al.* [10] auf die jeweils vorhandene Kapillarlänge 107 (68) cm angepaßt.

Die Trennungsspannung betrug 30 kV.

Die Probenaufgabe erfolgte hydrodynamisch durch Anlegen (0,7 s) eines Vakuums auf das Puffergefäß auf der Detektionsseite.

In Abbildung 43 ist ein Elektropherogramm für die Trennung von 15 Nitroaromaten mit TL-Detektion dargestellt.

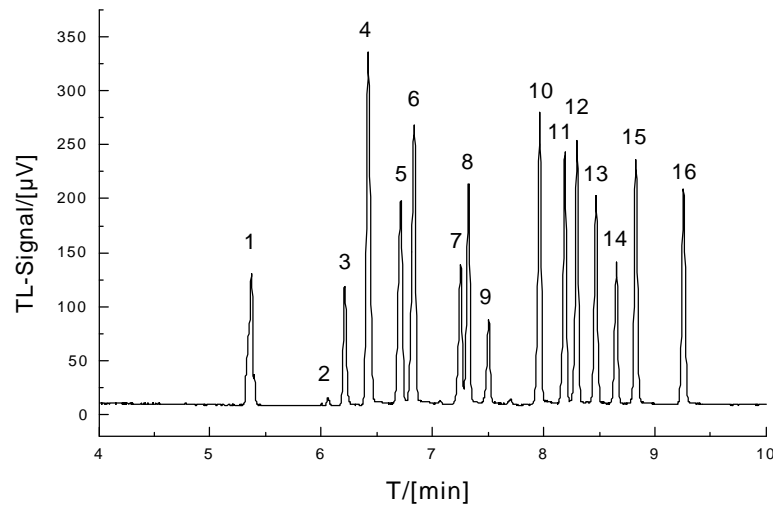


Abbildung 43: MEKC-Trennung von 15 Nitroverbindungen mit TL-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 107(68) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,3 s; Detektion 257 nm; Laserleistung 105 mW; Chopperfrequenz 85 Hz; Analyte: **1** Systempeak, **2** HMX, **3** 1,3,5-TNB, **4** 1-F-2,4,-DNB, **5** 1,3-DNB, **6** NB, **7** 2,4,6-TNT, **8** Tetryl, **9** 2-M-3-NA, **10** 2,4,-DNT, **11** 2,6-DNT, **12** 2-NT, **13** 4-NT, **14** 2,3-DNT, **15** 2-A-4,6-DNT, **16** 4-A-2,6-DNT.

Aus der Abbildung geht hervor, daß unter der verwendeten Trenn- und Detektionsbedingungen eine vollständige Trennung und ein günstiges Signal/Rausch-Verhältnis für die 15 Nitroverbindungen erreicht worden ist. Jedoch fällt unter Berücksichtigung des Absorptionsspektrums (siehe Arbeit von *Mussenbrock* et al. [10]) die im Vergleich zur Signalintensität der übrigen detektierten Nitroaromaten geringe Signalintensität von 1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetraazacycloctan (HMX) auf. Dies hat vermutlich mit der chemischen Umsetzung des Stoffes und der Bildung eines bei der Arbeitswellenlänge nur sehr schwach absorbierenden Produkts unter Einwirkung der eingestrahnten Laserenergie zu tun. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Abhängigkeit der Signalintensität des HMX von der Leistung des angestrahlten Laserlichtes aufgenommen und mit der für 1,3-DNB verglichen (Abbildung 44).

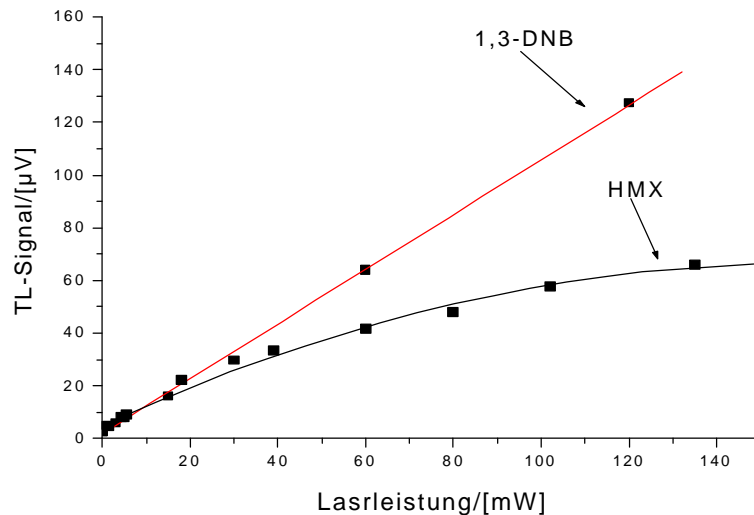


Abbildung 44: Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung. Analyt: 1,3-Dinitrobenzol  $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ ; 1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyclooctan  $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$  im Trennpuffer; Kapillarlänge 107(68) cm,  $75 \text{ }\mu\text{m}$  I.D., vollständig mit dem jeweiligen Analyten gefüllt; Hochspannung 30 kV.

Die Abbildung 44 zeigt, daß die Abweichung der HMX-Kurve vom linearen Verlauf schon bei einer Anregungslaserleistung von 10 mW eintritt. Diese Abweichung kann die Vermutung der photochemischen Umsetzung des 1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyclooctans unter Einwirkung des Laserlichtes bestätigen. In Tabelle 12 sind die Wiederholpräzisionen der Migrationszeiten, der Peakflächen, der Peakhöhen (für fünf aufeinander folgende Messungen), sowie die Trennstufenzahlen für die MEKC-Trennung von 15 Nitroaromaten mit der Thermischen-Linse-Detektion präsentiert.

Tabelle 12: Wiederholpräzisionen der Migrationzeiten, der Peakhöhen, der Peakflächen (für fünf aufeinander folgende Messungen), sowie die Trennstufenzahlen bei der MEKC-Trennung von 15 Nitroverbindungen mit der Thermischen-Linse-Detektion. Messbedingungen sind aus Abbildung 43 zu entnehmen.

Verbindung	$F$	$RSD_1$	$RSD_2$	$t_m$	$RSD_1$	$RSD_2$	$H$	$RSD_1$	$RSD_2$	$N$
<b>HMX</b>	0,09	10	2,1	6,05	0,38	0,100	4,43	5,6	5,8	200000
<b>1,3,5-TNB</b>	3,18	5,0	2,2	6,21	0,35	0,070	106	2,7	3,9	210000
<b>1-F-2,4-DNB</b>	12,0	3,7	-	6,42	0,30	-	317	3,2	-	160000
<b>1,3-DNB</b>	7,41	3,0	2,1	6,72	0,33	0,054	208	3,7	1,5	120000
<b>NB</b>	9,02	3,1	1,5	6,84	0,29	0,037	258	1,2	1,6	160000
<b>2,4,6-TNT</b>	3,75	2,7	3,7	7,24	0,28	0,047	123	1,7	6,8	270000
<b>Tetryl</b>	5,83	2,2	2,1	7,31	0,30	0,059	199	1,9	6,6	260000
<b>2-M-3-NA</b>	2,34	3,3	2,9	7,51	0,33	0,057	76,0	1,4	6,4	230000
<b>2,4-DNT</b>	8,45	3,0	3,2	7,95	0,29	0,046	263	1,5	5,0	350000
<b>2,6-DNT</b>	7,31	1,8	2,2	8,19	0,40	0,048	226	1,9	2,9	410000
<b>2-NT</b>	6,76	4,1	1,4	8,31	0,30	0,049	213	5,0	2,5	420000
<b>4-NT</b>	5,86	3,4	1,3	8,48	0,32	0,060	177	1,7	5,0	360000
<b>2,3-DNT</b>	3,96	2,0	2,4	8,66	0,35	0,053	125	2,1	5,5	370000
<b>2-A-4,6-DNT</b>	7,15	1,5	1,9	8,83	0,39	0,072	218	1,8	6,0	430000
<b>4-A-2,6-DNT</b>	6,76	1,8	3,1	9,26	0,39	0,070	193	2,2	5,6	390000

$F$  - mittlere Peakfläche

$t_m$  - mittlere Migrationszeit

$H$  - mittlere Peakhöhe

$RSD_1$  - relative Standardabweichungen der Peakflächen, Peakhöhen sowie der Migrationszeiten, [%]

$RSD_2$ - relative Standardabweichungen der durch die Peakfläche des internen Standards geteilten Peakflächen, durch die Peakhöhe des internen Standards geteilten Peakhöhen sowie durch die Migrationszeit des internen Standards geteilten Migrationszeiten, [%].

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die auf den internen Standard bezogenen Migrationszeiten eine um den Faktor vier bis acht bessere Wiederholpräzision haben, als die absoluten Migrationszeiten. Die Wiederholpräzision der auf den internen Standard bezogenen Peakflächen ist vergleichbar mit der der absoluten Peakflächen. Auch wird bei den auf die Peakhöhe des internen Standards bezogenen Peakhöhen der Analyte keine Verbesserung der Wiederholpräzision beobachtet.

Dies ist vermutlich auf die direkte Abhängigkeit des TL-Signalrauschen (Abbildung 45) von der Signalintensität zurückzuführen. Die Wiederholpräzision der Peakhöhen ist nur in geringem Umfang von der Präzision des Probeaufgabevolumens abhängig. Die Peakhöhe wird hauptsächlich durch das erhebliche Rauschen des TL-Signals in der Gegenwart des Analyten bestimmt und kann durch Normierung auf die Peakhöhe des internen Standards nicht verbessert werden.

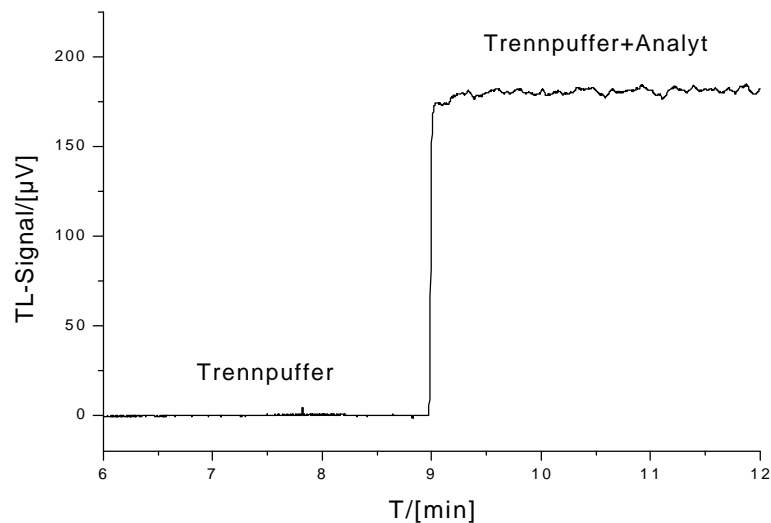


Abbildung 45: TL-Signal in Abwesenheit und in Gegenwart des bei der Arbeitswellenlänge von 257 nm absorbierenden Analyten. Trennpuffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennspannung 20 kV; Kapillarlänge 107(68)cm, Laserleistung 50 mW; Chopperfrequenz 85 Hz; Analyt: 1,3-Dinitrobenzol  $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ ;

Um die Nachweisstärke der TL-Detektion bei der Bestimmung von Nitroverbindungen einschätzen zu können, wurden Referenzmessungen mit einem handelsüblichen photometrischen UV-Detektor (TSP-100UVVIS-200 Spectra Physics) mit identischer Probe unter ansonsten gleichen Trenn- und Probeaufgabebedingungen durchgeführt. Eines der mit dem UV-Detektor aufgezeichneten Chromatogramme ist in Abbildung 46 dargestellt.

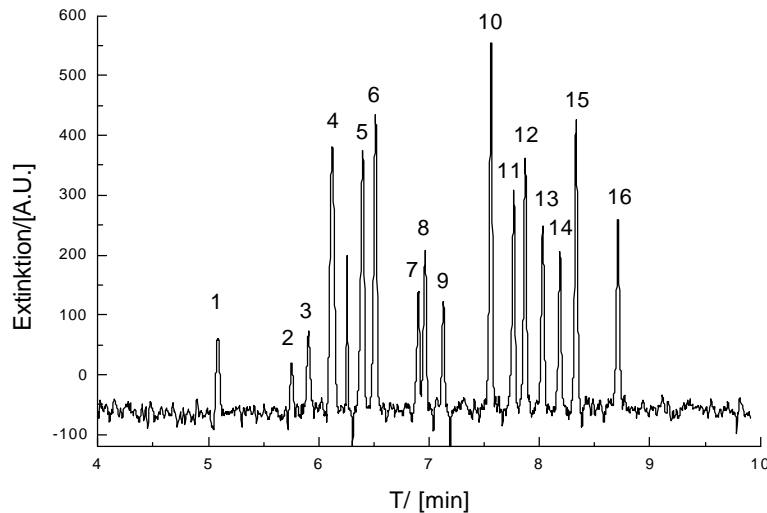


Abbildung 46: MEKC-Trennung von 15 Nitroverbindungen mit photometrischer UV-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennspannung 30 kV; Kapillarlänge 107(68) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,3 s; photometrische Detektion 257 nm; Analyte: **1** Systempeak, **2** HMX, **3** 1,3,5-TNB, **4** 1-F-2,4,-DNB, **5** 1,3-DNB, **6** NB, **7** 2,4,6-TNT, **8** Tetryl, **9** 2-M-3-NA, **10** 2,4,-DNT, **11** 2,6-DNT, **12** 2-NT, **13** 4-NT, **14** 2,3-DNT, **15** 2-A-4,6-DNT, **16** 4-A-2,6-DNT.

Aus dem Vergleich der Abbildungen 43 und 46 wird deutlich, daß unter Verwendung des NTL-Detektors das Signal/Rausch-Verhältnis viel günstiger als im Fall der photometrischen UV-Detektion ist.

In der nachfolgenden Tabelle 12 sind die Nachweisgrenzen ( $S/N = 3$ ) für die untersuchten Nitroaromaten bei der TL- und bei der photometrischen Detektion gegenüber gestellt. Zum Vergleich wurden noch die entsprechenden Nachweisgrenzen bei der MEKC-Trennung mit photometrischer Detektion bei einer Wellenlänge von 230 nm [10] sowie bei der HPLC-Trennung mit photometrischer UV-Detektion (230 nm) hinzugefügt [10]. Diese wurden allerdings mit der Kalibriergeradenmethode ermittelt.

Eine der Standardmethoden zur Trennung und Bestimmung von Nitroaromaten ist die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit photometrischer Detektion (siehe Kapitel 6.2). Da die bei der HPLC verwendeten Durchflussküvetten eine optische Weglänge von typischerweise etwa 1 mm haben, ist hier die UV-Detektion wesentlich nachweisstärker als im Fall der MEKC, wo Kapillaren mit einer optischen Weglänge nur von 25 bis 150  $\mu\text{m}$  verwendet werden. Um Akzeptanz für

die MEKC zu gewinnen sollten die Nachweisgrenzen bei TL-Detektion in der gleichen Größenordnung liegen wie bei der HPLC mit photometrischer UV-Detektion.

*Tabelle 13: Vergleich der Nachweisgrenzen der untersuchten Nitroaromaten bei der TL- und UV-VIS-Detektion und bei der HPLC mit UV-VIS-Detektion als Referenzanalytik [10].*

<b>Verbindung</b>	<b>TL-Detektor [ng mL<sup>-1</sup>]*</b>	<b>UV-VIS-Detektor [ng mL<sup>-1</sup>]*</b>	<b>UV-VIS-Detektor [ng mL<sup>-1</sup>**</b>	<b>HPLC mit UV- Detektor [ng mL<sup>-1</sup>**</b>
<b>HMX</b>	1380	5942	830	81
<b>1,3,5-TNB</b>	111	3614	840	82
<b>1-F-2,4-DNB</b>	75	2000	-	-
<b>1,3-DNB</b>	126	2100	840	82
<b>NB</b>	144	2750	790	77
<b>2,4,6-TNT</b>	92	2300	800	78
<b>Tetryl</b>	59	1700	810	79
<b>2-M-3-NA</b>	321	5100	800	78
<b>2,4-DNT</b>	91	1478	820	79***
<b>2,6-DNT</b>	103	2500	820	79***
<b>2-NT</b>	150	3400	870	85
<b>4-NT</b>	192	4590	820	80
<b>2,3-DNT</b>	187	3430	-	-
<b>2-A-4,6-DNT</b>	114	1856	800	79****
<b>4-A-2,6-DNT</b>	130	2920	810	79****

\* : Wellenlänge 257 nm

\*\* : Injektionsvolumen 20 µL für HPLC und 0,47 nL (berechnet aus der Probenaufgabedauer und dem Höhenunterschied zwischen den beiden Puffergefäßen bei der hydrostatischen Probenaufgabe) für MEKC, Wellenlänge 230 nm [10]

\*\*\* : Koelution von 2,4-DNT und 2,6-DNT

\*\*\*\* : Koelution von 2-A-4,6-DNT und 4-A-2,6-DNT

Aus Tabelle 13 geht hervor, daß die Nachweisgrenzen bei der MEKC mit TL-Detektion in der gleichen Größenordnung wie die Nachweisgrenzen bei der HPLC

mit UV-Detektion liegen. Da die MEKC eine höhere Trennleistung und geringere Analysenzeiten als die HPLC aufweist, handelt es sich bei der MEKC mit TL-Detektion insgesamt um eine leistungsfähigere Methode.

## 6.5 Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen

Zur weiteren Überprüfung der Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode wurde für zwei der untersuchten Nitroverbindungen eine Kalibrierung durchgeführt. Ausgehend von zwei Stammlösungen (Konzentration von  $4 \text{ mg L}^{-1}$ ) wurden durch Verdünnung mit Milli-Q Wasser 6 Lösungen (Analytkonzentration von 1 bis  $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) mit einer Mischung von zwei Nitroaromaten, hergestellt. Die Analyse der 6 hergestellten Lösungen wurde unter den in Abbildung 43 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 47 sind die Kalibriergeraden von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und 1,3-Dinitrobenzol als Beispiel präsentiert.

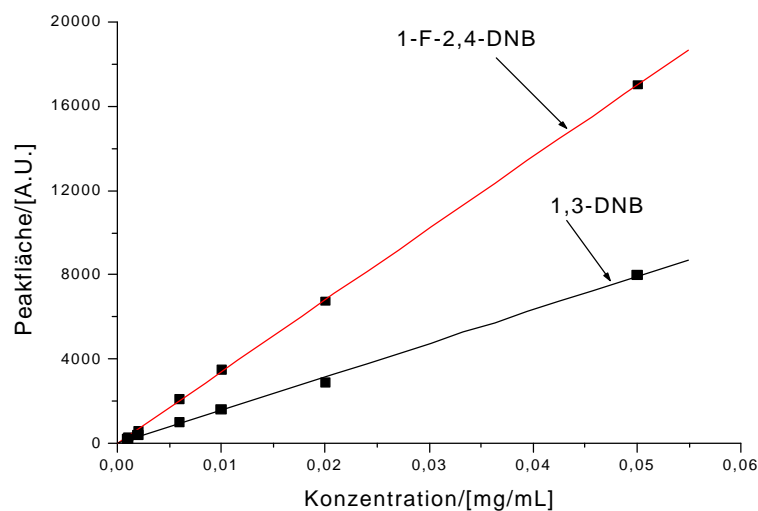


Abbildung 47: Kalibriergeraden von 1,3-DNB und 1-F-2,4-DNB. Messbedingungen: Trennpuffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 107(68) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; Detektion Thermische-Linse 257 nm; Laserleistung 105 mW; Chopperfrequenz 85 Hz.

Wie in Kapitel 4.3.7 bereits beschrieben, kann die Linearität einer Kalibrierfunktion mit Hilfe des Anpassungstests von Mandel (F-Test) überprüft werden. In der nachfolgenden Tabelle ist der Vergleich von berechneten F-Werten (siehe



Gleichung 27)  $F_{ber}$  und von tabellierten F-Werten  $F_{tab}$  für die Kalibrierfunktion von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und 1,3-Dinitrobenzol dargestellt.

*Tabelle 14: F-Test für die Kalibrierfunktion von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und 1,3-Dinitrobenzol (Signifikanzniveau 95%)*

<b>Verbindung</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>F<sub>ber</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub> (95%, 1, 3)</b>
<b>1-F-2,4-DNB</b>	6	0,9999	0,22	10,13
<b>1,3-DNB</b>	6	0,9990	8,97	10,13

Die Tabelle zeigt, dass durch eine Kalibrierfunktion zweiten Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht werden kann und somit Linearität der Kalibrierfunktionen angenommen werden darf.

## **6. 6 Übertragbarkeit der Methode auf Realproben**

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der entwickelten Methode auf reale matrixbehaftete Proben wurde eine Drainagewasserprobe aus dem hessischen Stadtallendorf, wo Rüstungsaltslasten eine erhebliche Grundwasserkontamination verursacht haben, entnommen. Es wurde eine MEKC-Trennung mit TL-Detektion ohne Probenaufarbeitung durchgeführt. Das entsprechende Elektropherogramm ist in Abbildung 48 dargestellt.

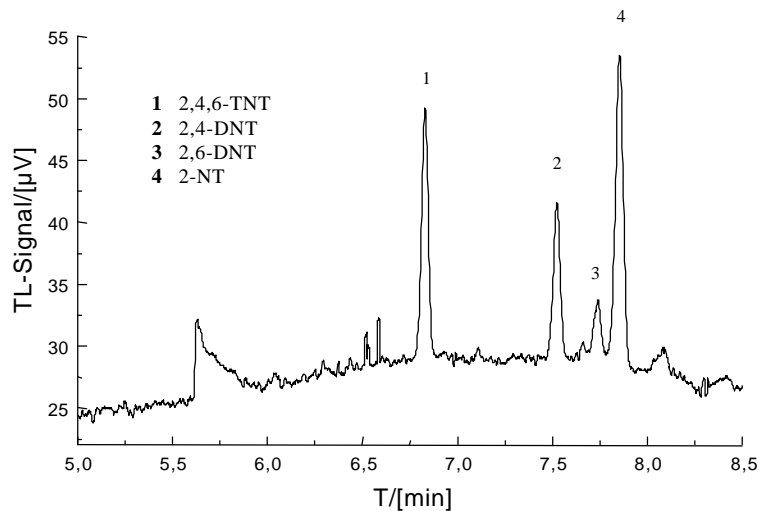


Abbildung 48: Analyse einer Drainagewasserprobe aus Stadtallendorf. Messbedingungen: Trennpuffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 107(68) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; Detektion Thermische-Linse 257 nm; Laserleistung 105mW; Chopperfrequenz 85 Hz. Analyte: 1 2,4,6-TNT, 2 2,4-DNT, 3 2,6-DNT, 4 2-NT.

Aufgrund des Einflusses der Probenmatrix sind die Retentionszeiten der einzelnen Nitroaromaten gegenüber denen der Standardmischung verschoben, daher ist die Identifizierung der einzelnen Nitroverbindungen durch einen Vergleich der Retentionszeiten nicht ohne weiteres möglich. Infolgedessen wurde die Zuordnung durch einen Vergleich der sogenannten korrigierten Retentionszeiten vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde zu der untersuchten Drainagewasserprobe 1-Fluor-2,4,-dinitrobenzol als interner Standard zugegeben, eine MEKC-Trennung der Mischung durchgeführt, und die erhaltene Retentionszeiten der Analyte wurden durch die Retentionzeit des internen Standards dividiert. Die daraus resultierenden korrigierten Retentionszeiten wurden mit den korrigierten Retentionszeiten der Standardmischung verglichen. Die aus dem Vergleich erhaltene Elutionsreihenfolge wurde zusätzlich durch das Zusetzen von Einzelstandards abgesichert und in ihrer Richtigkeit bestätigt. Mit den Peakflächen wurde analog verfahren und die resultierenden auf die Peakfläche des internen Standards korrigierten Peakflächen für die Gehaltsbestimmung der Analyte in der Realprobe verwendet.

Zur Kontrolle wurde von Dr. Klaus Steinbach (Universität Marburg) eine HPLC-Referenzanalyse zur Verfügung gestellt. Hierbei wurde eine Trennung mit Hilfe eines HPLC-Systems (siehe Anhang) mit einer Nucleosil 120-3 C18 Trennsäule,

einem photometrischen Detektor und einem Autoinjektor durchgeführt. Die mobile Phase (Methanol/Wassergradient gestartet mit 100% Wasser mit linearer Zunahme zu Wasser/Methanol 45:55 (v/v) in 30 min) hatte eine konstante Fließgeschwindigkeit von  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ . Die Peakzuordnung erfolgte mittels eines Vergleiches der erhaltenen Retentionszeiten sowie der Absorptionsspektren. Die Konzentrationen der Analyte wurden durch ein externes Kalibrierkurvenverfahren bestimmt. Das Injektionsvolumen betrug  $250 \mu\text{L}$ .

In Tabelle 15 sind die mit dem MEKC-TL-Verfahren und die mit dem HPLC-UV-Verfahren ermittelten Konzentrationen an Nitroverbindungen in der Wasserprobe verglichen.

*Tabelle 15: Vergleich der mit der MEKC-TL- und HPLC-UV-Detektion ermittelten Konzentrationen an Nitroverbindungen in der Wasserprobe aus Stadtallendorf. Die Konzentrationen wurden in beiden Fällen mit Hilfe eines externen Kalibrierkurvenverfahren ermittelt.*

<b>Verbindung</b>	<b>CE-TL-Detektion</b> <b>[ng mL<sup>-1</sup>]</b>	<b>HPLC-UV-Detektion</b> <b>[ng mL<sup>-1</sup>]*</b>	<b>Differenz</b> <b>[%]</b>
<b>2,4,6-TNT</b>	800 ±40	790	+1,3
<b>2,4-DNT</b>	520±50	580	-10
<b>2,6-DNT</b>	170±20	190	-10
<b>2-NT</b>	2050±200	2100	-2,4

\* : Injektionsvolumen  $250\mu\text{L}$

Aus Tabelle 15 ist ersichtlich, daß die ermittelten Konzentrationen sich im Rahmen der Messgenauigkeit der verwendeten Verfahren nicht signifikant unterscheiden, was die Richtigkeit der entwickelten Thermischen-Linse-Methode bestätigt.

## **7 Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Trennmethode mit Thermischer-Linse-Detektion für die Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat in Blutplasma**

### **7.1 Einleitung und Aufgabenstellung**

Bei der Behandlung von Leukämie und bösartigen Tumoren spielen Antineoplastische Substanzen (Zytostatika) wie **Etoposid** und **Etoposidphosphat** eine entscheidende Rolle. Aufgrund der hohen Toxizität der Substanzen ist die therapeutische Breite (der Konzentrationsbereich zwischen der therapeutischen und der letalen Wirkung eines Arzneimittels) gering, und die richtige Dosierung ist von großer Bedeutung. Ein wichtiger Bereich der klinischen Analytik ist deshalb die Ermittlung von Arzneimittel- und Metabolitenkonzentrationen in komplexen Matrices wie Blutplasma und Urin. Zu diesem Zweck werden schnelle, einfache und nachweisstarke analytische Methoden, die zur Bereitstellung von Basisdaten zur Charakterisierung eines Arzneimittels und der Möglichkeit des therapeutischen Drug Monitoring (Optimierung einer Arzneimitteltherapie für einen einzelnen Patienten aufgrund seines individuellen Stoffwechsels) dienen können, benötigt.

Gegenwärtig erfordert die Bestimmung von Zytostatika in matrixbehafteten Proben wie Körperflüssigkeiten einen besonderen Aufwand an Probenvorbereitung, weshalb die Ergebnisse der Messungen nicht zeitgerecht zur weiteren Behandlung des Patienten vorliegen können. Außerdem sind die heutzutage angewendeten Detektionsmethoden nicht nachweisstark genug, um relativ niedrige Konzentrationen an freien (d.h. nicht an Blutbestandteile gebundenen) Arzneimittelwirkstoffen erfassen zu können. Aufgrund dessen sollte in der vorliegenden Arbeit eine schnelle kapillarelektrophoretische Trennmethode in Kombination mit der nachweisstarken Nahfeld-Thermische-Linse-Detektion erarbeitet werden, die einen minimalen Aufwand an Probenvorbereitung benötigt und dazu nachweisstark genug ist, um Spurenkonzentrationen an Arzneimittel in Blutplasma oder Urin erfassen zu können.

## 7.2 Struktureller Aufbau und Wirkungsweise der untersuchten Zytostatika

### 7.2.1 Etoposid und Teniposid

Etoposid ist ein 4-Dimetylepipodophyllotoxin-9-(4,6-ethyliden- $\beta$ -D-glucopyranosid) (Abbildung 49) und hat ein Molekulargewicht von 588, 57 g mol<sup>-1</sup> [72]. Aufgrund seines lipophilen Charakters ist es praktisch unlöslich im Wasser, wenig löslich in Methanol und schwer löslich in Ethanol und Dichlormethan [73], daher wird der Stoff in einem Lösungsmittelgemisch per Infusion verabreicht.

Teniposid unterscheidet sich von Etoposid durch eine Thenylidengruppe am Glucopyranosid (Abbildung 49). Die Toxizität und der Wirkmechanismus der beiden Substanzen sind ähnlich, was auch für ihre Anwendungsgebiete gilt. Da die beiden Stoffe in der Regel nicht zusammen verabreicht werden, kann Teniposid bei der Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat als interner Standard eingesetzt werden [74]. Bei den weiter unten beschriebenen Messungen wurde in der vorliegenden Arbeit Teniposid als interner Standard verwendet.

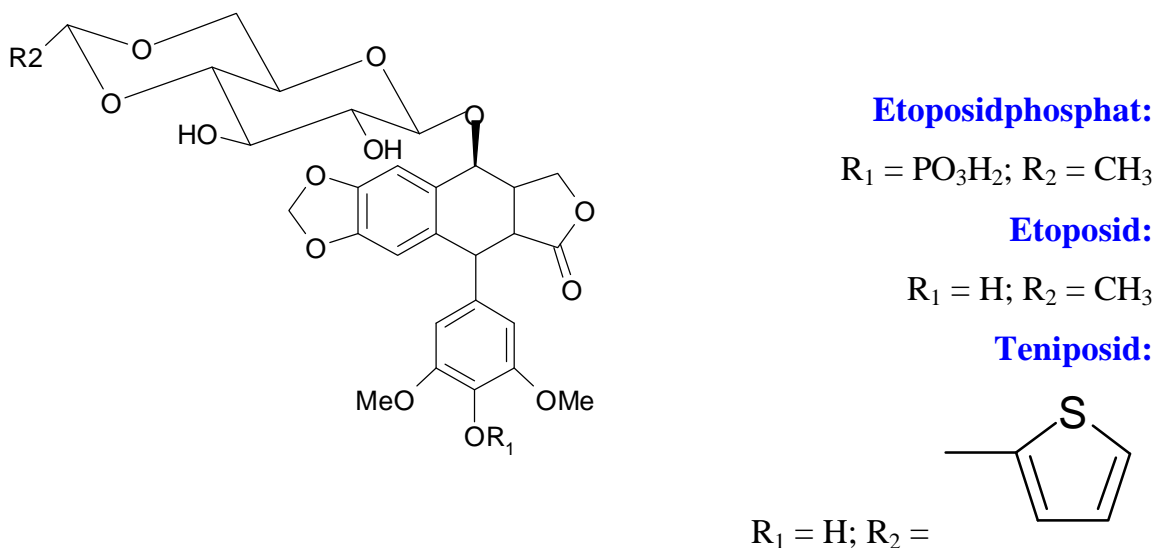


Abbildung 49: Chemische Strukturen von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid

### Wirkungsmechanismus

Antineoplastische Substanzen (Zytostatika) drosseln die Entwicklung und Vermehrung von Geweben mit hoher Proliferationsgeschwindigkeit (Gewebe mit schnell wachsenden Zellen). Da Zellen in neoplastisch entartetem Gewebe sich meistens besonders schnell teilen, ist solches Gewebe bevorzugt betroffen. Aber auch gesundes Gewebe mit hoher Zellteilungshäufigkeit wird in Mitleidenschaft gezogen (Nebenwirkungen wie Knochenmarkdepression, Schleimhautschädigung, Haarausfall). Diese unerwünschte Nebenwirkung begrenzt die Dosierung und macht ihre Optimierung bedeutsam.

Aufgrund des Wirkungsmechanismus lassen sich Zytostatika auf fünf Gruppen teilen:

Schädigung der DNS, Interferenz mit der DNS-Synthese, Interferenz mit der Produktion von Mikrotubulin, Beeinflussung körpereigener Steuerungswege, andere Prinzipien.

Etoposid und Teniposid sind die mit glykosidisch angeknüpften Substituenten versehenen Derivate von Podophyllotoxin. Dieses stammt aus der Alraune (*Podophyllum peltatum*) und ist ein Mitosehemmstoff. Die zytostatische Wirkung der beiden Derivate beruht jedoch nicht auf der Schädigung der Mitose-Spindel, sondern einer Schädigung der DNS und zwar auf einer Hemmung der Topoisomerase II, welche beide DNS-Stränge spaltet, umlagert und wieder verschließt. Die Wiederverknüpfung wird gehemmt, so daß Strangbrüche zurückbleiben [75].

#### **7.2.2 Etoposidphosphat**

Etoposidphosphat ist strukturell dem Etoposid ähnlich, hat aber an der 4-Position des Benzolrings eine Phosphatgruppe (siehe Abbildung 49), was diese Substanz wasserlöslich macht und die therapeutische Applikation erleichtert. Nebenwirkungen, die durch die bei der Infusion von Etoposid verwendeten Lösungsmittel hervorgerufen werden, treten hier nicht mehr auf. Das wasserlösliche Etoposidphosphat wird durch die alkalische Phosphatase innerhalb weniger Minuten (5-30 min) nach der Infusion zu Etoposid abgebaut [76]. Die Konversion von Etoposidphosphat zu Etoposid in Abhängigkeit der Gegenwart oder

Anwesenheit des Enzyms alkalische Phosphatase wurde in der Arbeit von *Jong et al.* untersucht [77]. Nach Inaktivierung des Enzyms fand keine Umwandlung mehr statt. Bei den Blutplasmaproben, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wurde die alkalische Phosphatase durch Verwendung von EDTA-Röhrchen zur Blutentnahme inaktiviert.

Das pharmakokinetische Profil, die Toxizität sowie die klinische Aktivität von Etoposidphosphat sind den Eigenschaften von Etoposid identisch.

### **7.3 Analytische Bestimmungsmethoden von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid**

Bei der Bestimmung von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid in komplexen Matrices spielen chromatographische Trennverfahren und insbesondere die HPLC eine große Rolle. Bis vor kurzem wurde die Trennung und Bestimmung der oben genannten Zytostatika mittels HPLC und photometrischer UV-Detektion, Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektion durchgeführt [78-80]. Hierbei können jedoch einige Trenn- und Detektionsschwierigkeiten (insbesondere bei der elektrochemischen Detektion), die auf eine komplexe Zusammensetzung des Trennmatrices zurück zu führen sind, auftreten. Die Fluoreszenzdetektion stellt zwar bei der Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat eine nachweisstärkere Alternative zur photometrischen Detektion dar, ist aber in wasserhaltigen Lösungen, wegen der ungünstigen Auswirkung der Wassermatrix auf die Fluoreszenzquantenausbeute der obengenannten Zytostatika nicht ohne weiteres einsetzbar.

In der Arbeit von *Saita et al.* [81] wurde ein ELISA-Test für die Bestimmung von Etoposid mit einer Nachweisgrenze von  $40 \text{ pg mL}^{-1}$  entwickelt. Hierbei kann es jedoch zu Problemen der Spezifität (Kreuzreaktionen mit Mataboliten und Abbauprodukten) kommen.

In den letzten fünf Jahren wurden einige Trenn- und Bestimmungsmethoden für die untersuchten Zytostatika basierend auf der Kapillarelektrophorese und verwandter Trennmethode beschrieben [74, 82 83]. Zum Beispiel wurde in der Dissertation von *Feisel* [74] ein Bestimmungsverfahren entwickelt, welches eine Abtrennung der geladenen Komponenten der biologischen Matrix durch Isotachophorese (ITP) in

einem geschlossenen System ermöglicht, um anschließend die Analyte in einer zweiten Kapillare durch Elektrophorese zu trennen und zu quantifizieren. In diesem Zusammenhang muß das Detektionsproblem angesprochen werden: die konventionelle photometrische Detektion liefert in der Kapillaren nicht ausreichend niedrige Nachweisgrenzen. Aufgrund dessen werden hier aus der mikro-HPLC bekannte Z-Zellen (siehe Kapitel 3.6.1) in Kombination mit Dioden-array-Detektoren eingesetzt [83].

In der Arbeit von *Soetebeer* et al. wurde eine kapillarelektrophoretische Trennung von Etoposid und Etoposidphosphat im Blutplasma in Kombination mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion (LIF) entwickelt [82]. Hierbei wurden die Analyte in geladene Boratkomplexe umgewandelt, mittels CE getrennt und mit Hilfe eines LIF-Detektors unter Verwendung einer CCD-Kamera detektiert. Die Nachweisgrenzen betragen  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  für Etoposid und  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  für Etoposidphosphat.

#### **7.4 Kapillarelektrophoretische Trennung von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid mit photmetrischer UV-Detektion**

Da Etoposid und Teniposid in den zumeist verwendeten Trennpuffern ungeladen vorliegen, wurde zu Beginn der Untersuchungen basierend auf den Ergebnissen aus dem Kapitel 6.4 ein MEKC-Elektrolytssystem auf der Basis von Borsäure und Dinatriumtetraborat hergestellt. Die verwendete Pufferlösung hatte folgende Zusammensetzung:

*2,5 mmol L<sup>-1</sup> Borsäure*

*12,5 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumtetraborat*

*25 mmol L<sup>-1</sup> Natriumdodecylsulfat (SDS)*

*pH 8,9*

Die Herstellung der Pufferlösung wurden wie in Kapitel 6.4 durchgeführt.

Für die Herstellung der Stammlösungen wurden jeweils 50 mg des ausgewählten Analyten (Etoposid und Etoposidphosphat) in 10 mL Acetonitril gelöst, für die



Herstellung der Stammlösung von Teniposid wurden 50 mg des Zytostatikums in 10 ml Mischung aus Acetonitril und Methanol (1:1) gelöst.

Bei der Herstellung der MEKC-Standardmischungen wurden 10  $\mu\text{L}$  von jeder Stammlösung in ein Eppendorf-Gefäß gebracht und mit dem Milli-Q Wasser auf 2 mL aufgefüllt, so daß die Endkonzentration von Acetonitril in der Standardmischung 1,25% betrug.

Die instrumentellen Trennparameter für die MEKC-Trennung wurden aus Kapitel 3.4 übernommen.

Die Trennungsspannung betrug 30 kV;

Die Probenaufgabe erfolgte hydrodynamisch durch Anlegen (0,7 s) eines Vakuums auf das Puffergefäß auf der Detektionsseite.

#### 7.4.1 Absorptionsspektren von Etoposid und Teniposid

Um die Eignung der Thermische-Linse-Detektion mit einem Argon-Ionen Laser (257 nm) als Anregungslichtquelle für die Bestimmung von ausgewählten Zytostatika zu überprüfen, wurden die Absorptionsspektren von Etoposid und Teniposid in der hergestellten Elektrolytlösung mit Hilfe eines Dioden-array-Detektors aufgenommen (Abbildung 50).

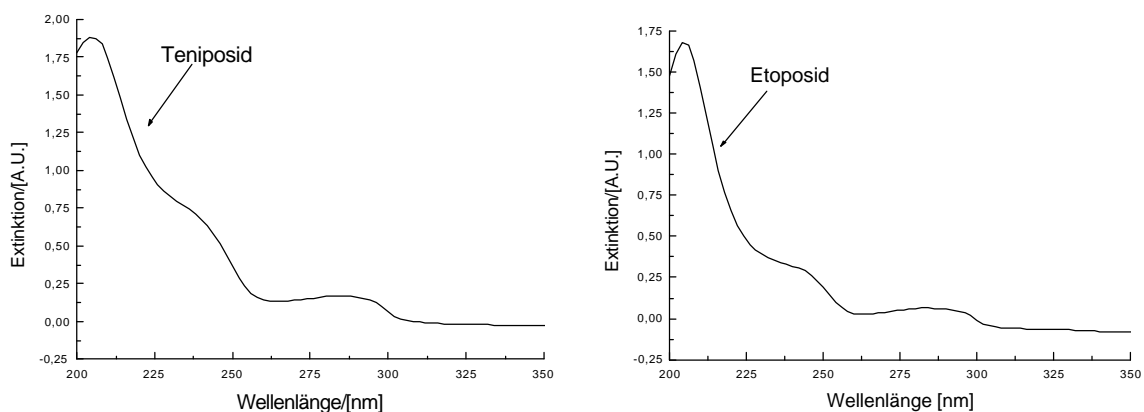


Abbildung 50: Absorptionsspektren von Etoposid und Teniposid. Messbedingungen: Puffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Dioden-array-Detektor; Quarzglasküvette 1 cm; Analyte: Teniposid  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Etoposid  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Aus der Abbildung wird deutlich, daß bei der Wellenlänge von 257 nm Etoposid um einen Faktor zwanzig und Teniposid um einen Faktor neun schwächere Absorption aufweisen als im Absorptionsmaximum (214 nm). Da es aber bei der Thermischen-Linse-Detektion um eine insgesamt sehr nachweisstarke Methode handelt, sollte die bei der Wellenlänge von 257 nm vorhandene Absorption ausreichen um relativ niedrige Nachweisgrenzen unter optimalen Detektionsbedingungen zu erreichen.

#### 7.4.2 Optimierung der Trennbedingungen bei der Bestimmung der Zytostatika

Aufgrund der nicht bekannten optimierten MEKC-Trennbedingungen bei der Bestimmung der Zytostatika, wurden zu Beginn der Untersuchungen die Trennbedingungen, die bei der Bestimmung der Nitroverbindungen (Kapitel 6.4) verwendet worden waren, hier übernommen. Da es sich dabei aber nicht unbedingt um optimale Trennbedingungen handelt, sollten zuerst die Messungen mit einem konventionellen photometrischen UV-Detektor durchgeführt werden.

Eine Trennung von drei Zytostatika unter Verwendung des im Kapitel 6.4 beschriebenen Pufferelektrolyten ist in Abbildung 51 präsentiert.

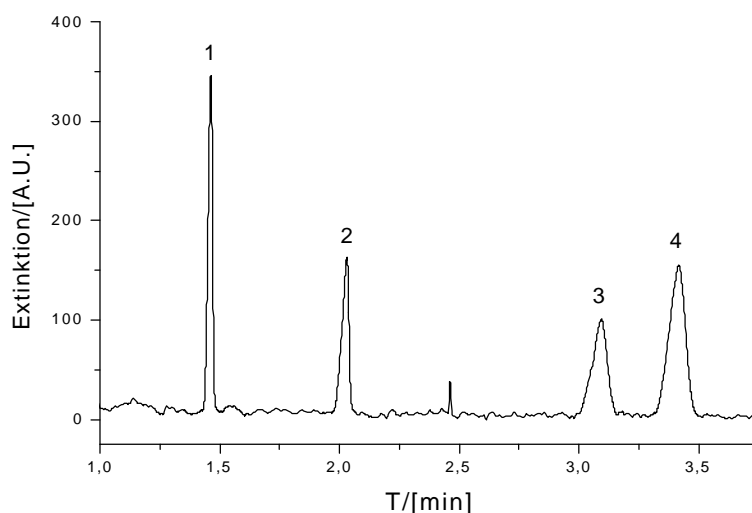


Abbildung 51 : MEKC-Trennung von drei Arzneimittelwirkstoffen mit photometrischer UV-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennspannung 30 kV; Kapillarlänge 71,5(39) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; photometrische Detektion 214 nm; Analyte: 1 EOF (Thioharnstoff), 2 Etoposidphosphat  $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , 3 Etoposid  $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , 4 Teniposid  $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Unter den vorgestellten Trennbedingungen ist eine vollständige Auftrennung der Zytostatika zu beobachten, allerdings sind die Peaks von Etoposid und Teniposid relativ breit, was auf eine niedrige Trennstufenzahl für die Peaks der beiden Zytostatika hindeutet.

Um die vorhandene Trennung zu verbessern wurden die Konzentrationen von Borsäure und Dinatriumtetraborat im Trennelektrolyten erhöht. Die neue Pufferlösung hatte folgende Zusammensetzung:

**5 mmol L<sup>-1</sup> Borsäure**

**25 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumtetraborat**

**25 mmol L<sup>-1</sup> Natriumdodecylsulfat (SDS)**

**pH 8,9**

Unter Verwendung der neu hergestellten Pufferlösung wurde eine Trennung von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid durchgeführt (Abbildung 52).

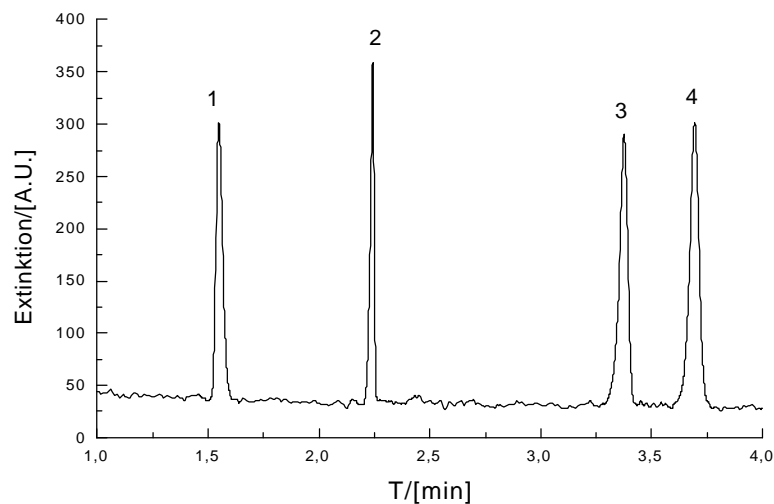


Abbildung 52 : MEKC-Trennung von drei Arzneimittelwirkstoffen mit photometrischer UV-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer 5 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumtetraborat, 25 mmol L<sup>-1</sup> Borsäure, 25 mmol L<sup>-1</sup> SDS; pH 8,9; Trennspannung 30 kV; Kapillarlänge 71,5(39) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; photometrische Detektion 214 nm; Analyte: **1** EOF (Thioharnstoff), **2** Etoposidphosphat 25 µg mL<sup>-1</sup>, **3** Etoposid 25 µg mL<sup>-1</sup>, **4** Teniposid 25 µg mL<sup>-1</sup>.

Anhand der Abbildung wird ersichtlich, daß unter den neuen Trennbedingungen sowohl eine vollständige Trennung aller interessierenden Komponenten als auch eine bessere Effizienz erreicht worden waren. Weitere Messungen mit der Thermischen-Linse-Detektion werden unter Verwendung der in Abbildung 52 aufgeführten optimierten Trennbedingungen durchgeführt.

Um in der Zukunft einen direkten Vergleich der photometrischen Detektion mit der Thermischen-Linse-Detektion anstellen zu können, wurde die vorgestellte Trennung mit derselben Probe unter Beibehaltung der Trenn- und Injektionsbedingungen bei einer Detektionswellenlänge von 257 nm unter Verwendung des photometrischen Detektors durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 53 dargestellt.

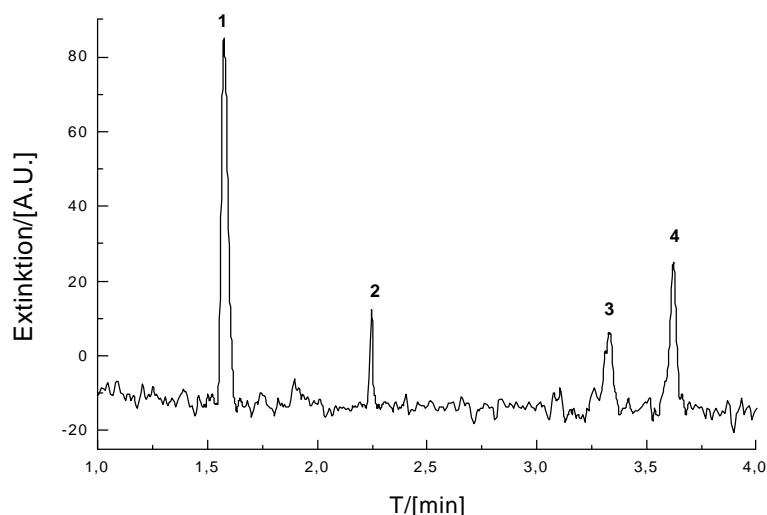


Abbildung 53: MEKC-Trennung von drei Arzneimittelwirkstoffen mit photometrischer UV-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennspannung 30 kV; Kapillarlänge 71,5(39) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; photometrische Detektion 257 nm; Analyte: **1** EOF (Thioharnstoff), **2** Etoposidphosphat  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , **3** Etoposid  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , **4** Teniposid  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Wie es aus den Absorptionsspektren (siehe Abbildung 50) zu erwarten war, führt die Änderung der Detektionswellenlänge von 214 nm auf 257 nm bei der photometrischen UV-Detektion zu einer starken Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses.

## **7.5 Kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat unter Verwendung des NFTL-Detektors**

In Kapitel 5.3 wurde im Hinblick auf die Optimierung der Detektionsbedingungen bei der Bestimmung der Nitroverbindungen der Einfluß verschiedener Parameter wie z. B. die Abhängigkeit von der Chopperfrequenz und von der Laserleistung auf die Thermische-Linse-Detektion untersucht. Da die optimierten Detektionsbedingungen für die Bestimmung von Nitroverbindungen sich nicht zwangsläufig bei jeder weiteren Anwendung als optimal erweisen, sollte im folgenden Kapitel der Einfluß der in Kapitel 5.3 beschriebenen Parameter auf das Thermische-Linse-Signal bei der Bestimmung der Zytostatika untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden Messungen mit der vollständig gefüllten Kapillare durchgeführt. Hier ist es wichtig zu vermerken, dass durch eine geänderte Positionierung der CE-Anlage relativ zum TL-Detektor eine Verkürzung der Kapillare von 107 (68) cm auf 71,5 (39) cm ermöglicht wurde. Damit sollten größere Wanderungsgeschwindigkeiten und dadurch kürzere Analysenzeiten bei gleicher Trennungsspannung erreicht werden.

Bei diesen Untersuchungen wurde die Kapillare mit einer Lösung von Etoposidphosphat ( $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) oder Teniposid ( $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) im Trennpuffer (siehe Abbildung 52) vollständig gefüllt. Es wurden jeweils die zwischen den Puffergefäßen angelegte Hochspannung, die Modulationsfrequenz oder die Laserleistung variiert.

### **7.5.1 Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung bei der Bestimmung der Zytostatika**

Wie in Kapitel 5.3.1 bereits beschrieben, folgt aus der Theorie der Thermischen Linse ein linearer Zusammenhang zwischen der TL-Signalintensität und der eingestrahlten Laserenergie. In Abbildung 54 ist die Abhängigkeit der TL-Signalintensität von der Anregungslaserleistung dargestellt. Bei diesen Messungen wurde eine Kapillare mit einer Lösung von Etoposidphosphat oder Teniposid vollständig gefüllt, es wurde eine Spannung von 30 kV auf die Puffergefäße angelegt, und die Anregungslaserleistung wurde von 5 bis 150 mW variiert. Die Chopperfrequenz betrug 33 Hz.

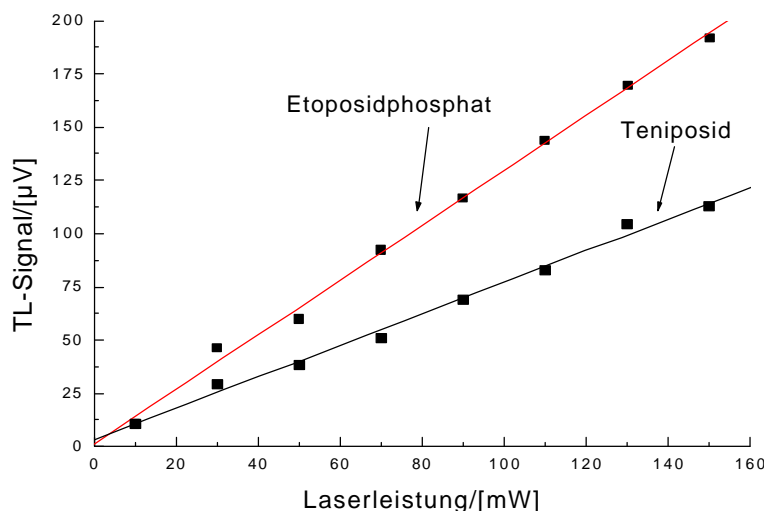


Abbildung 54: Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung. Analyte: Etoposidphosphat ( $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer), Teniposid ( $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer); Kapillare:  $71,5(39) \text{ cm}$ , I.D.  $75 \mu\text{m}$ , vollständig mit der Lösung eines Analyten gefüllt; Hochspannung  $30 \text{ kV}$ ; Chopperfrequenz  $33 \text{ Hz}$ .

Anhand der Abbildung wird ersichtlich, daß unter den dargestellten Bedingungen im gesamten Bereich der experimentell zugänglichen Laserleistungen ein linearer Zusammenhang zwischen der TL-Signalintensität und der eingestrahlenen Laserenergie zu beobachten ist. Infolgedessen kann die Laserleistung bei weiteren TL-Messungen frei gewählt werden.

### 7.5.2 Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz bei der Bestimmung der Zytostatika

In Kapitel 5.3.2 wurden zwei Aspekte für die Wahl der Chopperfrequenz beschrieben. Einer davon ist die Abhängigkeit der TL-Signalintensität von der Modulationsfrequenz. Diese legt die Dauer der Anregungs- und Abkühlungsphase fest, was in der Regel bei steigender Chopperfrequenz und gleichbleibender Laserleistung zur Abnahme des TL-Signals führt. Ein weiterer Aspekt ist die Chopperfrequenzabhängigkeit des relativen TL-Signalrauschens. Dieses ist für die Nachweisempfindlichkeit der entwickelten Methode von großer Bedeutung. Abbildung 55 zeigt die Abhängigkeit der TL-Signalintensität und des relativen TL-

Signalrauschens (die Standardabweichung der Signalintensität geteilt durch die mittlere Signalhöhe) von der Modulationsfrequenz.

Da das Anlegen der Hochspannung auf die Puffergefäße und die daraus resultierende Wanderung der Analyte durch die Kapillare zu einer zusätzliche Erhöhung des Signalrauschen führt, wurden die Messungen, die in Abbildung 55 präsentiert sind, unter statischen Bedingungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Kapillare mit einer Lösung von Etoposidphosphat ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer) vollständig gefüllt. Um eine photochemische Zerstörung der Analytmoleküle unter Einwirkung des Laserstrahls ausschließen zu können, wurde eine Leistung des Pump-Lasers von nur 5 mW ausgewählt.

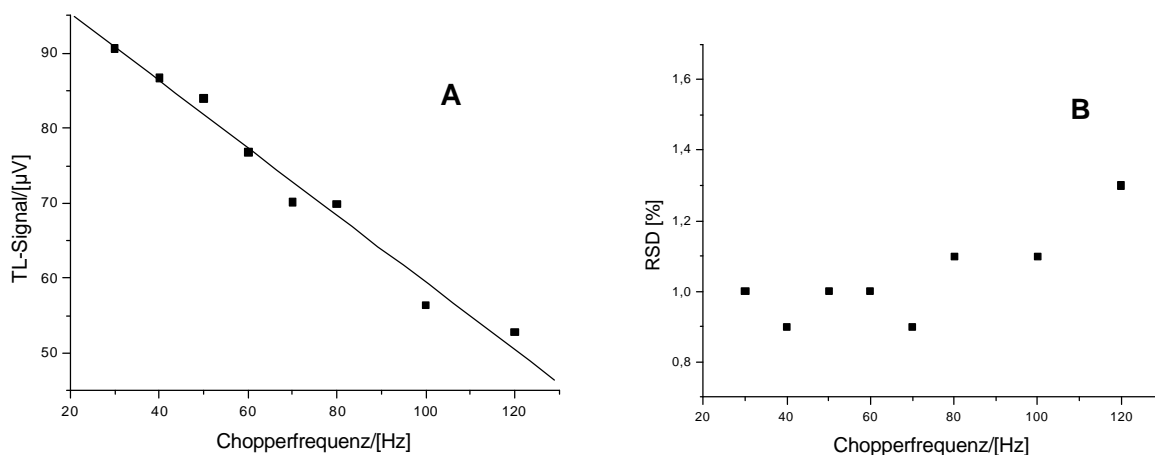


Abbildung 55: Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz (A) und des Signal/Rausch-Verhältnisses von der Chopperfrequenz (B). Analyt: Etoposidphosphat  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  im Puffer; Kapillare:  $71,5(39) \text{ cm}$ , I.D.  $75 \mu\text{m}$ , vollständig mit der Analytlösung gefüllt; Statische Messungen, Laserleistung 5 mW.

Wie schon bei der Bestimmung von Nitroverbindungen zu beobachten war, führt die Erhöhung der Modulationsfrequenz bei der Untersuchung von Etoposidphosphat zur Abnahme der TL-Signalintensität. Dagegen bei der Abhängigkeit des relativen TL-Signalrauschens von der Chopperfrequenz konnte kein eindeutiger Trend festgestellt werden. Aufgrund dessen wurde für die weiteren Messungen eine Frequenz ausgewählt, bei der das TL-Signal maximal war. Diese Frequenz betrug 30 Hz.

### 7.5.3 Abhängigkeit des TL-Signals von der Wanderungsgeschwindigkeit der untersuchten Zytostatika

Die Ausbildung der Thermischen Linse wird außer von der Laserleistung und der Chopperfrequenz auch durch die vom EOF erzwungene Konvektion in der Kapillare beeinflusst. Dadurch ist eine Abhängigkeit der TL-Signalintensität von der Fließgeschwindigkeit der flüssigen Phase zu erwarten.

Zur Messung der Abhängigkeit des TL-Signals von der Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten (Abbildung 56) wurde die Kapillare mit einer Lösung von Etoposid, Etoposidphosphat oder Teniposid vollständig gefüllt. Die angelegte Spannung wurde in einem Bereich von 10 bis 30 kV variiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyte  $v$  wurde nach Gleichung 27 aus Kapitel 5.3.3 berechnet.

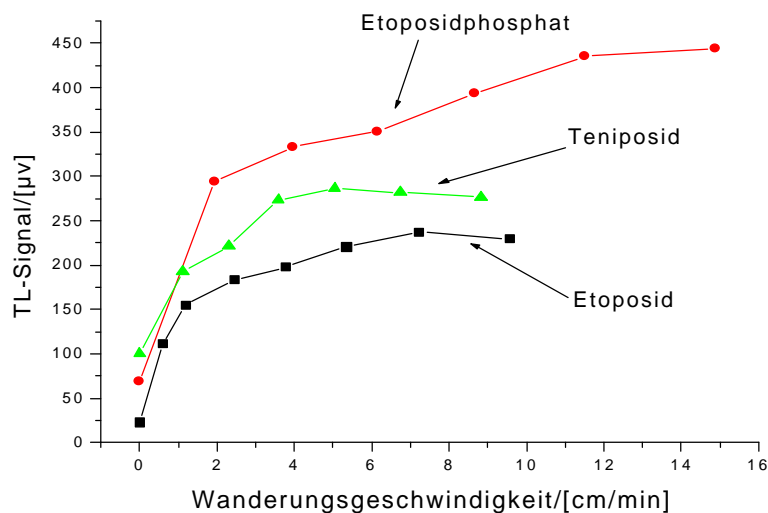


Abbildung 56: TL-Signal in Abhängigkeit von der Wanderungsgeschwindigkeit der Analyte. Analyte: Etoposidphosphat ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer), Etoposid ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer), Teniposid ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer); Kapillare: 71,5 (39) cm, I.D.  $75 \mu\text{m}$ , vollständig mit den Analytlösungen gefüllt; Laserleistung 53 mW, Chopperfrequenz 30 Hz.

Wie Abbildung 56 zeigt, nimmt die Signalintensität für Etoposidphosphat mit zunehmender Wanderungsgeschwindigkeit in der Kapillare zu. Die Zunahme des TL-Signals wird jedoch mit steigender Wanderungsgeschwindigkeit geringer bis schließlich bei einer Geschwindigkeit von 12 cm/min ein praktisch konstanter Wert erreicht wird.



Bei Etoposid und Teniposid ist im Bereich vom statischen Zustand bis zur Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten von 4 cm/min wie im Fall von Etoposidphosphat eine starke Zunahme der Signalintensität zu beobachten. Eine weitere Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit führt zum Abflachen der Kurve und im Geschwindigkeitsbereich von 6 cm/min bis 9 cm/min zu einer praktisch konstanten TL-Signalintensität. Hier ist anzumerken, daß die statischen Messungen mit Teniposid sehr schnell durchgeführt werden mußten, da durch die lange Bestrahlung der Kapillare mit dem Argon-Ionen-Laser Probleme mit der Stabilität von Teniposid auftraten. Eine lange Bestrahlungsdauer führte zu einer drastischen Zunahme der TL-Signalintensität von 100  $\mu\text{V}$  auf Werte von über 1000  $\mu\text{V}$ .

Unter Berücksichtigung der Optimierung des TL-Detektionsbedingungen bei der Bestimmung der Zytostatika ergeben sich folgende optimalen Meßparameter: Anregungslaserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 30 Hz und Trennspannung 30 kV.

#### **7.5.4 Bestimmung von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid mit dem TL-Detektor nach MEKC-Trennung**

Die Trennung der drei Zytostatika wurde unter Verwendung der in Kapitel 7.4.2 optimierten Trennbedingungen durchgeführt. Die optimalen Detektionsbedingungen wurden gemäß Kapitel 7.5.3 festgelegt.

Die folgende Abbildung 57 zeigt eine Trennung von Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid in Kombination mit der Nahfeld-Thermischen-Linse-Detektion.

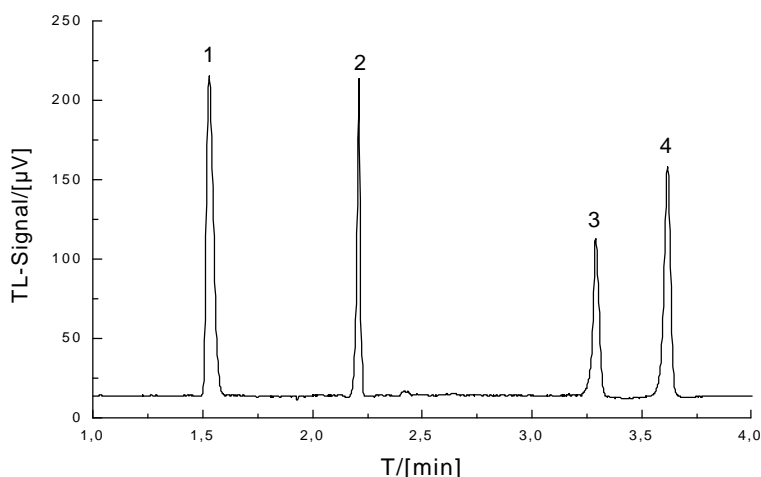


Abbildung 57: MEKC-Trennung von drei Zytostatika mit Thermischer-Linse-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 71,5 (39) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; Detektion: Thermische Linse 257 nm, Laserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 30 Hz; Analyte: **1** EOF (Thioharnstoff), **2** Etoposidphosphat  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , **3** Etoposid  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , **4** Teniposid  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Aus einem Vergleich der Abbildungen 57 und 53 wird ersichtlich, daß unter Verwendung der Thermischen-Linse-Detektion das Signal/Rausch-Verhältnis gegenüber der photometrischen UV-Detektion sich deutlich verbessert hat.

Für die vorgestellte Trennung wurden die Wiederholpräzisionen für die Migrationszeiten, für die Peakflächen, für die Peakhöhen, sowie die Trennstufenzahlen für fünf aufeinanderfolgende Messungen ausgerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Wiederholpräzisionen der Migrationzeiten, Peakhöhen und Peakflächen, sowie Trennstufenzahlen bei der MEKC-Trennung von 3 Zytostatika mit der Thermischen-Linse-Detektion (fünf aufeinander folgende Messungen). Messbedingungen wie in Abbildung 57

Verbindung	F	RSD <sub>1</sub>	RSD <sub>2</sub>	t <sub>m</sub>	RSD <sub>1</sub>	RSD <sub>2</sub>	H	RSD <sub>1</sub>	RSD <sub>2</sub>	N
<b>Etoposid-phosphat</b>	3,58	7,0	5,8	2,21	1	0,25	239	3,9	7,3	153000
<b>Etoposid</b>	3,12	2,9	2,9	3,29	1,2	0,16	93,2	8,2	2,1	55100
<b>Teniposid</b>	4,78	7,0	-	6,60	0,85	-	138	6,2	-	52600

F = mittlere Peakfläche

$t_m$  = mittlere Migrationszeit

H = mittlere Peakhöhe

$RSD_1$  = relative Standardabweichungen der Peakflächen, Peakhöhen sowie der Migrationszeiten [%].

$RSD_2$  = relative Standardabweichungen der durch die Peakfläche des internen Standards geteilten Peakflächen, durch die Peakhöhe des internen Standards geteilten Peakhöhen sowie durch die Migrationszeit des internen Standards geteilten Migrationszeiten [%].

Aus Tabelle 16 wird deutlich, daß die auf den internen Standard bezogenen Migrationszeiten eine um einen Faktor vier für Etoposidphosphat und eine um einen Faktor sieben für Etoposid bessere Wiederholpräzision haben, als die absoluten Migrationszeiten der Zytostatika. Die Wiederholpräzisionen der auf den internen Standard bezogenen Peakflächen sind ebenfalls verbessert gegenüber denen der absoluten Peakflächen. Bei den durch die Peakhöhe des internen Standards dividierten Peakhöhen wurden jedoch keine Verbesserung der Wiederholpräzision erzielt. Dies wird vermutlich wie im Fall der Nitroaromaten durch das hohe Rauschen des TL-Signals in der Gegenwart des Analyten (Kapitel 6.4, Abbildung 45) verursacht.

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 17) sind die Nachweisgrenzen bei der Bestimmung der einbezogenen Zytostatika mit der TL- und mit photometrischer Detektion gegenüber gestellt. Zum Vergleich wurden noch die entsprechenden Nachweisgrenzen bei der photometrischen UV-Detektion im Absorptionsmaximum (214 nm) hinzugefügt.

*Tabelle 17: Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für die untersuchten Zytostatika bei der TL-Detektion und bei der UV-Detektion bei 257nm und 214 nm*

<b>Verbindung</b>	<b>TLD (257 nm) [ng/mL]</b>	<b>UVD (257 nm) [ng/mL]</b>	<b>UVD (214 nm) [ng/mL]</b>
<b>Etoposidphosphat</b>	100	6000	580
<b>Etoposid</b>	170	8300	740
<b>Teniposid</b>	120	4000	710

Wie Tabelle 17 zeigt, ist unter Verwendung der Thermischen-Linse-Detektion eine Verbesserung der Nachweisgrenzen um den Faktor 35 bis 60 gegenüber photometrischer UV-Detektion bei identischer Wellenlänge erreichbar. Außerdem sind die mit der Thermischen-Linse-Detektion erzielbare Nachweisgrenzen um einen Faktor 4 bis 6 niedriger als die, welche mit der photometrischen Detektion im Absorptionsmaximum erhalten wurden. Weiterhin liegen die mit der TL-Detektion erzielbaren Nachweisgrenzen in der gleichen Größenordnung wie die mittels LIF-Detektion erreichten (gemäß der Arbeit von *Soetebeer* et al. [82]:  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  für Etoposid und  $30 \text{ ng mL}^{-1}$  für Etoposidphosphat).

Dieses Ergebnis ist eine weitere Bestätigung dafür, daß es sich bei der Nahfeld-Thermischen-Linse-Detektion um eine insgesamt sehr nachweisstarke molekülspektrometrische Detektionsmethode handelt, die für Analyte mit niedriger Quantenausbeute der Fluoreszenz als Alternative zur LIF-Detektion betrachtet werden kann..

Um die Richtigkeit beim Ausrechnen der Nachweisgrenzen zu bestätigen, wurde eine CE-Messung mit dem TL-Detektor für die Bestimmung von Etoposidphosphat in der Konzentration von  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  durchgeführt (Abbildung 58).

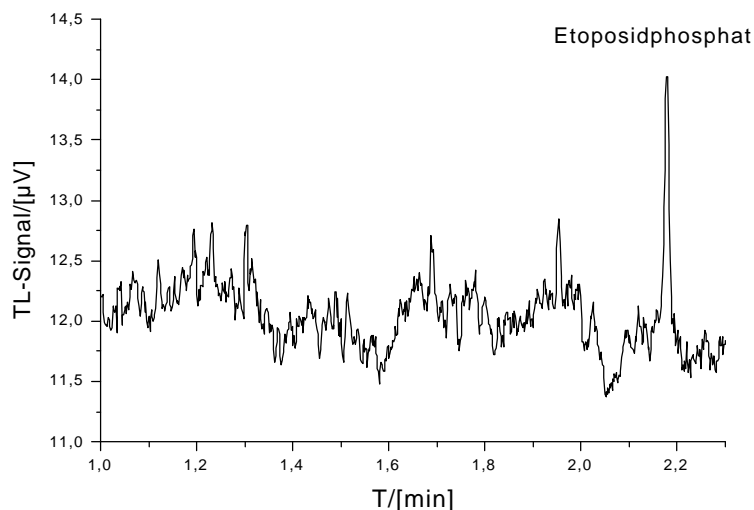


Abbildung 58: Bestimmung von Etoposidphosphat mit Thermischer-Linse-Detektion. Messbedingungen wie in Abbildung 56. Analyte: Etoposidphosphat  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Aus der Abbildung geht hervor, daß in der Konzentrationen der Nachweisgrenze der Peak von Etoposidphosphat noch nachweisbar ist, was die Richtigkeit der ausgerechneten Nachweisgrenzen bestätigt.

### 7.5.5 Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen für die untersuchten Zytostatika

Zur weiteren Charakterisierung der entwickelten Methode wurde für zwei der untersuchten Zytostatika (Etoposidphosphat und Teniposid) eine Kalibration durchgeführt. Ausgehend von zwei Stammlösungen (Konzentration  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) wurden durch Verdünnung mit dem Milli-Q Wasser je sechs Lösungen von jedem Zytostatikum (Analytkonzentration von  $0,5$  bis  $25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) hergestellt. Die Analyse der 12 hergestellten Lösungen wurde unter den in Abbildung 57 angegebenen Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 59 sind die Kalibriergeraden von Etoposidphosphat und Teniposid präsentiert.

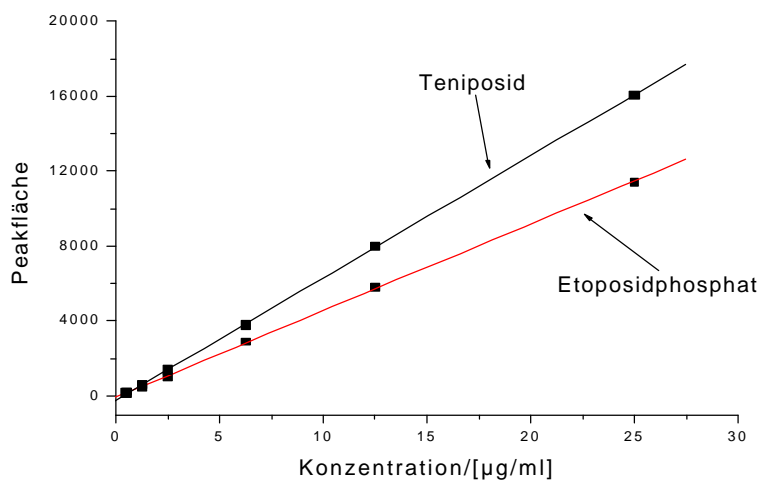


Abbildung 59: Kalibriergeraden für Etoposidphosphat und Teniposid. Messbedingungen wie in Abbildung 57.

Die Linearität der Kalibrierfunktionen wurde mit Hilfe des Anpassungstests von Mandel (F-Test) (siehe Kapitel 4.3.7) überprüft. In nachfolgender Tabelle 18 ist der Vergleich der berechneten F-Werte (siehe Gleichung 27)  $F_{\text{ber}}$  mit dem tabellierten F-Wert  $F_{\text{tab}}$  für die Kalibrierfunktion von Etoposidphosphat und Teniposid dargestellt.

*Tabelle 18: F-Test für die Kalibrierfunktion von Etoposidphosphat und Teniposid  
(Signifikanzniveau 95%)*

<b>Verbindung</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>F<sub>ber</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub> (95%, 1, 3)</b>
<b>Etoposidphosphat</b>	6	0,99975	0,84	10,13
<b>Teniposid</b>	6	0,99903	7,30	10,13

Die Tabelle zeigt, daß durch eine Kalibrierfunktion zweiten Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht werden kann und somit die Linearität der Kalibrierfunktion angenommen werden darf.

### **7.5.6 Übertragbarkeit der Methode auf Realproben**

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der entwickelten Methode auf reale matrixbehaftete Proben wurde eine Analyse des mit den Analyten versetzten eigenen Blutplasmas verwendet.

In Tabelle 19 sind wichtige Blutplasmakomponenten und ihre Konzentrationsbereiche aufgelistet [84, 85].

*Tabelle 19: Wichtige Komponenten und ihre Konzentrationsbereiche im menschlichen Blutplasma*

<b>Proteine</b>	<b>Konzentrationsbereich [g/dL]</b>
Gesamtprotein	6,6-8,7
Albumin	3,6-5,5
α-Globulin	0,6-1,5
β-Globulin	0,6-1,3
γ-Globulin	0,7-1,7
<b>Ionen</b>	<b>Konzentrationsbereich [mmol/L]</b>
Natriumionen	135-145
Kaliumionen	3,5-5,0
Chloridionen	97-108

Aufgrund der komplexen heterogenen Zusammensetzung des Blutplasmas ist die Bestimmung von Arzneimittelwirkstoffen in solchen Proben schwierig. Vor allem wirkt sich die Proteinfraction auf eine kapillarelektrophoretische Trennung nachteilig aus. Hierbei werden die Proteine an der Kapillaroberfläche adsorbiert, und dadurch wird der EOF verändert, was zu einer verschlechterten Wiederholpräzision der Migrationszeiten führt. Weiterhin treten starke Wechselwirkungen zwischen Arzneimittelwirkstoffen und Proteinen auf und der an die Proteinen gebundene Analytanteil wird der Detektion entzogen [86].

Um diese Problematik zu umgehen, sind von zahlreichen Autoren Strategien zur Abtrennung der Blutplasmaproteine entwickelt worden. Neben der Festphasenextraktion werden die Mikrodialyse, die Ultrafiltration und eine Fällung mit Acetonitril angewendet. Bei den meisten dieser Verfahren werden die Proteine denaturiert, und infolge dessen wird die an die Plasmaproteine gebundene Wirkstoff-Fraktion freigesetzt. Die gemessene Wirkstoffkonzentration ist bei diesen Verfahren somit der Summenparameter aus frei im Plasma vorliegendem Wirkstoff und proteingebundenem Wirkstoff. Da für die vorliegende Arbeit die exakte Bestimmung des proteingebundenen Arzneimittelwirkstoffanteils im unveränderten Blutplasma von untergeordnetem Interesse war, wurde basierend auf den Ergebnissen aus der Arbeit von *Soetebeer* et al.[82] eine Deproteinierung durch Verdünnen mit Acetonitril zur Proteinabtrennung vorgenommen. Dieser Probenvorbereitungsschritt ist relativ einfach, benötigt keine zusätzliche Instrumentierung und kann schnell durchgeführt werden. Die Abtrennung der Proteine wurde in zwei verschiedenen Varianten realisiert. Diese werden in den nachfolgenden Kapiteln 7.5.7 und 7.5.8 detailliert beschrieben.

### **7.5.7 Probenvorbereitungsmethode 1**

Das frisch abgenommene Blut wurde etwa eine Stunde in einem EDTA-Röhrchen stehen gelassen. Nachdem sich Blutteilchen niedergeschlagen haben, wurden 400  $\mu\text{l}$  Plasma davon abgenommen, je 10  $\mu\text{l}$  von jeder Analytstammlösung (siehe Kapitel 7.4) und 750  $\mu\text{l}$  Acetonitril dazu gegeben und 10 min zentrifugiert. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  von dem Zentrifugat entnommen, dazu 942  $\mu\text{l}$  Wasser und 8,5  $\mu\text{l}$  interner Standard (20-mal mit Acetonitril verdünnte Stammlösung ( $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ))

siehe Kapitel 7.4) gegeben. Die so hergestellte Lösung wurde für die weiteren Messungen verwendet. Der Acetonitril-Gehalt in der Endlösung betrug 4%, die Konzentrationen von Etoposidphosphat, Etoposid und Teniposid betragen je  $2,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die Pufferzusammensetzung und die Trenn- und Detektionsbedingungen waren denen der für die Standardmischungsmessungen verwendeten identisch (siehe Abbildung 57).

In nachfolgender Abbildung 60 ist eine Trennung von Etoposidphosphat, Etoposid und Teniposid aus der hergestellten Blutplasmaprobe dargestellt. Zum Vergleich ist ein Elektropherogramm von einer zytostatikafreien Blutplasmaprobe hinzugefügt.

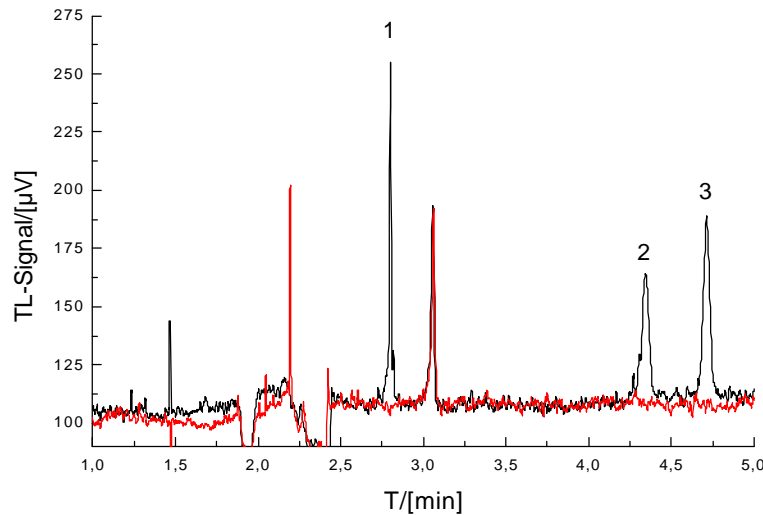


Abbildung 60: MEKC-Trennung von drei Zytostatika in einer Blutplasmaprobe (Probenvorbereitungsmethode 1) in Kombination mit Thermischer-Linse-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 71,5 (39) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; Detektion: Thermische-Linse 257 nm, Laserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 30 Hz; Analyte: **1** Etoposidphosphat  $2,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ , **2** Etoposid  $2,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ , **3** Teniposid  $2,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Aufgrund des Einflusses der komplexen Probenmatrix haben sich die Retentionszeiten der einzelnen Zytostatika gegenüber denen der Standardmischung verschoben, daher ist die Identifizierung der einzelnen Zytostatika durch einen Vergleich der Retentionszeiten nicht ohne weiteres möglich. Infolgedessen wurde die Zuordnung durch einen Vergleich der sogenannten korrigierten Retentionszeiten



in Standardlösungen und Realprobe vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden Retentionszeiten der Analyten durch die Retentionzeit des internen Standards (Teniposid) geteilt. Die daraus resultierenden korrigierten Retentionszeiten wurden mit den korrigierten Retentionszeiten der Standardmischung verglichen. Die aus dem Vergleich erhaltene Elutionsreihenfolge wurde zusätzlich durch das Zusetzen von Einzelstandards abgesichert und in ihrer Richtigkeit bestätigt.

Zur weiteren Charakterisierung der Methode wurden für die dargestellte Trennung die Wiederfindungsraten bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die aus dem in Abbildung 60 dargestellten Elektropherogramm erhaltene Peakflächen von Etoposid und Etoposidphosphat durch die Peakfläche des internen Standards (Teniposid) geteilt und mit den auf den internen Standard korrigierten Peakflächen in der Standardmischung verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 präsentiert.

*Tabelle 20: Wiederfindungsraten von Etoposid und Etoposidphosphat in einer Blutplasmaprobe (Probenvorbereitung 1)*

<b>Verbindung</b>	<b>gegebene Konzentration [<math>\mu\text{g/mL}</math>]</b>	<b>gefundene Konzentration [<math>\mu\text{g/mL}</math>]</b>	<b>Wiederfindungs- rate [%]</b>
<b>Etoposidphosphat</b>	2,13	2,2	103
<b>Etoposid</b>	2,13	2,5	117

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei der vorgestellten Probenvorbereitungsmethode eine gute Wiederfindungsrate für Etoposidphosphat erreicht wurde. Im Fall von Etoposid ist die gefundene Konzentration höher als die gegebene, dies ist vermutlich auf Matrixeffekte in der Blutplasmaprobe, zum Beispiel auf das Komigrieren des Etoposids mit bei der Meßwellenlänge absorbierenden Matrixbestandteilen, zurückzuführen.

Ein Nachteil der verwendeten Probenvorbereitungsmethode besteht darin, daß durch die starke Verdünnung der mit den Zytostatika versetzten Blutplasmaprobe eine Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat in einer realen Blutplasmaprobe eines Normaldosispatienten (die mit einem Plasmadesorptions-Massenspektrometer (PDMS) gemessenen Werte liegen im Bereich von  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  für Etoposid [74]) nicht mehr möglich wäre. Infolgedessen wurde eine weitere Variante

der Probenvorbereitung durch Abtrennung der Proteine mit Acetonitril durchgeführt. Diese wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

### **7.5.8 Probenvorbereitungsmethode 2**

Das frisch abgenommene Blut wurde etwa eine Stunde stehen gelassen. Nachdem sich Blutteilchen niedergeschlagen haben, wurden 80  $\mu\text{l}$  Plasma davon abgenommen, je 10  $\mu\text{l}$  von jeder Analytlösung (20-mal mit Acetonitril verdünnte Stammlösung ( $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) siehe Kapitel 7.4) sowie 150  $\mu\text{l}$  Acetonitril dazu gegeben und 10 min zentrifugiert. Danach wurde das Zentrifugat in ein anderes Eppendorffgefäß überführt und unter Stickstoffstrom ausgetrocknet. Zu dem trockenen Rest wurden 990  $\mu\text{l}$  Wasser und 10  $\mu\text{l}$  der Lösung des internen Standards (20-mal mit Acetonitril verdünnte Stammlösung ( $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) siehe Kapitel 7.4) gegeben. Die so hergestellte Probenlösung wurde für die weiteren Messungen verwendet. Die Konzentrationen von Etoposidphosphat, Etoposid und Teniposid betragen in dieser Lösung je  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Die Pufferzusammensetzung, Trenn- und Detektionsbedingungen waren den Messbedingungen mit der Standardmischung identisch (siehe Abbildung 57).

In Abbildung 61 ist eine Trennung von drei Zytostatika in einer mit Hilfe der Probenvorbereitungsmethode 2 hergestellten Blutplasmaprobe, sowie ein Elektropherogramm von einer zytostatikafreien Blutplasmaprobe dargestellt.

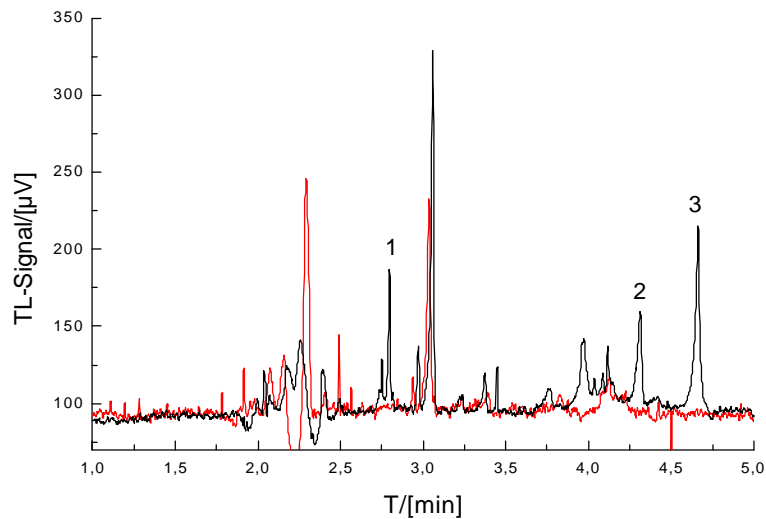


Abbildung 61: MEKC-Trennung von drei Zytostatika mit Thermischer-Linse-Detektion in einer Blutplasmaprobe (Probenvorbereitungsmethode 2). Messbedingungen: Trennpuffer  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  SDS; pH 8,9; Trennungsspannung 30 kV; Kapillarlänge 71,5 (39) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 0,7 s; Detektion: Thermische-Linse 257 nm, Laserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 30 Hz; Analyte: **1** Etoposidphosphat  $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , **2** Etoposid  $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , **3** Teniposid  $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Wie schon im Fall der Probenvorbereitungsmethode 1 zu beobachten war, haben sich aufgrund des Einflusses der komplexen Probenmatrix die Retentionszeiten der einzelnen Zytostatika gegenüber denen der Standardmischung verschoben. Aufgrund dessen wurde die Zuordnung durch einen Vergleich der korrigierten Retentionszeiten in Standardlösungen und Realprobe vorgenommen. Die aus dem Vergleich erhaltene Elutionsreihenfolge wurde zusätzlich durch das Zusetzen von Einzelstandards abgesichert. Außerdem wurden für die in Abbildung 61 dargestellte Trennung die Wiederholpräzisionen der Migrationszeiten, Peakflächen, sowie Peakhöhen für fünf aufeinander folgende Messungen ausgerechnet, die Ergebnisse sind in Tabelle 21 präsentiert.

*Tabelle 21: Wiederholpräzision der Migrationzeiten, Peakhöhen sowie Peakflächen bei der MEKC-Trennung von 3 Zytostatika in einer Blutplasmaprobe in Kombination mit der Thermischen-Linse-Detektion. Messbedingungen wie in der Abbildung 61.*

<b>Verbindung</b>	<b>F</b>	<b>RSD<sub>1</sub></b>	<b>RSD<sub>2</sub></b>	<b>t<sub>m</sub></b>	<b>RSD<sub>1</sub></b>	<b>RSD<sub>2</sub></b>	<b>H</b>	<b>RSD<sub>1</sub></b>	<b>RSD<sub>2</sub></b>
<b>Etoposidphosphat</b>	1,82	7,6	4,5	2,80	0,7	0,31	88,39	15	11
<b>Etoposid</b>	1,93	7,9	7,8	4,33	0,8	0,69	57,75	4,8	2,0
<b>Teniposid</b>	3,78	6,4	-	4,67	1,2	-	119,0	2	-

F = mittlere Peakfläche

t<sub>m</sub> = mittlere Migrationszeit

H = mittlere Peakhöhe

RSD<sub>1</sub> = relative Standardabweichungen der Peakflächen, Peakhöhen sowie der Migrationszeiten, [%]

RSD<sub>2</sub> = relative Standardabweichungen der durch die Peakfläche des internen Standards geteilten Peakflächen, durch die Peakhöhe des internen Standards geteilten Peakhöhen sowie durch die Migrationszeit des internen Standards geteilten Migrationszeiten [%].

Aus Tabelle 21 geht hervor, daß nur bei den auf den internen Standard bezogenen Migrationszeiten eine geringfügige Verbesserung der Wiederholpräzision für die beiden Analyte zu beobachten ist. Die auf den internen Standard korrigierten Peakhöhen sowie Peakflächen weisen im Vergleich zu den absoluten Peakhöhen und Peakflächen keine signifikant bessere Wiederholpräzision auf.

In Tabelle 22 sind Wiederfindungsraten von Etoposidphosphat und Etoposid für die unter Verwendung der Methode 2 vorbereitete Plasmaprobe dargestellt.

*Tabelle 22: Wiederfindungsraten von Etoposid und Etoposidphosphat in einer Blutplasmaprobe (Probenvorbereitung 2)*

<b>Verbindung</b>	<b>gegebene Konzentration [µg/mL]</b>	<b>gefundene Konzentration [µg/mL]</b>	<b>Wiederfindungs- rate [%]</b>
<b>Etoposidphosphat</b>	2,5	1,5	61
<b>Etoposid</b>	2,5	1,9	76

Die Tabelle zeigt, daß durch die relativ aufwendige Probenvorbereitung und insbesondere durch das Überführen des Zentrifugats in ein anderes Eppendorffgefäß

ein Teil des Probenvolumens verloren geht, welches demzufolge zu einem Minderbefund führt. Abhilfe würde hier ein weiterer interner Standard leisten, der vor der Proteinabtrennung zugesetzt wird. Dadurch könnte der Verlust an Probenvolumen bei der Berechnung der Wiederfindungsraten korrigiert werden. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß einerseits unter Verwendung der Probevorbereitungsmethode 1 bessere Wiederfindungsraten für die beiden Analyte zu erhalten sind, andererseits ist es aufgrund fehlender Verdünnungsschritte oder sogar eventueller Aufkonzentrierung der Plasmaprobe bei der Probevorbereitungsmethode 2 möglich, die Plasmaspiegel der Zytostatika noch mehrere Tage nach der Injektion der Zytostatika bei Normaldosispatienten zu bestimmen.

## **7.6 Bestimmung von Etoposidphosphat mit Hilfe der fluorimetrischen Detektion**

In der Arbeit von *Soetebeer* et al. [82] wurde eine simultane Bestimmung von Etoposid und Etoposidphosphat mit Hilfe der laserinduzierten Fluoreszenz-Detektion beschrieben. Hierbei wurde Etoposid in einen geladenen Boratkomplex umgewandelt. Beiden Analyte wurden mittels CE getrennt. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines frequenzverdoppelten Argon-Ionen Laser (257 nm), der zur Fluoreszenzanregung diente. Das Laserstrahl wurde mit Hilfe einer Zylinder-Quarzlinse auf 1,5 mm entlang des Detektionsfensters in die Kapillare fokussiert. Die Breite des Laserstrahls entsprach dem Innendurchmesser der Kapillare (50 µm). Die angeregte Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Spektrographen mit integrierter CCD-Kamera detektiert.

In Rahmen der hier vorliegenden Arbeit war es von Interesse, die Möglichkeit der Anwendbarkeit des entwickelten Trennverfahrens zur Bestimmung von Zytostatika in Verbindung mit laserinduzierter Fluoreszenz-Detektion zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden Fluoreszenzspektren von Etoposidphosphat in verschiedenen Medien und bei verschiedenen pH-Werten (für die pH-Reihe wurden Standardpufferlösungen der Firma *Merck* genommen) aufgenommen (Abbildung 62).

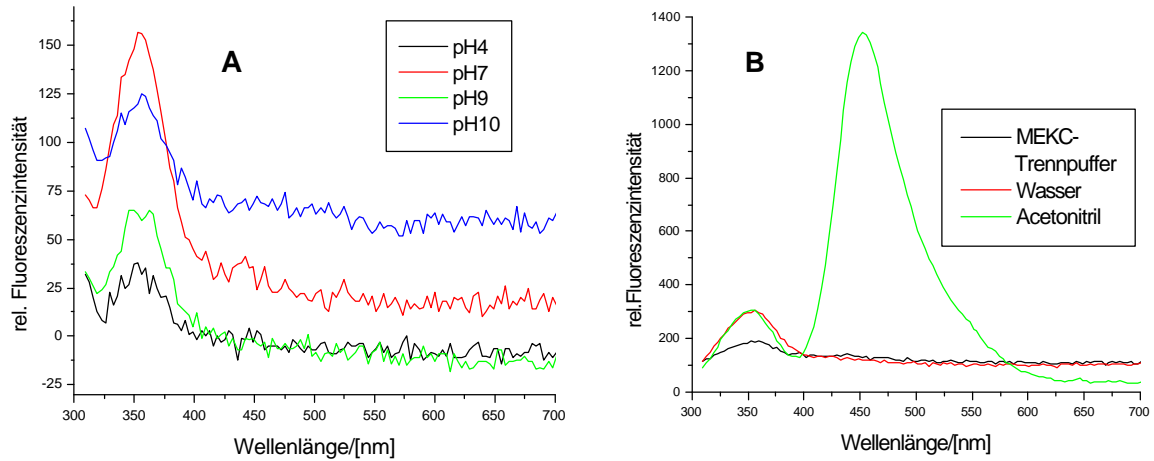


Abbildung 62: Fluoreszenzspektren für Etoposidphosphat; Messbedingungen: **A** bei verschiedenen pH-Werten; **B** in verschiedenen Medien. MEKC-Trennpuffer  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Borsäure,  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumdodecylsulfat, pH 8,9; Anregung mit 266 nm Festkörperlaser (Ausgangsleistung: 0,5 mW), Quarzglasküvette 1 cm.

In Abbildung 62 ist ersichtlich, daß Etoposidphosphat nur in Acetonitril ein intensives Fluoreszenzsignal aufweist, außerdem ist in der Gegenwart von SDS-Mizellen, sowie im stark alkalischen oder stark sauren pH-Bereich eine erhebliche Verminderung der Fluoreszenzsignalintensität zu beobachten. Aus diesem Grund können die mittels der entwickelten MEKC-Methode getrennten Zytostatika nicht nachweisstark UV-laserfluorimetrisch detektiert werden. Um auf die LIF-Detektion zurückgreifen zu können, mußte in einem Trennpuffer mit hohem Acetonitrilanteil gearbeitet werden. Folgende Abbildung 63 zeigt einen kapillarelektrophoretischen Lauf für Etoposidphosphat mit laserfluorimetrischer Detektion (Festkörperlaser 266 nm) in einem Trennelektrolyten mit hohem Volumenanteil Acetonitril.

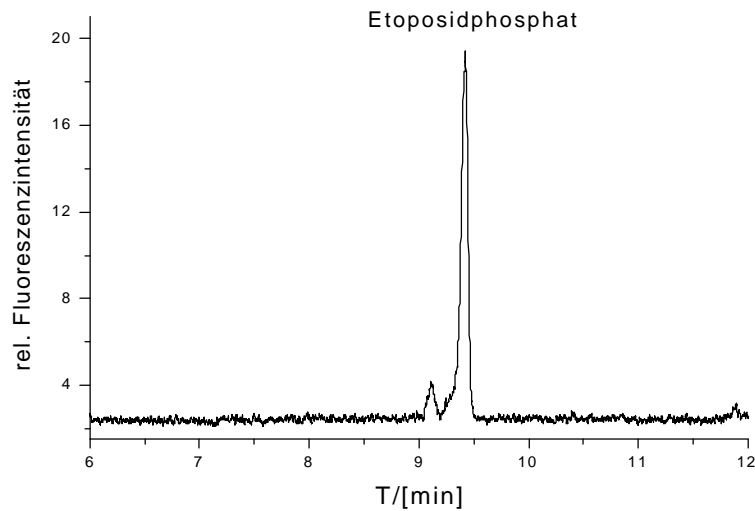


Abbildung 63: CE-Lauf von Etoposidphosphat mit Fluoreszenz-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer Phosphat-Puffer, 70% Acetonitril, pH 7; Kapillarlänge 71,5 (39) cm, Probenaufgabe Hydrodynamisch 3 s, 25 mBar; Detektion: Fluoreszenz; Anregung Festkörperlaser 266 nm (Ausgangeleistung 0,5 mW, Detektionseinheit Kapillarhalter mit LWL-Technologie der Firma J&M [20]); Analyte: Etoposidphosphat  $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Unter Verwendung eines Elektrolyten mit hohem Volumenanteil Acetonitril kann das ionisch vorliegende Etoposidphosphat laserfluorimetrisch nachweisstark detektiert werden (Nachweisgrenze beträgt  $300 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Allerdings hier ist eine Trennung von Etoposidphosphat und den beiden ungeladenen Zytostatika nicht möglich. Abhilfe könnte gegebenenfalls ein Trennpuffer mit einem nicht fluoreszenzlöschenden geladenen Komplexbildner schaffen.

## **8 Nachweisstarke thermo-optische Detektion bei der kapillarelektrophoretischen Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin in Blutplasma**

### **8.1 Einleitung und Aufgabenstellung**

Neben sozialen Faktoren wurde der Mangel von Serotonin (5-Hydroxytryptamin) an spezifischen Rezeptoren im zentralen Nervensystem als eine der Hauptursachen für die Entstehung von Depressionen ermittelt [75]. In den letzten Jahren wurden daher eine Reihe von psychomotorisch aktivierenden Arzneimitteln auf den Markt gebracht, die die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt ins Axoplasma hemmen. Zwei wichtige Vertreter dieser *Selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI)* sind **Fluoxetin** und **Fluvoxamin**. In ihrer klinischen Wirkung sind die SSRI mit den herkömmlichen Trizyklischen Antidepressiva (TCA) vergleichbar. Sie haben jedoch im Unterschied zu den TCA keine Affinität zu  $\alpha$ -Rezeptoren und Muscarin-Rezeptoren, so daß die typischen Nebenwirkungen der Tryzyklischen Antidepressiva, wie zum Beispiel kardiovaskuläre Effekte, fehlen.

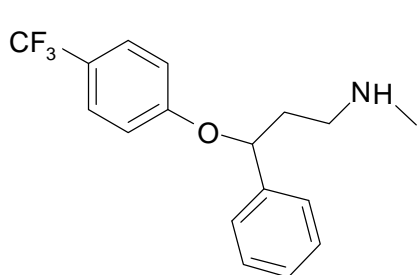
Aufgrund der schnellen Biotransformation zu teilweise aktiven Metaboliten sind nachweisstarke Analyseverfahren für die Bestimmung der niedrigen SSRI-Plasmaspiegel erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine schnelle kapillarelektrophoretische Trennmethode für Fluoxetin und Fluvoxamin in Blutplasma entwickelt. Da Fluoxetin und Fluvoxamin keine nativen Fluorophore sind, kommt die UV-LIF-Detektion hier nicht in Betracht. Daher wurde für die nachweisstarke thermo-optische Detektion die in Kapitel 5 charakterisierte Kapillarelektrophorese-Thermische-Linse-Detektionseinheit mit einem frequenzverdoppelten Argonionen-Laser (257 nm, 150 mW) als Pump-Lichtquelle verwendet.

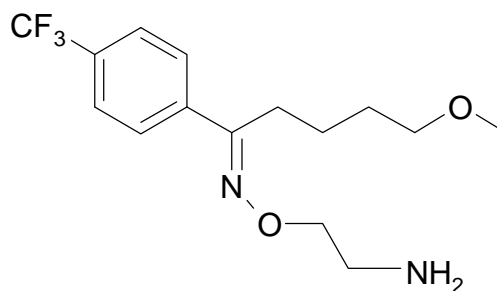


## 8.2 Struktureller Aufbau, Wirkungsweise und Absorptionsspektren der untersuchten SSRIs

**Fluoxetin**  $[\pm]$ -N-Methyl- $\gamma$ -[4-(trifluoromethyl)-phenoxy]benzolpropanamin (Abbildung 64) mit einem Molekulargewicht von  $345,8 \text{ g mol}^{-1}$  [87] ist im Handel als Hydrochlorid Salz erhältlich und gut wasserlöslich.



**Fluoxetin**



**Fluvoxamin**

Abbildung 64: Struktureller Aufbau von Fluoxetin und Fluvoxamin

### Wirkungsmechanismus

Fluoxetin gehört zu Klasse der Thymoleptika, die die Stimmung bei Depressionen mit unterschiedlicher Ursache heben. Der Mechanismus der antidepressiven Wirkung kann noch nicht vollständig erklärt werden. Alle Antidepressiva beeinflussen den Stoffwechsel der Überträgersubstanzen im Zentralnervensystem. So hemmen sie die Inaktivierung biogener Amine (Serotonin, Noradrenalin), indem sie mit der Wiederaufnahme der Überträgersubstanzen in die Nervenzelle interferieren, und wirken als Rezeptor-Antagonisten. Dies sind jedoch akute Effekte, die abhängig von der aktuellen Konzentration der Pharmaka sind. Die antidepressive Wirkung tritt dagegen erst nach längerer Behandlungsdauer ein. Sie hängt wahrscheinlich mit adaptiven Vorgängen als Folge der chronischen Erhöhung synaptischer Serotonin- und Noradrenalin-Konzentration zusammen [75].

Möglicherweise bestehen Zusammenhänge zwischen dem beeinflussten Transmittersystem und der akuten Wirkung: Diejenigen Substanzen, bei denen die Antriebssteigerung im Vordergrund steht, beeinträchtigen besonders die Wiederaufnahme von Noradrenalin. Bei den dämpfenden Thymoleptika steht die

Hemmung der Serotonin-Aufnahme im Vordergrund, Fluoxetin hingegen hemmt insbesondere die Serotonin-Rückaufnahme, wirkt aber nicht sedierend.

Die Dosierung von Fluoxetin beträgt 20 bis maximal 60 mg/d. Die Substanz wird mit einer Halbwertszeit von 50-70 Stunden am Stickstoff demethyliert, es entsteht Desmethylfluoxetin, das pharmakologisch unverändert wirksam ist und noch langsamer eliminiert wird ( $t_{1/2}$  etwa 7 Tage).

**Fluvoxamin** (E)-5-Methoxy-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1-pentanon-O-(2-aminoethyl)oxim hat ein Molekulargewicht von  $434,4 \text{ g mol}^{-1}$  [87], ist im Handel als Maleat erhältlich und wie Fluoxetin gut wasserlöslich. Der Wirkungsmechanismus und die klinische Aktivität von Fluvoxamin sind denen von Fluoxetin ähnlich.

### 8.3 Absorptionsspektren von Fluoxetin und Fluvoxamin

Um die Eignung des Thermische-Linse-Detektors mit einem Argon-Ionen Laser (257 nm) als Anregungslichtquelle für die Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin zu überprüfen, wurden die Absorptionsspektren von SSRIs in wässriger Lösung mit Hilfe eines Dioden-array-Detektors aufgenommen (Abbildung 65).

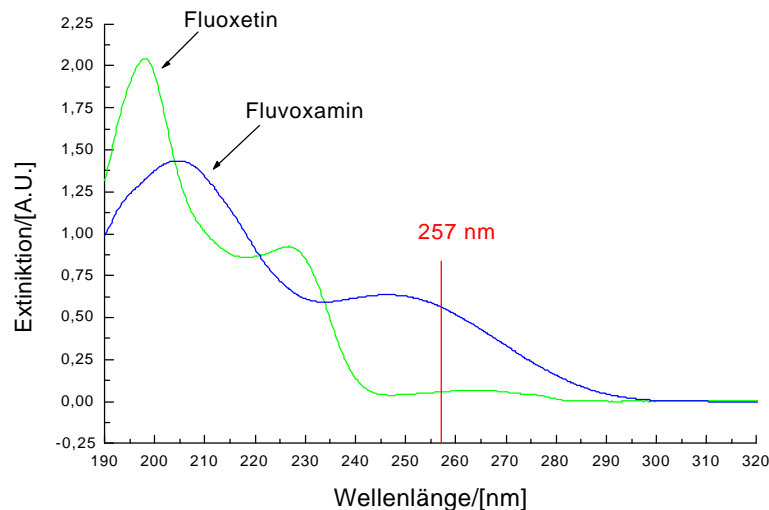


Abbildung 65: Absorptionsspektren von Fluoxetin und Fluvoxamin in Wasser; Messbedingungen: Fluoxetin  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; Quarzglaszuvette 1 cm.

Aus Abbildung 65 geht hervor, daß Fluvoxamin bei der Wellenlänge 257 nm einen um den Faktor zehn höheren Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu Fluoxetin aufweist. Infolgedessen wäre eine zehnmal höhere Signalintensität sowohl für die

photometrische als auch für die thermo-optische Detektion von Fluvoxamin zu erwarten.

Die Nachweisgrenzen bei dieser Wellenlänge sollten demnach für Fluoxetin deutlich höher sein.

#### **8.4 Analytische Trenn- und Bestimmungsmethoden für Fluoxetin und Fluvoxamin**

Für die Trennung und Bestimmung von Fluoxetin, Fluvoxamin und ihrer Metaboliten in Körperflüssigkeiten und in pharmazeutischen Präparaten sind chromatographische Trennverfahren von großer Bedeutung. In den letzten zwanzig Jahren wurden bereits einige Trenn- und Bestimmungsmethoden auf der Basis der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung verschiedener Detektoren entwickelt [88]. In der Arbeit von *LLerena et al.*[89] wurde zum Beispiel eine Trennung von Fluoxetin von seinem aktiven Metaboliten Norfluoxetin mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC entwickelt. Aufgrund der relativ hohen Extinktionskoeffizienten der Analyte im UV-Bereich des Spektrums ( $\lambda_{\max} \approx 206$  nm) wurde hierbei eine photometrische Detektionsmethode mit einer Deuteriumlampe als UV-Lichtquelle eingesetzt. *Tournel et al.* [90] haben eine HPLC-Methode unter Verwendung eines Dioden-array-Detektors zur Bestimmung von sieben SSRIs und ihren drei pharmakologisch aktiven Metaboliten in Blutplasma erarbeitet. Es konnte gezeigt werden, daß die entwickelte Bestimmungsmethode zum toxikologischen Screening und therapeutischen Drug Monitoring verwendet werden kann.

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung von Fluoxetin und seinen Metaboliten ist HPLC mit fluorimetrischer Detektion. Da die SSRIs keine native Fluorophore sind, ist hierbei ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt notwendig [91, 92]. In der Arbeit von *Atmaca* [91] wurde eine fluorimetrische Bestimmungsmethode für Fluoxetin nach einer Derivatisierung mit 7-Chlor-4-nitrobenzenofurazan (NBD-CL) entwickelt. Die Methode konnte für die Bestimmung von Fluoxetin in biologischen Proben eingesetzt werden.

Neben HPLC-Methoden existieren verschiedene gaschromatographische (GC) Verfahren mit Electron-capture-Detektion [93] oder massenselektiver Detektion [94]. Zum Beispiel haben *Lanz et al.* [93] mit Hilfe der Kapillargaschromatographie mit Electron-capture-Detektion Fluoxetin und Norfluoxetin im menschlichen Blutplasma bestimmt. Die Nachweisgrenzen betragen dabei  $5 \text{ ng/cm}^3$  für jeden der Analyten.

Die oben beschriebenen Trennverfahren weisen jedoch einige Nachteile auf, die auf eine komplexe Zusammensetzung der Probenmatrix zurückzuführen sind. Die HPLC ermöglicht zwar eine nachweisstarke Detektion schon unter Verwendung eines einfachen konventionellen photometrischen Detektors, bietet jedoch eine ungenügende Trennleistung bei der Bestimmung von Psychopharmaka in biologischen Proben. Die Derivatisierung bringt einer Erweiterung der Möglichkeiten der Fluoreszenzdetektion für Verbindungen, die keine eigene Fluoreszenz aufweisen, hat aber Nachteile, wie größeren Zeitaufwand, teure Derivatisierungsreagentien sowie das Auftreten von Reagenzpeaks, die sich mit den Peaks von Analyten überlagern können.

In den letzten Jahren wurden einige Trenn- und Bestimmungsmethoden für Antidepressiva basierend auf der Kapillarelektrophorese beschrieben [88, 95, 96]. So wurde in der Arbeit von *Nevado et al.* [95] eine kapillarelektrophoretische Trennmethode mit einem Dioden-array-Detektor zur simultanen Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin in pharmazeutischen Präparaten beschrieben. Die Nachweisgrenzen betragen dabei  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  für beide Antidepressiva. *Desiderio et al.* [96] haben eine Optimierung der kapillarelektrophoretischen Trennung von Fluoxetin und Norfluoxetin entwickelt. Unter Verwendung eines Cyclodextrin-modifizierten Trennpuffers ist es Ihnen gelungen, eine enantioselektive Analyse beider Psychopharmaka durchzuführen.

Einer der Hauptnachteile kapillarelektroseparativer Trennmethoden ist das geringe Detektionsvolumen, infolgedessen liefert die konventionelle photometrische Detektion in Kapillaren nicht ausreichend niedrige Nachweisgrenzen. Daher ist es von Bedeutung, die erwiesenermaßen leistungsfähigen kapillarelektromigrativen Trennmethoden mit nachweisstärkeren Detektionsverfahren zu kombinieren. Hier bietet das Verfahren der Thermischen-Linse-Detektion, welches sich durch hohe

Nachweisstärke und Robustheit schon bei der Bestimmung von Nitroaromaten (Kapitel 6) und Zytostatika (Kapitel 7) ausgezeichnet hat, eine möglicherweise leistungsstärkere Alternative zur konventionellen photometrischen UV-Detektion.

### **8.5 Kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin unter Verwendung photometrischer UV-Detektion**

Zu Beginn der Untersuchungen wurde basierend auf den Ergebnissen von *Nevado et al.* ein Elektrolyt mit Dinatriumtetraborat verwendet. Die verwendete Pufferlösung hatte folgende Zusammensetzung:

***40 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumtetraborat***

***pH 9,3***

Zur Herstellung der Pufferlösung wurde die entsprechende Substanz eingewogen, in einen Messkolben gebracht und in Milli-Q-Wasser unter Rühren gelöst. Die fertige Lösung wurde bis zur Kolbenmarke mit dem Milli-Q-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert des Elektrolyten mit einem Präzisions-pH-Meter gemessen. Der Wert betrug 9,3 pH-Einheiten.

Für die Herstellung der Stammlösungen wurde 1 mg Fluvoxamin in 2 mL Milli-Q-Wasser und 1 mg Fluoxetin in 4 mL Milli-Q-Wasser gelöst. Bei der Herstellung der CE-Standardmischungen wurden 40 µL der Fluoxetin-Stammlösung und 10 µL der Fluvoxamin-Stammlösung in ein Eppendorff-Gefäß gebracht und mit Wasser auf 2 mL aufgefüllt, so daß die Analytkonzentrationen in der Standardmischung 10 µg mL<sup>-1</sup> für Fluoxetin und 25 µg mL<sup>-1</sup> für Fluvoxamin betragen.

Die aus der Arbeit von *Nevado et al.* [95] entnommenen instrumentellen Trennparameter wurden auf eine Kapillarlänge von 71,5 (41,5)cm, 75µm I.D. angepaßt.

Die Trennungsspannung betrug 20 kV;

die Probenaufgabe erfolgte hydrodynamisch durch Anlegen (für 3 s) eines Vakuums am Puffergefäß auf der Detektionsseite.

In Abbildung 66 ist ein Elektropherogramm für die Trennung der zwei Antidepressiva mit photometrischer UV-Detektion bei den beschriebenen Trennbedingungen dargestellt.

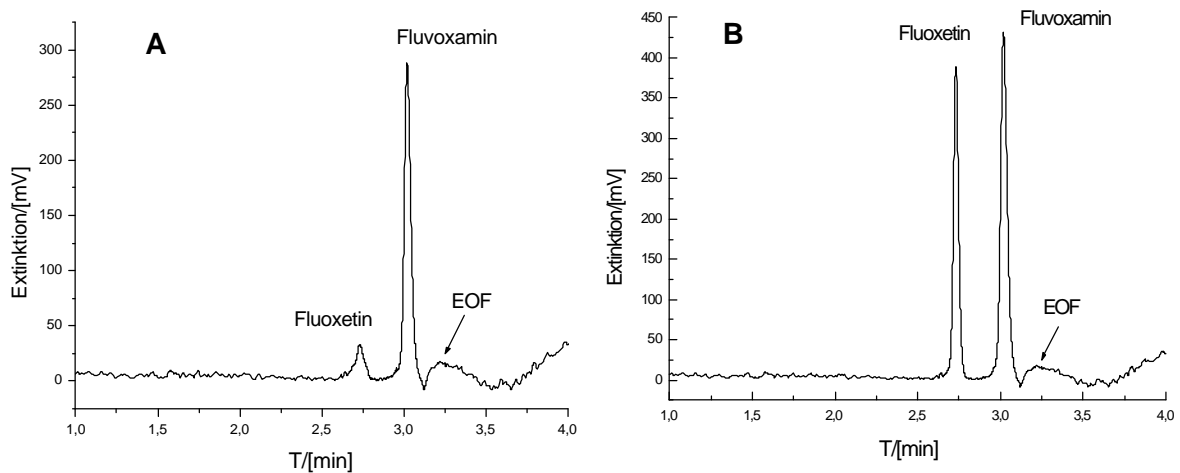


Abbildung 66: CE-Trennung von Fluoxetin und Fluvoxamin unter Verwendung photometrischer UV-Detektion bei **A** 257 nm und **B** 206 nm. Messbedingungen: Trennpuffer  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat; pH 9,3; Trennungsspannung 20 kV; Kapillarlänge 71,5 (41,5) cm, Probenaufgabe hydrodynamisch 3 s; photometrische Detektion 257 nm und 206 nm; Analyte: Fluoxetin  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Aus Abbildung 66 wird ersichtlich, daß in der Nähe des Absorptionsmaximums (206 nm) sowohl Fluoxetin als auch Fluvoxamin ein hohes Absorptionssignal zeigen, dagegen, wie es aus den Absorptionsspektren zu erwarten war, weist Fluoxetin in der Konzentration von  $10 \mu\text{g/mL}$  bei der Wellenlänge von 257 nm kein Absorptionssignal auf. Infolgedessen ist unter Verwendung der Thermischer-Linse-Detektion mit einem frequenzverdoppelten Argon-Ionen Laser (257 nm) als Anregungsquelle eine wesentlich höhere Signalintensität für Fluvoxamins im Vergleich zu der des Fluoxetins zu erwarten.

## 8.6 Kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin unter Verwendung des NFTL-Detektors

### 8.6.1 Abhängigkeit der TL-Signalintensität von der Wanderungsgeschwindigkeit der untersuchten Antidepressiva

In Kapitel 7.5 wurde im Hinblick auf die Optimierung der Detektionsbedingungen bei der Bestimmung von drei Zytostatika der Einfluß verschiedener Parameter wie z. B. die Abhängigkeit der Signalhöhe von der Chopperfrequenz, der Wanderungsgeschwindigkeit der Analyte und der Leistung des Pump-Lasers auf die

Thermische-Linse-Detektion untersucht. Für die Untersuchungen an Psychopharmaka wurden diese optimierten Detektionsparameter aus Kapitel 7.5 übernommen. Zu Kontrolle wurde eine Abhängigkeit der TL-Signalintensität von der Wanderungsgeschwindigkeit der Analyte aufgenommen (Abbildung 67), zu diesem Zweck wurden Messungen mit einer vollständig gefüllten Kapillare durchgeführt.

Bei diesen Untersuchungen wurde die Kapillare mit einer Lösung von Fluoxetin ( $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) oder Fluvoxamin ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) im Trennpuffer (siehe Abbildung 66) vollständig gefüllt und die zwischen den Puffergefäßen angelegte Hochspannung wurde von 5 kV bis 25 kV variiert. die Wanderungsgeschwindigkeit der Analytzone wurde nach Gleichung 27 aus der Kapillarlänge vom Einlaß bis zum Detektionsfenster und der Migrationszeit des jeweiligen Analyten berechnet.

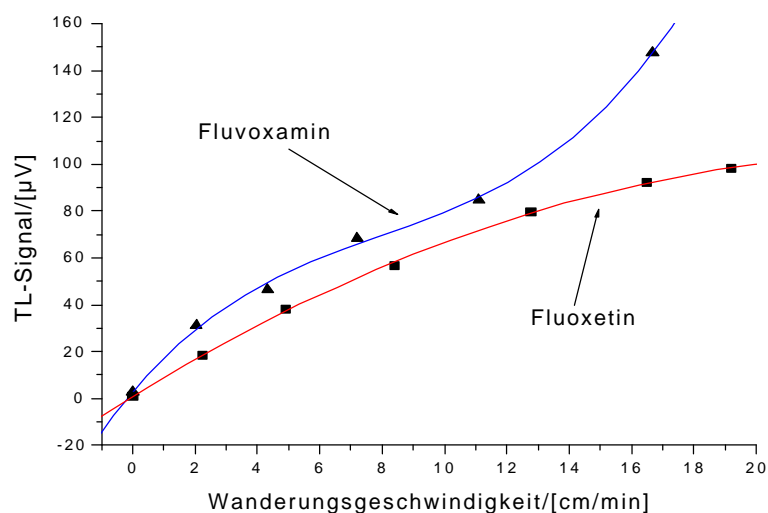


Abbildung 67: TL-Signal in Abhängigkeit von der Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten. Analyte: Fluoxetin ( $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer), Fluvoxamin ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  im Puffer), Messbedingungen: Trennpuffer  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat; pH 9,3; Kapillarlänge 71,5 (41,5) cm, I.D.  $75 \mu\text{m}$ , Kapillare vollständig mit der Lösung des Analyten in Puffer gefüllt; Laserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 30 Hz.

Abbildung 67 zeigt die Zunahme der Signalintensität für Fluoxetin mit seiner zunehmenden Wanderungsgeschwindigkeit in der Kapillare. Diese wird jedoch geringer, so daß bei einer Geschwindigkeit größer 17 cm/min das TL-Signal von Fluoxetin praktisch einen konstanten Wert annimmt. Bei Fluvoxamin dagegen ist eine weitere Zunahme der TL-Signalintensität im Bereich der

Flußgeschwindigkeiten von 11 bis 17 cm/min zu beobachten. Außerdem fällt auf, daß im statischen Zustand sowohl Fluoxetin als auch Fluvoxamin ein sehr niedriges Thermische-Linse-Signal aufweisen. Dies hat vermutlich mit der chemischer Umsetzung der beiden Stoffe unter Einwirkung der eingestrahnten Laserenergie zu tun. Dieser Effekt ist möglicherweise bei höherer Wanderungsgeschwindigkeit des Fluvoxamins unterdrückt, was den weiteren Anstieg der Signalintensität erklären könnte.

Unter Berücksichtigung der untersuchten Abhängigkeit des TL-Signals von der Wanderungsgeschwindigkeit der Analyte würde sich eine optimale Trennungsspannung von 25 kV (entspricht der Wanderungsgeschwindigkeit von 16,5 cm /min für Fluvoxamin und 19,2 cm/min für Fluoxetin) ergeben. Jedoch aufgrund einer relativ hohen Trennpufferkonzentration (40 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumtetraborat) und demzufolge einer zu hohen Stromstärke war es nicht möglich, eine reproduzierbare Trennung für Fluoxetin und Fluvoxamin unter dieser Spannung durchzuführen. Infolge dessen wurde für die weiteren Messungen mit dem Dinatriumtetraborat-Puffer eine Trennungsspannung von 20 kV ausgewählt.

### **8.6.2 Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit Hilfe des NFTL-Detektors**

Eine kapillarelektrophoretische Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit Hilfe des in dem Kapitel 5 beschriebenen Thermische-Linse-Detektors wurde unter den in Abbildung 66 vorgestellten Trennbedingungen durchgeführt.

Die Detektionsbedingungen wurden aus Kapitel 7.5.3 entnommen. Die Anregungslaserleistung betrug 105 mW, die Modulationsfrequenz 30 Hz.

Abbildung 68 zeigt eine elektrophoretische Trennung und Bestimmung der zwei Antidepressiva mit der Thermischen-Linse-Detektionseinheit.



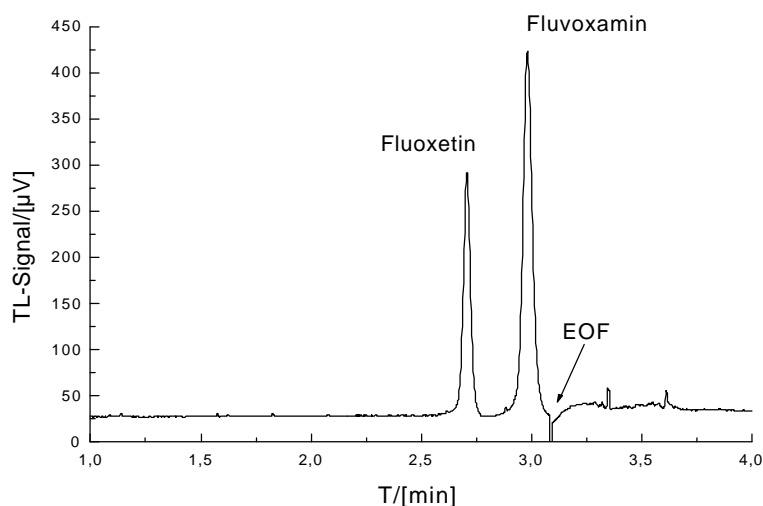


Abbildung 68: CE-Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit Thermischer-Linse-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumtetraborat; pH 9,3; Trennungsspannung 20 kV; Kapillarlänge 71,5 (41,5) cm, Probenaufgabe Hydrodynamisch 3 s; Detektionsbedingungen: Thermische-Linse (257 nm), Laserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 30 Hz; Analyte: Fluoxetin  $1,25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Anhand Abbildung 68 wird sofort ersichtlich, daß das Verhältnis der Signalhöhen für Fluoxetin und Fluvoxamin bei der Thermischen-Linse-Detektion nicht mit dem Extinktions-Verhältnis in den Absorptionsspektren (Abbildung 65) sowie mit dem Verhältnis der Signalhöhen bei der photometrischen UV-Detektion (Abbildung 66 A) übereinstimmt. Diese Abweichung kann aus unserer Sicht zwei Ursachen haben. Die erste Ursache ist die chemische Umsetzung des Fluvoxamins unter der Einwirkung der eingestrahlten Laserenergie, was zur Erniedrigung der Signalintensität für diesen Analyten führen kann. Die zweite mögliche Ursache für eine Änderung des Signalhöhenverhältnisses ist eine außergewöhnliche zusätzliche Verstärkung des Thermische-Linse-Signals für Fluoxetin. In Kapitel 8.10 dieser Arbeit wird eine Hypothese zur Erklärung des hier beschriebenen Phänomens aufgestellt werden.

In nachfolgender Tabelle 23 sind die Nachweisgrenzen bei der Bestimmung der Psychopharmaka mit der TL- und mit photometrischer UV-Detektion gegenübergestellt. Zum Vergleich wurden noch die entsprechenden Nachweisgrenzen bei photometrischer UV-Detektion im Absorptionsmaximum (206 nm) hinzugefügt.

*Tabelle 23: Vergleich der Nachweisgrenzen für die untersuchten Antidepressiva bei der TL- und UV-Detektion bei 257nm und 206 nm . Messbedingungen: Trennpuffer 40 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumtetraborat; pH 9,3; Trennspannung 20 kV; Kapillarlänge 71,5 (41,5) cm, Probenaufgabe Hydrodynamisch 3 s.*

<i>Verbindung</i>	<i>UV-Detektor 206 nm [ng/ml]</i>	<i>UV-Detektor 257 nm [ng/ml]</i>	<i>TL-Detektor 257 nm Laser [ng/ml]</i>
<b>Fluoxetin</b>	160	3200	20
<b>Fluvoxamin</b>	350	650	40

Aus der Tabelle wird deutlich, daß unter Verwendung der Thermischen-Linse-Detektion eine Verbesserung der Nachweisgrenzen um den Faktor 20 für Fluvoxamin und 160 für Fluoxetin gegenüber photometrischer UV-Detektion bei gleicher Wellenlänge erreichbar ist. Außerdem sind für beide Analyte die mit der Thermischen-Linse-Detektion erzielbaren Nachweisgrenzen um ca. einen Faktor 8 niedriger, als die, die mit der photometrischen Detektion im Absorptionsmaximum erhalten wurden.

### **8.6.3 Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen für die untersuchten Psychopharmaka**

Zur weiteren Überprüfung der Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode wurde für die zwei untersuchten Antidepressiva eine Kalibration durchgeführt. Ausgehend von zwei Stammlösungen mit der Konzentration 0,25 mg mL<sup>-1</sup> für Fluoxetin und 0,5 mg mL<sup>-1</sup> für Fluvoxamin wurden durch Verdünnung mit Milli-Q Wasser je fünf Lösungen von jedem Psychopharmakum (Analytkonzentration von 0,125 µg mL<sup>-1</sup> bis 5 µg mL<sup>-1</sup>) hergestellt. Die Vermessung der zehn hergestellten Lösungen wurde unter den in Abbildung 68 dargestellten Bedingungen durchgeführt. In Abbildung 69 sind die Kalibriergeraden für Fluoxetin und Fluvoxamin präsentiert.

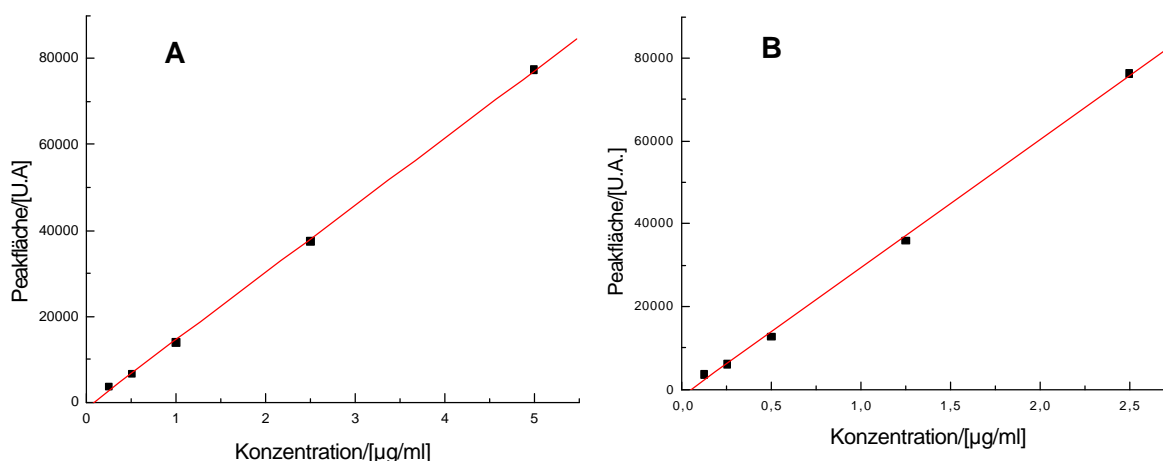


Abbildung 69: Kalibriergeraden für Fluvoxamin (A) und Fluoxetin (B). Messbedingungen wie in Abbildung 68.

Zur Überprüfung der Linearität der Kalibrierfunktionen wurde der Anpassungstest von Mandel (F-Test) (siehe Kapitel 4.3.7) verwendet. In der nachfolgenden Tabelle 24 ist ein Vergleich von berechneten F-Werten (siehe die Gleichung 27),  $F_{ber}$  und von tabellierten F-Werten,  $F_{tab}$ , für die Kalibrierfunktionen von Fluoxetin und Fluvoxamin dargestellt.

Tabelle 24: F-Test für die Kalibrierfunktionen für Fluoxetin und Fluvoxamin  
(Signifikanzniveau 95%)

Verbindung	$N$	$R^2$	$F_{ber}$	$F_{tab} (95\%, 1, 2)$
Fluoxetin	5	0,99941	6,79	18,51
Fluvoxamin	5	0,99982	3,10	18,51

Die Tabelle zeigt, daß in beiden Fällen durch eine Kalibrierfunktion zweiten Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht werden kann und somit die Linearität der Kalibrierfunktionen angenommen werden darf.

## 8.7 Optimierung der Trennbedingungen bei der Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin

Unter den in Abbildung 68 dargestellten Trennbedingungen liegen zwar Fluoxetin und Fluvoxamin in partiell positiv geladener Form vor, was eine vollständige Trennung der beiden Substanzen ermöglicht. Aus Abbildung 68 wird aber auch

deutlich, daß der Fluvoxamin-Peak in unmittelbarer Nähe zum EOF-Peak liegt. Dies spricht für eine relativ niedrige Partialladung dieser Substanz unter den vorgestellten Trennbedingungen. In Hinsicht auf eine Realprobenanalyse ist es jedoch von Bedeutung, eine bessere Trennung des Analytpeaks von Systempeak zu erreichen. Dies kann in diesem Fall durch die Verwendung eines Trennelektrolyten mit einem niedrigeren pH-Wert realisiert werden. Zu diesem Zweck wurden fünf Trennpufferlösungen mit einem pH-Wert von 9,3 bis 5 getestet. Eine vollständige Trennung der beiden Antidepressiva wurde unter Verwendung eines Elektrolytensystems mit einem pH-Wert von 7 erreicht. Die verwendete Pufferlösung hatte folgende Zusammensetzung:

***20 mmol L<sup>-1</sup> Natriumdihydrophosphat***

***20 mmol L<sup>-1</sup> Dinatriumhydrophosphat***  
***pH 7,0***

Zur Herstellung der Pufferlösung wurden die entsprechenden Substanzen eingewogen, in einen Meßkolben gebracht und in Milli-Q-Wasser unter Rühren gelöst. Die fertige Lösung wurde bis zur Kolbenmarke mit dem Milli-Q-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert des Elektrolyten mit einem Präzisions-pH-Meter gemessen. Der Wert betrug 7,0 pH-Einheiten.

Unter Verwendung der neu hergestellten Pufferlösung wurden elektrophoretische Trennungen von Fluoxetin und Fluvoxamin mit anschließender photometrischer UV-Detektion sowie mit der Thermischen-Linse-Detektion durchgeführt. Abbildung 70 zeigt eine elektrophoretische Trennung der untersuchten Psychopharmaka unter Verwendung der Thermischen-Linse-Detektion. Zum Vergleich wurde noch das entsprechende Elektropherogramm mit photometrischer UV-Detektion im Absorptionsmaximum (206 nm) hinzugefügt.

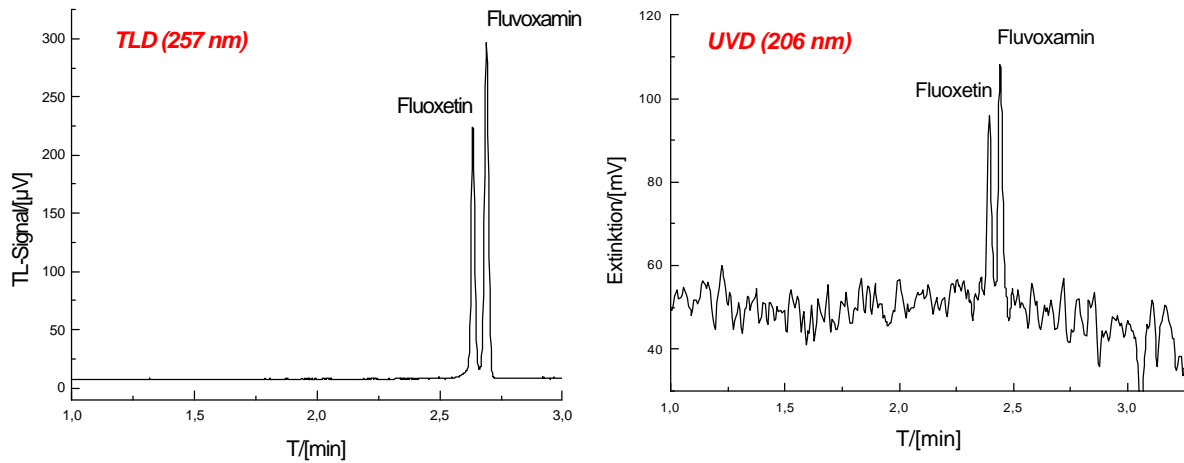


Abbildung 70: CE-Trennung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit TL-Detektion (TLD) und UV-Detektion (UVD). Messbedingungen: Trennpuffer  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumhydrogenphosphat, pH 7,0; Trennungsspannung 25 kV; Probenaufgabe: konstante Druckdifferenz 3 s; Kapillarlänge 71,5(41,5) cm, I.D.  $75 \mu\text{m}$ ; Detektion TLD: 257 nm, Laserleistung 105 mW, Chopperfrequenz 30 Hz; UVD: UV-Lampe 206 nm; Analyte (TLD und UVD identisch): Fluoxetin  $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Außerdem wurden weitere Messungen mit zehnmal so hoher Analytkonzentration mit Hilfe photometrischer UV-Detektion im Absorptionsmaximum und bei der Wellenlänge von 257 nm unter neuen Trennbedingungen durchgeführt (Abbildung 71).

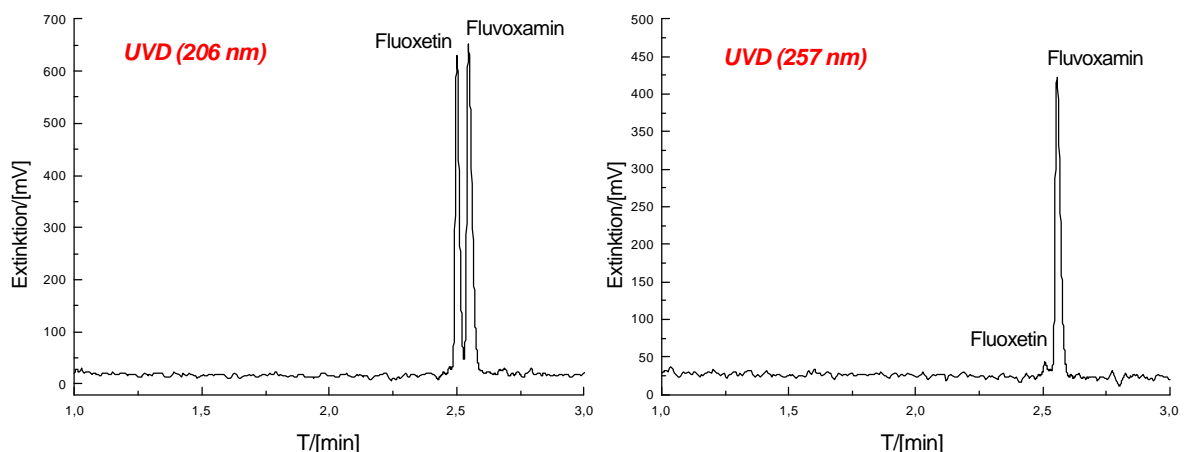


Abbildung 71: CE-Trennung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit photometrischer UV-Detektion bei  $\lambda = 206 \text{ nm}$  und  $\lambda = 257 \text{ nm}$ ; Messbedingungen: wie in Abbildung 70; Analyte: Fluoxetin  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Aus den Abbildungen 70 und 71 wird deutlich, daß auch hier wie im Fall der alten Pufferzusammensetzung (Abbildung 68) keine Übereinstimmung des Verhältnisses der Signalhöhen für Fluoxetin und Fluvoxamin bei der Thermischen-Linse-Detektion mit dem Extinktions-Verhältnis in den Absorptionsspektren (Abbildung 65) sowie mit dem Verhältnis der Signalhöhen bei der photometrischen UV-Detektion (Abbildung 71 *UVD 257 nm*) zu beobachten ist. Dieser Effekt benötigt aus unserer Sicht eine detailliertere Betrachtung. Aufgrund dessen wird in Kapitel 8.10 dieser Arbeit eine Hypothese zur seinen Erklärung aufgestellt werden.

Für die in Abbildung 70 vorgestellte Trennung mit der Thermischen-Linse-Detektion wurden die Wiederholpräzisionen für fünf aufeinanderfolgende Messungen für die Migrationszeiten, für die Peakflächen, für die Peakhöhen, sowie für die Trennstufenzahlen ausgerechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 aufgelistet.

*Tabelle 25: Wiederholpräzisionen für die Migrationzeiten, Peakhöhen und Peakflächen, sowie die Trennstufenzahlen bei der CE-Trennung von zwei Antidepressiva mit der Thermischen-Linse-Detektion. Messbedingungen wie in Abbildung 70.*

<i>Verbindung</i>	<i>F</i>	<i>RSD, [%]</i>	<i>t<sub>m</sub></i>	<i>RSD, [%]</i>	<i>H</i>	<i>RSD, [%]</i>	<i>N</i>
<b>Fluoxetin</b>	3,7	3,8	2,60	0,35	211	1,3	116000
<b>Fluvoxamin</b>	5,1	5,0	2,69	0,20	272	5,5	120000

F = mittlere Peakfläche

t<sub>m</sub> = mittlere Migrationszeit

H = mittlere Peakhöhe

RSD = relative Standardabweichung

N= mittlere Trennstufenzahl.

Aus Tabelle 25 geht hervor, daß eine gute Reproduzierbarkeit der Peakflächen, Peakhöhen sowie der Migrationszeiten unter optimierten Trenn- und Detektionsbedingungen erreicht wurde. Auch die hohe Zahl der Trennstufen für beide Psychopharmaka deutet auf die Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode hin.

In der nachfolgenden Tabelle 26 sind Nachweisgrenzen für die Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin unter Verwendung der TL- und der photometrischen Detektion bei der Wellenlänge von 257 nm gegenübergestellt. Die entsprechenden Nachweisgrenzen bei der photometrischen UV-Detektion im Absorptionsmaximum (214 nm) wurden zum Vergleich hinzugefügt.

*Tabelle 26: Vergleich der Nachweisgrenzen der untersuchten Antidepressiva bei der TL- und bei UV-Detektion. Messbedingungen sind aus Abbildung 70 zu entnehmen.*

<b>Verbindung</b>	<b>UV-Detektor 206 nm</b> <i>[ng/ml]</i>	<b>UV-Detektor 257 nm</b> <i>[ng/ml]</i>	<b>TL-Detektor 257 nm</b> <i>Laser [ng/ml]</i>
<b>Fluoxetin</b>	330	6700	10
<b>Fluvoxamin</b>	460	560	20

Die Tabelle zeigt, daß bei der Thermischen-Linse-Detektion unter neuen Trennbedingungen eine Verbesserung der Nachweisgrenzen um einen Faktor 28 für Fluvoxamin und 670 für Fluoxetin gegenüber der photometrischen UV-Detektion bei gleicher Wellenlänge erreichbar ist. Zudem sind die mit der NFTL-Detektion erzielbaren Nachweisgrenzen um einen Faktor 33 für Fluoxetin und um einen Faktor von 23 für Fluvoxamin niedriger, als die, welche mit der photometrischen UV-Detektion im Absorptionsmaximum erhalten wurden. Außerdem konnten unter Verwendung eines neuen Elektrolyten auf der Basis von Natriumdihydrophosphat und Dinatriumhydrophosphat mit der TL-Detektion zweimal niedrigere Nachweisgrenzen als unter Verwendung des Dinatriumtetraborat-Trennpuffers erzielt werden (siehe Tabelle 22).

Um die Richtigkeit der ausgerechneten Nachweisgrenzen zu überprüfen, wurde eine Bestimmung der Psychopharmaka in der Konzentration von 10 ng mL<sup>-1</sup> für Fluoxetin und 20 ng mL<sup>-1</sup> für Fluvoxamin mit Hilfe des TL-Detektors durchgeführt (Abbildung 72).

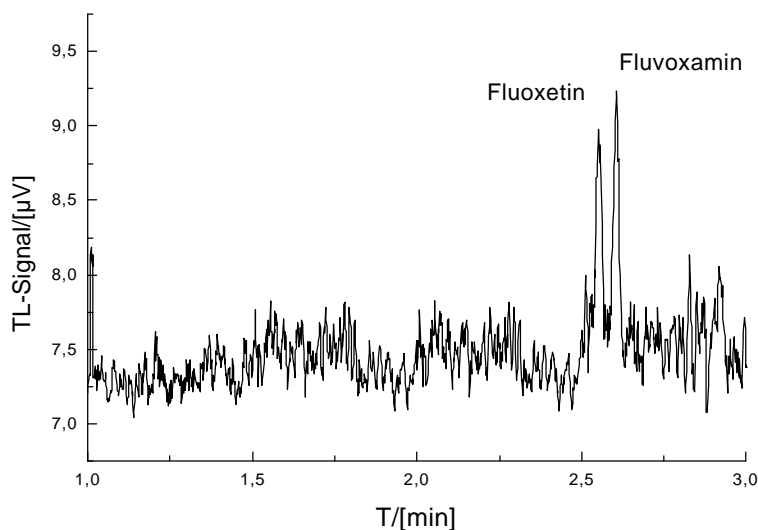


Abbildung 72: Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit Thermischer-Linse-Detektion. Messbedingungen wie in der Abbildung 70; Analyte: Fluoxetin  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $20 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Aus Abbildung 72 geht hervor, daß in den vorgestellten Konzentrationen die beiden Peaks noch nachweisbar sind, was die Richtigkeit der ausgerechneten Nachweisgrenzen bestätigt.

### 8.8 Trennung und Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit organisch/wäßrigen Trennpuffern

In Kapitel 3.6.3.3 der vorliegenden Arbeit wurde über die Rolle des Mediums bei der Thermischen-Linse-Detektion diskutiert. Es wurde postuliert, daß unter Verwendung von organisch-wäßrigen Lösungsmitteln ein Gewinn in der Nachweisstärke im Vergleich zu rein wäßrigen Lösungen sowie in der Signalstabilität im Vergleich zur rein organischen Medien erzeugt werden kann. Um dies zu bestätigen, wurden Messungen zur Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit Hilfe der Nahfeld-Thermischen-Linse-Detektion mit einem Acetonitril enthaltenden Pufferelektrolyten durchgeführt. An dieser Stelle ist zu vermerken, daß die Problematik von zwei Seiten betrachtet werden soll und zwar von der Seite der Detektionsbedingungen und von der Seite der Trennbedingungen, da die optimalen Detektionsbedingungen nicht zwangsläufig den optimalen Trennbedingungen entsprechen.



Zur Durchführung der Messungen wurden sieben Pufferlösungen auf Basis von Natriumdihydrophosphat und Dinatriumhydrophosphat hergestellt. Zu den hergestellten Pufferlösungen wurde Acetonitril gegeben, so daß sein Volumenanteil in der ersten Lösung 10%, in der zweiten 20%, in der dritten 30% und so weiter bis 70% betrug. Mit den sieben so hergestellten Pufferelektrolyten wurden Messungen zur Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit Hilfe der Thermischen-Linse-Detektion durchgeführt. Die instrumentellen Trenn- und Detektionsparameter waren den in Abbildung 70 vorgestellten identisch.

Nachfolgende Abbildung 73 zeigt Trennungen der Psychopharmaka unter Verwendung von Trennelektrolyten, welche in verschiedenen Volumenanteilen Acetonitril (MeCN) enthielten.

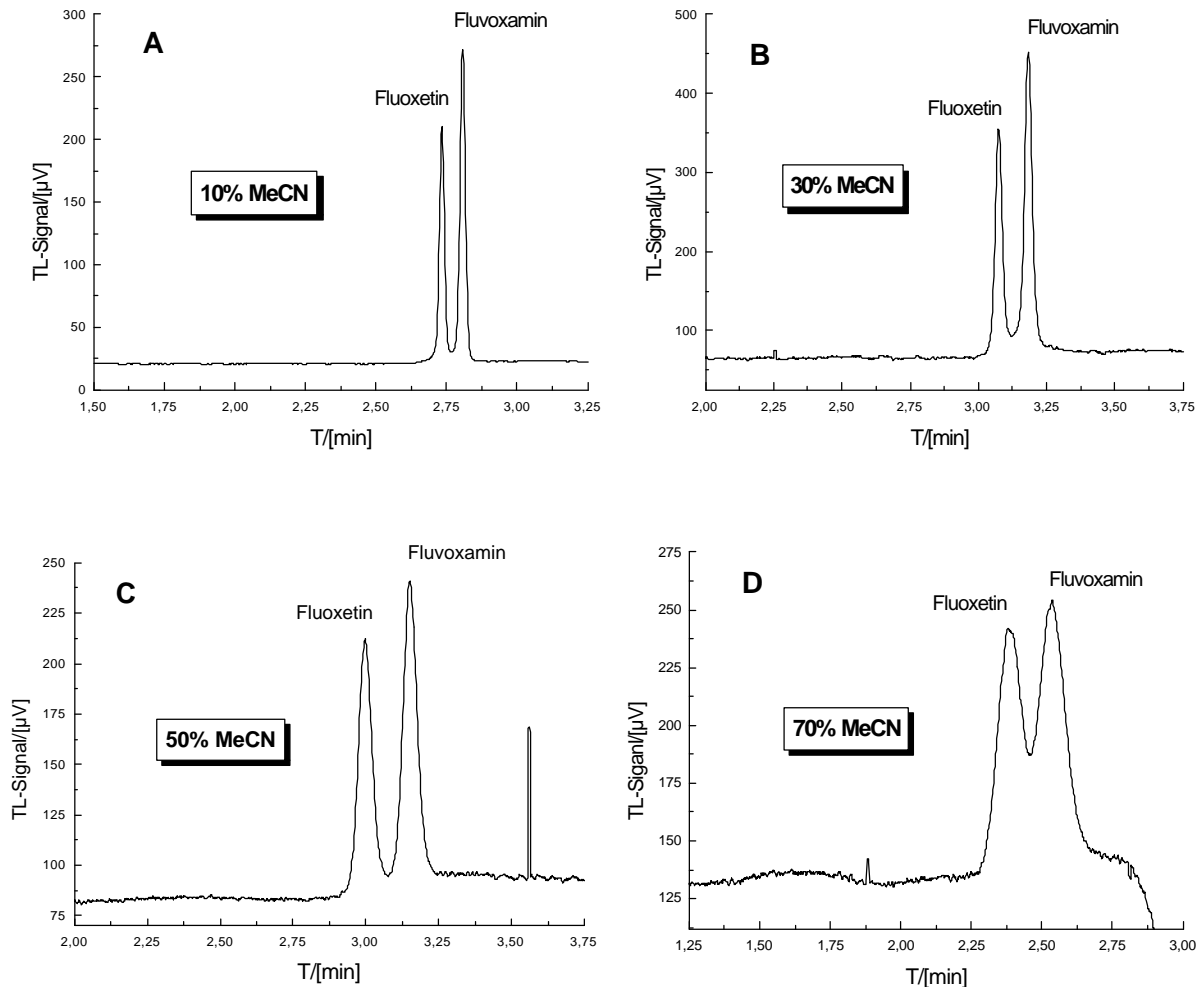


Abbildung 73: CE-Trennung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit TL-Detektion. Messbedingungen: Trennpuffer **A**  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumhydrogenphosphat, 10% MeCN; **B**  $14 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $14 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumhydrogenphosphat, 30% MeCN; **C**  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumhydrogenphosphat, 50% MeCN; **D**  $6 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $6 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumhydrogenphosphat, 70% MeCN; Trennungsspannung 25 kV; Probenaufgabe: konstante Druckdifferenz 3 sec; Kapillarlänge 71,5(41,5) cm, I.D. 75  $\mu\text{m}$ ; Detektion: Thermische-Linse 257 nm; Laserleistung 105 mW; Chopperfrequenz 30 Hz; Analyte: **A** und **B** Fluoxetin  $0,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; **C** und **D** Fluoxetin  $0,313 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $0,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Bei der Betrachtung der vorgestellten Trennungen wird deutlich, daß bei der Zugabe von 10% Acetonitril zum Pufferelektrolyten ein sehr stabiles Basislinien-Signal erhalten wurde, dagegen sind im Fall von 30%, 50% und insbesondere 70% Acetonitril Intensitätsschwankungen des Basislinien-Signals zu beobachten. Außerdem fällt auf, daß die Acetonitrilzugabe zur Verbreiterung der beiden Analyt-

Peaks führt, was im Fall des Trennpuffers mit 70% MeCN eine nichtvollständige Trennung der Antidepressiva verursacht. Infolgedessen kann behauptet werden, daß obwohl bei den TL-Messungen mit 30% , 50% und 70% Acetonitril enthaltenden Pufferlösungen höhere Signalintensitäten für beide Analyte erhalten worden waren, ist es günstiger, die Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin in einem Pufferelektrolyten mit niedrigem Acetonitrilgehalt durchzuführen, da die Verluste in der Stabilität des Basislinie-Signals und in der Trennleistung bei hohem Acetonitril-Gehalt nicht toleriert werden können.

In Tabelle 27 sind die Nachweisgrenzen bei der Bestimmung von Fluoxetin und Fluvoxamin unter Verwendung von Trennelektrolyten mit verschiedenen Volumenanteilen Acetonitril (MeCN) aufgelistet

*Tabelle 27: Vergleich der Nachweisgrenzen ( ng/ml) bei der Bestimmung von Psychopharmaka mit dem TL-Detektor unter Verwendung von Trennelektrolyten mit verschiedenen Volumenanteilen Acetonitril (MeCN).*

<b>MeCN-Gehalt ®</b>	<b>Ohne</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>40%</b>	<b>50%</b>	<b>60%</b>
<b>Verbindung</b>	<b>MeCN</b>	<b>MeCN</b>	<b>MeCN</b>	<b>MeCN</b>	<b>MeCN</b>	<b>MeCN</b>	<b>MeCN</b>
<b>Fluoxetin</b>	10	5	20	20	20	20	30
<b>Fluvoxamin</b>	20	7	30	30	30	40	80

Tabelle 27 zeigt, daß die Zugabe von 10 % Acetonitril zum Trennpuffer eine um einen Faktor zwei niedrigere Nachweisgrenzen als im Fall der rein wäßrigen Pufferlösung ermöglicht hat. Dagegen führt eine weitere Erhöhung des Volumenanteils von Acetonitril im Trennelektrolyten zu einer Verschlechterung der Nachweisgrenzen, so daß bei einem Volumenanteil von 60% eine um einen Faktor drei für Fluoxetin und eine um einen Faktor vier für Fluvoxamin höhere Nachweisgrenze erhalten wurde.

## 8.9 Übertragbarkeit der entwickelten Methode auf Realproben

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der entwickelten Methode auf reale matrixbehaftete Proben wurde wie im Fall der Zytostatika (siehe Kapitel 7.5.6) eine Analyse des eigenen Blutplasmas, welches mit den Analyten gespikt wurde, durchgeführt.

Wie in Kapitel 7.5.6 schon erwähnt wurde, ist hierbei aufgrund der komplexen heterogenen Zusammensetzung der Blutplasmaprobe ein Probenvorbereitungsschritt notwendig.

Da für die vorliegende Arbeit die exakte Bestimmung des proteingebundenen Arzneimittelanteils im unveränderten Blutplasma sowohl bei der Analyse der Zytostatika als auch bei der Bestimmung von Psychopharmaka von untergeordnetem Interesse war, wurde basierend auf den Ergebnissen der Arbeit von *Soetebeer* et al. [82] eine Abtrennung der Proteine durch Verdünnen mit Acetonitril vorgenommen.

### Probenvorbereitung

Das frisch abgenommene Blut wurde etwa eine Stunde in einem EDTA-Röhrchen stehen gelassen. Nachdem sich Blutteilchen niedergeschlagen haben, wurden von der überstehenden klaren Flüssigkeit 400 µl Plasma abgenommen, je 10µl von jeder Analytlösung (0,25 mg mL<sup>-1</sup> für Fluoxetin und 0,5 mg mL<sup>-1</sup> für Fluvoxamin) und 750µl Acetonitril dazu gegeben und 10 min zentrifugiert. Dann wurden 50 µl des Zentrifugats entnommen und mit 950 µl Wasser verdünnt. Die so hergestellte Lösung wurde für die weiteren Messungen verwendet. Die Konzentrationen der Analyte in der Lösung betragen 100 ng mL<sup>-1</sup> für Fluoxetin und 200 ng mL<sup>-1</sup> für Fluvoxamin. Die Pufferzusammensetzung und die Trenn- sowie Detektionsbedingungen waren mit den Bedingungen für die Standardmischungen identisch (siehe Abbildung 70).

In nachfolgender Abbildung 74 sind zwei Elektropherogramme zur Trennung der beiden Antidepressiva in der hergestellten Blutplasmaprobe dargestellt. Das erste wurde als erster Lauf das zweite nach fünf aufeinanderfolgenden elektrophoretischen Trennungen aufgenommen.

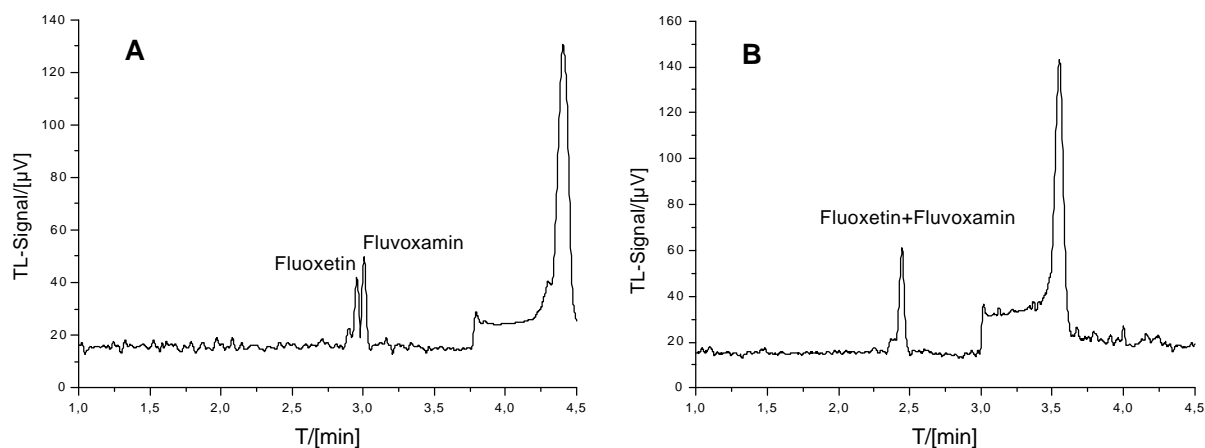


Abbildung 74: CE-Trennung von Fluoxetin und Fluvoxamin mit TL-Detektion. Messbedingungen: **A** erster elektrophoretischer Lauf **B** nach fünf aufeinanderfolgenden Trennungen. Trenn- und Detektionsbedingungen sind Abbildung 69 zu entnehmen. Analyte: Fluoxetin  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , Fluvoxamin  $200 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Aus Abbildung 74 wird deutlich, daß nach fünf aufeinanderfolgenden elektrophoretischen Läufen keine Trennung mehr für die beiden Analyte zu beobachten ist. Aufgrund dessen ist unter den vorgestellten Trennbedingungen keine reproduzierbare Bestimmung der untersuchten Antidepressiva möglich. Dies wird vermutlich durch starke Wechselwirkungen zwischen der Kapillaroberfläche und der nicht vollständig abgetrennten Proteinenfraktion verursacht (siehe Kapitel 7.5.6). Hierbei werden die Proteine an der Kapillaroberfläche adsorbiert. Dadurch wird der EOF verändert, was zu einer verschlechterten Wiederholpräzision für die Migrationszeiten führt.

Das Problem könnte durch weitere Optimierung der Probenvorbereitung, der Trennbedingungen oder durch den Einsatz einer beschichteten Kapillare (siehe Kapitel 4.3.5) gelöst werden. Da aber in diesem Kapitel der vorliegenden Arbeit in erster Linie die grundsätzliche Anwendbarkeit des charakterisierten TL-Detektors auf reale matrixbehaftete Proben interessiert, wurde dieser Aspekt nicht weiter verfolgt.

## **8.10 Untersuchung des Effekts mangelnder Übereinstimmung des Verhältnisses der Signalhöhen für Fluoxetin und Fluvoxamin bei der Thermische-Linse-Detektion mit dem Extinktions-Verhältnis in den Absorptionsspektren**

In den Kapiteln 8.6.2 und 8.7 der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt einer mangelnden Übereinstimmung des Verhältnisses der Signalhöhen von Fluoxetin und Fluvoxamin bei der Thermischen-Linse-Detektion mit dem Extinktions-Verhältnis in den Absorptionsspektren sowie mit dem Verhältnis der Signalhöhen bei der photometrischen UV-Detektion beobachtet (Abbildung 66 A). Die Ursachen dieser Abweichung sind in der Literatur noch nicht beschrieben. Aus unserer Sicht kann es sich dabei um zwei Effekte handeln. Der erste ist eine außergewöhnliche zusätzliche Verstärkung des Thermische-Linse-Signals für Fluoxetin. Dies könnte durch eine chemische Umsetzung des Fluoxetins unter der Einwirkung der eingestrahlten Laserenergie erklärt werden, was zur Entstehung einer Substanz mit einem bei der Wellenlänge höheren Absorptionskoeffizienten als im Fall von Fluoxetin führen kann. Außerdem könnte durch einen Einfluß des Fluoxetins auf die thermooptischen Eigenschaften des Messmediums eine Steigerung des Faktors  $E$  (siehe Gleichung 15) und demzufolge eine Signalerhöhung für die Thermische-Linse-Detektion stattfinden.

Die zweite Erklärungsmöglichkeit ist die chemische Umsetzung des Fluvoxamins unter der Einwirkung der eingestrahlten Laserenergie und dadurch verursachte Entstehung einer bei der Wellenlänge 257 nm nicht oder nur schwach absorbierenden Substanz, was zu Erniedrigung der Signalintensität für Fluvoxamin führen würde.

In Kapitel 3.6.3.3 der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, daß durch Verwendung der Messmedien mit hohen Werten von  $dn/dT$  und niedrigen Werten für die Wärmekapazität bei konstanter Anregungslaserleistung die höchste Empfindlichkeit bei Thermischen-Linse-Messungen erreicht werden kann. Diese Eigenschaften haben organisch-wäßrige Lösungsmittel sowie wäßrige Lösungen von Tensiden. Um zu überprüfen, ob die Gegenwart von Fluoxetin oder Fluvoxamin ein Einfluß auf die thermooptischen Eigenschaften der verwendeten Pufferlösung hat, wurden

Messungen des Brechungsindex bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Konzentrationen der Antidepressiva in der Pufferlösung durchgeführt (Abbildung 75).

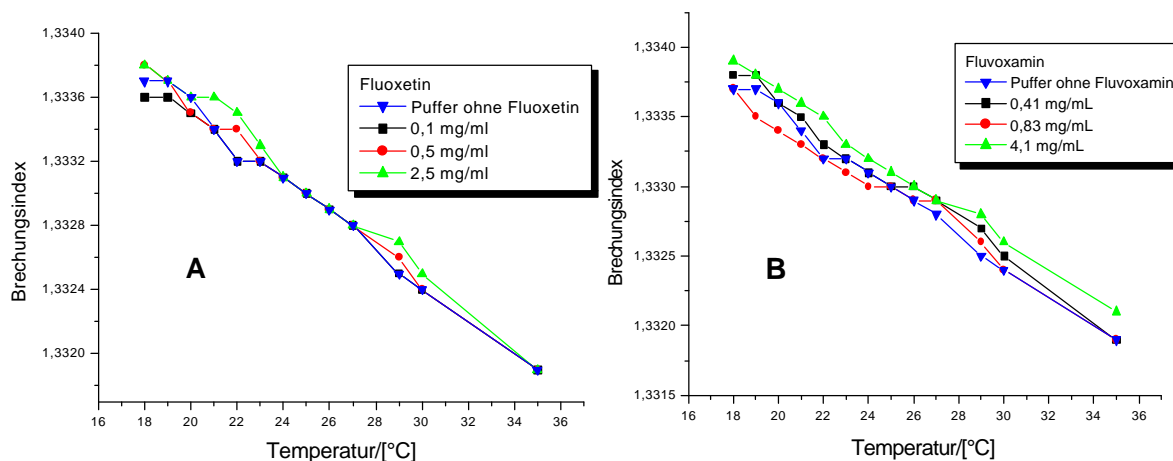


Abbildung 75: Abhängigkeit des Brechungsindex der Analytlösungen von der Temperatur bei verschiedenen Konzentrationen von Fluoxetin (A) und Fluvoxamin (B). Messbedingungen: Puffer  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Natriumdihydrogenphosphat,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Dinatriumhydrogenphosphat, pH 7,0; thermostatisches Refraktometer.

Aus Abbildung 75 wird deutlich, daß in der vorliegenden Konzentration weder Fluoxetin noch Fluvoxamin den Brechungsindex und seine Temperaturänderung in der Pufferlösung beeinflussen (kleinere Konzentrationen an Antidepressiva wurden aufgrund der nicht ausreichenden Empfindlichkeit des verwendeten Refraktometers nicht gewählt). Dies deutet drauf hin, daß unter den vorgestellten Bedingungen die thermooptische Eigenschaften des Medium nur durch die Zusammensetzung des Trennpuffers und nicht durch die Gegenwart einer geringen Konzentration an Analyt bestimmt werden.

Über eine photoinduzierte chemische Umsetzung von Fluoxetin und Bildung eines Produkts, welches bei der Wellenlänge 257 nm stark absorbiert, ist aus der Literatur noch nicht bekannt. Dagegen wurden in der Arbeit von *Miolo et al.* [97] Untersuchungen zur durch UVB-Licht (Wellenlänge 290-320 nm) induzierten Photoisomerisierung von Fluvoxamin im Zusammenhang mit der Entstehung eines pharmakologisch inaktiven Produkts präsentiert. Es wurde gezeigt, daß aufgrund des Vorhandenseins einer CN-Doppelbindung im Fluvoxamin-Molekül eine

Phototransformation von einem *trans*- zu einem *cis*-Isomer möglich ist (Abbildung 76).

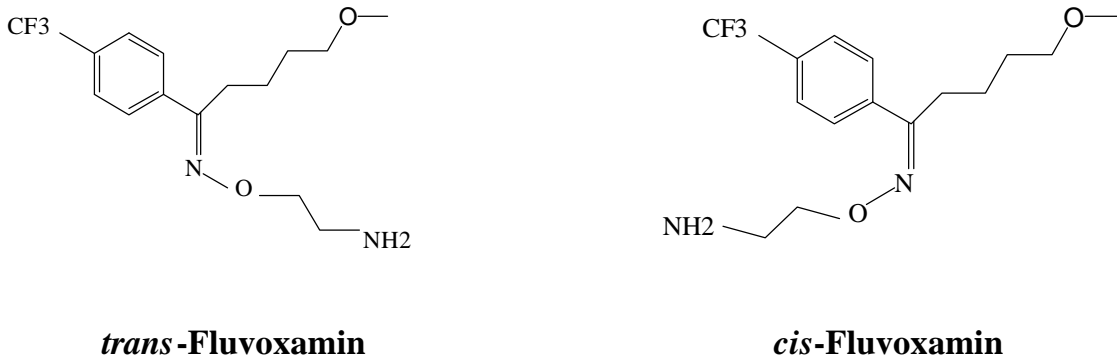


Abbildung 76: chemische Strukturen von *trans*- und *cis*-Fluvoxamin

Unter dreißigminütiger Einwirkung des UVB-Licht (Experimentwellenlänge 312 nm) mit der Lichtenergie von 10 J/cm<sup>2</sup> fand eine 70% -ige Umsetzung des *trans*-Fluvoxamins in das *cis*-Isomer, das in seinem Absorptionsspektrum keine Bande mehr bei 250 nm aufweist, statt (Abbildung 77 [97]).

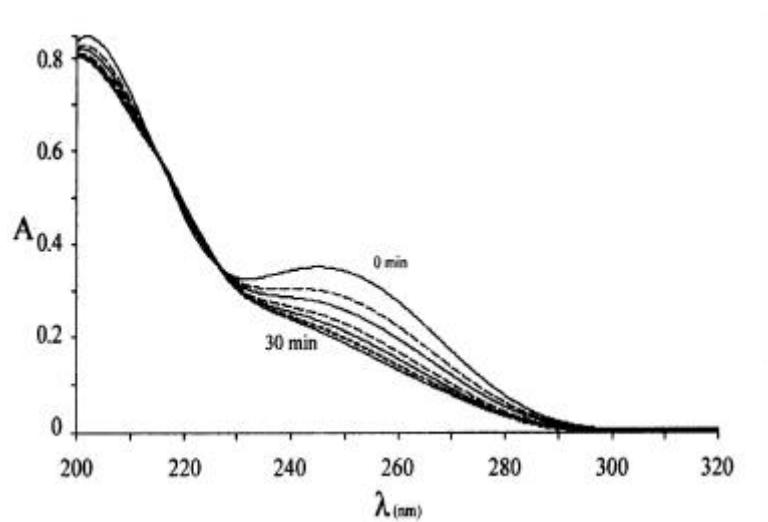


Abbildung 77: Absorptionsspektren bei der Photoisomerisierung von Fluvoxamin in wässriger Lösung. Bei zunehmender Bestrahlungsdauer mit UVB-Strahlung (3, 5, 8, 10, 15, 20, 23, 30 min) zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme der Extinktion bei 245 nm [97].

Unter Berücksichtigung der in Abbildung 70 dargestellten Bedingungen (sehr niedrige Konzentration an Analyt sowie das Vorhandensein des stark fokussierten



UVC-Laserlichtes) kann vermutet werden, daß in diesem Fall eine viel schnellere Umsetzung des *trans*-Fluvoxamins in das bei der Wellenlänge von 257 nm schwach absorbierende *cis*-Fluvoxamin stattfinden könnte, was die mangelnde Übereinstimmung des Verhältnisses der Signalhöhen von Fluoxetin und Fluvoxamin bei der Thermischen-Linse-Detektion mit dem Verhältnis der Signalhöhen bei der photometrischen UV-Detektion erklären könnte. Dies ist eine Hypothese und keine endgültige Erklärung des Phänomens. Zu seiner endgültigen Bestätigung sind weitere Untersuchungen und zwar bei verschiedener Laserleistungen, Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten, sowie unter Verwendung weitere Substanzen, die zur Phototransformation fähig sind, nötig.

## 9 Zusammenfassung und Ausblick

Kapillarelektrophoretische Trennmethode sind durch eine hohe Effizienz, orthogonale Selektivität zu herkömmlichen chromatographischen Methoden sowie viele Einsatzmöglichkeiten ausgezeichnet. Zur quantitativen Erfassung der Analytzone wird hierbei üblicherweise die konventionelle photometrische Detektion direkt in der Kapillare verwendet. Aufgrund der kleinen Detektionsvolumina liefert diese jedoch nicht ausreichend niedrige Nachweisgrenzen. Aufgrund dessen werden weitere Detektionsmethoden für die Kapillarelektrophorese gesucht, vor allem Methoden mit den gleichen Einsatzmöglichkeiten wie bei einem photometrischen Detektor, jedoch mit einer höheren Nachweisstärke. Für die Detektion nichtfluoreszierender Analyte in kleinen Volumina sind deswegen die photothermischen Verfahren, insbesondere die Nahfeld-Thermische-Linse-Detektion (NFTLD) von großer Bedeutung. In Fall der nativen Fluorophore stellt die Laserinduzierte-Fluoreszenz-Detektion (LIF) eine interessante Alternative zur üblichen absorptionsspektrometrischen Detektion dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Laser-Detektionssysteme (photothermische und fluorimetrische) für die Detektion in Kapillaren eingesetzt und mit konventionellen optischen Detektionssystemen (spektrophotometrisch) verglichen.

Die Laserinduzierte-Fluoreszenz-Detektion wurde zur indirekten Bestimmung von nicht absorbierenden anorganischen Anionen eingesetzt. Hierbei wurde 1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure (HPTS) in Form ihres Trinatriumsalzes, dessen elektrophoretische Beweglichkeit der vieler kleiner anorganischer Anionen ähnlich ist, als Hintergrundelektrolyt eingesetzt. Zur EOF-Unterdrückung wurde eine innenbeschichtete Kapillare verwendet, was zur Beschleunigung der Trennung sowie zu einer besseren Wiederholpräzision führte. Die Verwendung von HPTS als Hintergrundelektrolyt sowie der Einsatz einer extrem leistungsstabilen frequenzverdoppelten Laserdiode (Wellenlänge 452 nm) als Anregungslichtquelle erwiesen sich für die Nachweisstärke der entwickelten Methode als vorteilhaft. Die Gegenüberstellung von indirekter photometrischer Detektion und indirekter LIF-

Detektion ergab signifikant niedrigere Nachweisgrenzen für die LIF-Detektion. Die Übertragbarkeit der Methode auf reale matrixbehaftete Proben wurde anhand der Analyse von Mineralwässern und Leitungswässern demonstriert. Die Richtigkeit der Ergebnisse wurde durch Vergleich mit Daten, welche mittels Ionenchromatographie/Leitfähigkeitsdetektion gewonnen worden waren, überprüft. Für die direkte Bestimmung nichtfluoreszierender Analyte wurde ein im Arbeitskreis von Dr. Faubel (Forschungszentrum Karlsruhe) entwickelter Nahfeld-Thermische-Linse-Detektor eingesetzt. Der Detektor wurde umfassend charakterisiert und zur Bestimmung von Nitroverbindungen nach einer MEKC-Trennung verwendet. Dadurch konnte demonstriert werden, daß der Einsatz des erstmalig eingesetzten NFTL-Detektors für die Detektion in Kapillaren grundsätzlich möglich ist. Bei der Bestimmung von Nitroverbindungen konnte eine Verbesserung der Nachweisgrenzen um den Faktor 4 bis 28 gegenüber photometrischer UV-Detektion erreicht werden, was die Gesamtmethode (Trennung und Quantifizierung) konkurrenzfähig zur HPLC mit photometrischer Detektion macht. Außerdem wurde die Eignung der Methode für reale matrixbehaftete Proben anhand einer mit Nitroaromaten kontaminierten Wasserprobe bestätigt.

Neben umweltbezogenen Anwendungen wurde die Anwendung des charakterisierten Thermische-Linse-Detektors auf die klinische Analytik insbesondere im Hinblick auf das therapeutische Drug Monitoring erweitert. Als Problemstellung wurde hier eine Bestimmung von Zytostatika (Etoposid, Etoposidphosphat und Teniposid) sowie Antidepressiva (Fluoxetin und Fluvoxamin) in Blutplasma gewählt. Zur Bestimmung der Zytostatika und Antidepressiva wurden zunächst zwei Trennmethode mit einem konventionellen photometrischen UV-Detektor erarbeitet, die anschließend auf die Verwendung eines Thermische-Linse-Detektors übertragen wurden. Es konnte gezeigt werden, daß unter Verwendung der Nahfeld-Thermischen-Linse-Detektion eine Verbesserung der Nachweisgrenzen um den Faktor 35 bis 60 bei der Bestimmung der Zytostatika und um den Faktor 28 und 670 bei der Bestimmung der Antidepressiva gegenüber der photometrischen UV-Detektion bei gleicher Wellenlänge erreicht werden kann.

Bei den Untersuchungen mit den ausgewählten Antidepressiva ist ein interessantes

Phänomen der Nichtübereinstimmung des Verhältnisses der Signalhöhen von Fluoxetin und Fluvoxamin bei der Thermischen-Linse-Detektion mit dem Extinktion-Verhältnis in den Absorptionsspektren aufgetreten, was vermutlich auf Isomerisierung von Fluvoxamin und anschließende Bildung von schwach absorbierenden Produkten unter Einwirkung des UV-Lichtes zurückzuführen war.

Die Anwendbarkeit der zwei Methoden auf Realproben konnte am Beispiel von eigenen Blutplasmaproben, welche mit Analyt gespikt worden waren, demonstriert werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß im Rahmen der Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass lasergestützte molekülspektrometrische Detektionssysteme eine Erhebliche Verbesserung der Nachweisgrenzen gegenüber der herkömmlichen photometrischen Detektion auch für nichtfluoreszierende Analyte zulassen.. Das entwickelt Verfahren zur Bestimmung anorganischer Anionen mit indirekter LIF-Detektion bei sowie die Bestimmung von Nitroverbindungen, Zytostatika und Antidepressiva mit TL-Detektion zeichnen sich durch deutlich verbesserte Nachweisgrenzen gegenüber solchen Verfahren aus, die auf einen klassischen photometrischen Detektor zurückgreifen.

Aus unserer Sicht ist das Potential der Thermischen-Linse- sowie der laserinduzierten Fluoreszenz-Detektion noch nicht ausgeschöpft, so daß weitere Optimierungen der Methoden und insbesondere der Mess-Aufbauten notwendig sind. Diese sollten zu einer weiteren Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses und dadurch zu einer Erniedrigung der erreichbaren Nachweisgrenzen sowie zur Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten dieser lasergestützten Detektionstechniken führen.

## 10 Literatur

- 1 A. Tiselius  
A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures  
*Trans. Faraday Soc.* **33** (1937) 524
- 2 F. E. P. Mikkers, F. M. Everearts, T. P. E. M. Verheggen  
Concentration distributions in free zone electrophoresis  
*J. Chromatogr.* **169** (1979) 1
- 3 F. E. P. Mikkers, F. M. Everearts, T. P. E. M. Verheggen  
High-performance zone electrophoresis  
*J. Chromatogr.* **169** (1979) 11
- 4 J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs  
High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis  
*J. Chromatogr.* **218** (1981) 209
- 5 J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs  
Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries  
*Anal. Chem.* **53** (1981) 1298
- 6 D. M. Goodhall, D. K. Lloyd, S. J. Williams  
Quantitative aspects of capillary electrophoresis  
*LC-GC* **8** Nr. 10 (1991)
- 7 D. N. Heiger, A. S. Cohen, B. L. Karger  
Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields  
*J. Chromatogr.* **516** (1990) 33
- 8 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando  
Electrokinetic separations with micellar solutions and open tubular capillaries  
*Anal. Chem.* **56** (1984) 111
- 9 H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt  
Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten  
Vieweg Verlag 1994
- 10 E. Mussenbrock  
Die Bestimmung von Explosivstoffen in Böden mit Hilfe der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie  
Dissertation, Münster 1994

- 11 A. Dworschak  
Einsatzmöglichkeiten der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie  
Dissertation, Marburg/Lahn 2000
- 12 M. M. Bushey, J. W. Jorgenson  
Effects of Methanol-Modified Mobile Phase on the Separation of Isotopically  
Substituted Compounds by Micellar Electrokinetic Capillary  
Chromatography  
*J. Microcol. Sep.* **1** (1989) 125
- 13 K. Saitoh, C. Kiyohara, N. Suzuki  
Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Metal Complexes of  
Acetylacetone  
*J. High Res. Chromatogr.* **14** (1991) 245
- 14 S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando  
Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular  
capillary  
*Anal. Chem.* **57** (1985) 834
- 15 K. Otsuka, S. Terabe  
Enantiomeric Resolution by Micellar Electrokinetic Chromatography with  
Chiral Surfactans  
*J. Chromatogr.* **515** (1990) 221
- 16 Firmenbroschüre der Firma Hewlett Packard  
High Performance Capillary Electrophoresis - an Introduction  
Waldbronn 1992
- 17 M. Pütz  
Novel Applications of UV-LIF detection in forensic and pharmaceutical  
analysis  
Vortrag auf der Abschlußpräsentation zum BMBF-Projekt MIMOLIS  
Analytica, München 2002
- 18 M. Pütz  
Sensitive Detection – A microchip laser and capillary electrophoresis can  
detect biochemically relevant native fluorophores in very small volumes.  
*Photonics Spectra* **35** (2001) 112
- 19 E. Gassmann, J. E. Kuo, R. N. Zare  
Electrokinetic Separation of Chiral Compounds  
*Science* **230** (1985) 813

- 20 M. Pütz, T. Ziep, H. Jungclas, P. Patzelt, U. Pyell  
Konstruktion, Optimierung und Anwendung von Detektoren mit Laserdioden  
als Strahlungsquellen für HPLC-, FIA- und CZE-Anlagen  
Abschlußbericht zum BMBF-Verbundprojekt LIFDET (16SV271/9)  
Marburg/Lahn 2000
- 21 M. Pütz, W. Ensinger, U. Pyell, J. Mannhardt, K. Schwenkenbecher  
Miniaturisiertes modulares LIF-System für die begleitende Diagnostik bei  
der Krebstherapie von Kindern unter Einsatz eines diodengepumpte  
miniaturisierten UV-Lasers mit 4 verschiedenen Wellenlängen  
Abschlußbericht zum BMBF-Verbundprojekt MIMOLIS (16 SV 1089/2)  
Marburg/Lahn 2002
- 22 A. C. Tam  
Application of photoacoustic sensing techniques  
*Rev. Mod. Phys.* **58** (1986) 381
- 23 P. Hess  
Principles of Photoacoustic and Photothermal Analysis, Photoacoustic in  
Photothermal and Photochemical Processes in Gases  
*Top. Curr. Phys.* **46**, Springer-Verlag, Heidelberg 1989
- 24 C. C. Davis, S. J. Petuchowski  
Phase Fluctuation Optical Heterodyne Spectroscopy of Gases  
*Appl. Opt.* **20** (1981), 2539
- 25 R. Gupta  
Principles of photothermal spectroscopy in fluids, in Progress in  
photothermal and photoacoustic science and technology  
Band 1, Elsevier, New York, Amsterdam 1992
- 26 E. Steinle  
Die Thermische Linse als Detektorsystem für die Kapillarelektrophorese und  
die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie  
Dissertation, Karlsruhe 1996
- 27 N. Ragozina, St. Heissler, W. Faubel, U. Pyell  
Near-Field Thermal Lens Detection at 257 nm as an Alternative to  
Absorption Spectrometric Detection in Combination with Electromigrative  
Separation Techniques  
*Anal. Chem.* **74** (2002) 4480
- 28 K. Adelhelm  
Laserinduzierte Photoakustische Spektroskopie zum Nachweis organischer  
Schadstoffe in Lösungen  
Dissertation, Karlsruhe 1992

- 29 B. Bohnert  
Transversale und kollineare Photothermische Ablenkungsspektroskopie zur Untersuchung wäßriger Systeme anorganischer und umweltrelevanter organischer Schadstoffe  
Dissertation, Karlsruhe 1992
- 30 B. S. Seidel  
Die Photothermische Interferometrie als miniaturisiertes Detektorsystem für Schadstoffe in Flüssigkeiten und Gasen  
Dissertation, Karlsruhe 1995
- 31 T. S. Schulz  
Die Thermische Linse als Detektorsystem für die Spurenanalyse in flüssigen Systemen  
Dissertation, Karlsruhe 1994
- 32 W. Faubel, T. Schulz, B. S. Seidel, E. Steinle, H. J. Ache  
Comparing the analytical potential of PAS, PDS, TL and PTPS for trace detection of pesticides in water  
*Journal de Physique IV, Colloque C7, supplément au Journal de Physique III* **4** (1994) 531
- 33 B. S. Seidel, W. Faubel  
Fiber optic modified thermal lens detector system for the determination of amino acids  
*J. Chromatogr. A* **817** (1998) 223
- 34 X. Li, C. Liu, P. Roos, E. B. Hansen, C. E. Cerniglia, N. J. Dovichi  
Nonaqueous capillary electrophoretic separation and thermo-optical absorbance detection of five tricyclic antidepressants and metabolism of amitriptyline by *Cunninghamella elegans*  
*Electrophoresis* **19** (1998) 3178
- 35 W. Faubel, St. Heissler, U. Pyell, N. Ragozina  
Photothermal trace detection in capillary electrophoresis for biomedical diagnostics und toxic materials (invited)  
*Rev. Sci. Instr.* **74** (2003) 491
- 36 J. P. Gordon, C. C. Leite; R. S. Moore, S. P. S. Porto, J. R. Whinnery  
Long Transient Effects in Lasers with Inserted samples  
*Bull. Am. Phys. Soc.* **9** (1964) 501
- 37 J. F. Power  
Pulsed mode thermal lens effect detection in the near field via thermally induced probe beam spatial phase modulation: a theory  
*J. Appl. Opt.* **29** (1990) 52



- 38 S. E. Bialkowski  
Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis  
Wiley, New York 1996
- 39 G. Abroskin, T. V. Belyaeva, V. A. Filichkina, E. K. Ivanova, M. A. Proskurnin, V. M. Savostina, Yu. A. Barbalat  
Thermal Lens Spectrometry in Trace Metal Analysis  
*Analyst* **117** (1992) 1957
- 40 V. A. Filichkina, A. G. Abroskin, Yu. A. Barbalat, I. V. Golovko, M. A. Proskurnin, V. M. Savostina  
A Study of Organo-Aqueous Media from the Point of View of the Sensitivity of Thermal Lens Measurements  
*Zh. Anal. Khim.* **48** (1993) 194
- 41 M. A. Proskurnin, V. B. Ivleva, N. Yu. Ragozina, E. K. Ivanova  
The Use of triton X-100 in Thermal Lensing of Aqueous Solution  
*Anal. Sci.* **16** (2000) 397
- 42 J. Romano, P. Jandik, W. R. Jones, P. E. Jackson  
Optimization of inorganic capillary electrophoresis for the analysis of anionic solutes in real samples  
*J. Chromatogr.* **546** (1991) 411
- 43 A. D. Merques, H. F. Souza, I. C. Costa; W. M. de Azevedo  
Spectroscopic study of harmene in micelles at 77K using fluorescent probes  
*Journal of Molecular Structure* **520** (2000) 179
- 44 J. E. Melanson, C. A. Boulet, C. A. Lucy  
Indirect Laser-Induced Fluorescence Detection for Capillary Electrophoresis Using a Violet Diode Laser  
*Anal. Chem.* **73** (2001) 1809
- 45 K. D. Altria  
Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis  
Vieweg Verlag, Wiesbaden 1998
- 46 P. Jandik, W. R. Jones  
Optimization of detection sensitivity in the capillary electrophoresis of inorganic anions  
*J. Chromatogr.* **546** (1991) 431
- 47 W. Buchberger, P. R. Haddad  
Effects of carrier electrolyte composition on separation selectivity in capillary zone electrophoresis of low-molecular-mass anions  
*J. Chromatogr.* **608** (1992) 59

- 48 F. Steiner, W. Beck, H. Engelhardt  
Optimization of indirect ultraviolet detection in high-performance chromatography and capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* **738** (1996) 11
- 49 A. Röder, K. Bächmann  
Simultaneous determination of organic and inorganic anions in the sub- $\mu\text{mol/l}$  range in rain water by capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* **689** (1995) 305
- 50 Y. Ma, R. Zhang  
Optimization of indirect photometric detection of anions in high-performance capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr.* **625** (1992) 341
- 51 L. Gross, E. S. Yeung  
Indirect fluorimetric detection and quantification in capillary zone electrophoresis of inorganic anions and nucleotides  
*J. Chromatogr.* **480** (1989) 169
- 52 Y. C. Chao, C. W. Whang  
Capillary zone electrophoresis of eleven priority phenols with indirect fluorescence detection  
*J. Chromatogr. A* **663** (1994) 229
- 53 P. L. Desbene, C. J. Morin, A. M. Desbene Monvernay, R. S. Groult  
Utilization of fluorescein sodium salt in laser-induced indirect fluorimetric detection of ions separated by capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* **689** (1995) 135
- 54 C. Feisel  
Beiträge zur Entwicklung eines Trennelektrolyten zur indirekten fluorimetrischen Detektion bei der Trennung von Anionen mit der Kapillarelektrophorese und Vergleich mit einem Trennelektrolyten zur indirekten photometrischen Detektion  
Diplomarbeit, Marburg/Lahn 1997
- 55 W. G. Kuhr, E. S. Yeung  
Indirect Fluorescence Detection of Native Amino Acids in Capillary Zone Electrophoresis  
*Anal. Chem.* **60** (1988) 1832
- 56 Y. Xeu, E. S. Yeung  
Double-Beam Laser Indirect Absorption Detection in Capillary Electrophoresis  
*Anal. Chem.* **65** (1993) 2923

- 57 O. S. Wolfbeis, E. Furlinger, H. Kroneis, H. Marsoner  
A Study on Fluorescent Indicators for Measuring Near Neutral  
(„Physiological“) pH-Values  
*Fresenius Z. Anal. Chem.* **314** (1983) 119
- 58 T. Ziep  
Methodische Entwicklungen von Detektionssystemen zur Bestimmung der  
Fluoreszenz und der Fluoreszenzlebenszeit ausgewählter Analyte unter  
Verwendung frequenzvervielfachter Festkörperlaser  
Dissertation, Marburg/Lahn 1999
- 59 P. Doble, M. Macka, P. R. Haddad  
Design of background electrolytes for indirect detection of anions by  
capillary electrophoresis  
*Trends Anal. Chem.* **19** (2000) 10
- 60 M. X. Li, L. Liu, J. T. Wu, D. M. Lubman  
Use of a Polybrene Capillary Coating in Capillary Electrophoresis for Rapid  
Analysis of Hemoglobin Variants with On-Line Detection via an Ion Trap  
Storage/Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometer  
*Anal. Chem.* **69** (1997) 2451
- 61 S. Hjertén  
High-performance electrophoresis: elimination of electroendosmosis and  
solute adsorption  
*J. Chromatogr.* **347** (1985) 191
- 62 W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert  
Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie  
VCH-Verlag, Weinheim 1992
- 63 K. Doerffel  
Statistik in der Analytischen Chemie  
Chemie Verlag, Weinheim 1984
- 64 T. Groh, K. Bächmann  
Selective influencing of the migration time of  $\text{SO}_4^{2-}$  by forming neutral  
species with  $\text{Pb}^{2+}$  in capillary zone electrophoresis  
*Electrophoresis* **13** (1992) 458
- 65 M. Mensch  
Thermische Linse Detektorkopf für die Kapillarelektrophorese  
Dokumentation, Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Instrumentelle  
Analytik, Karlsruhe 2000

- 66 T. Urbanski  
Chemie und Technologie der Explosivstoffe Bd. 1  
VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1961
- 67 D. A. Cataldo, S. D. Harvey, R. J. Fellows  
An evaluation of the environmental fate and behavior of munitions material (TNT, RDX) in soil and plant systems.  
Final Report (1989) U. S. Medical Research and Development Command, Project Order Number 88PP8853, Pacific Northwest Laboratory
- 68 J. V. Dilley, C. A. Tyson, G. W. Newell  
Mammalian Toxicity Evaluation of TNT Wastewaters  
Contract Nr. DAMD17-76-C-6050, Vol. III  
Stanford Research Institute, Menlo Park, CA 1978
- 69 D. T. Burns, R. J. Lewis  
Investigation into variations in the isomer content within the nitroaromatic component in nitroglycerine-based explosives by gas chromatography with flame ionisation detection  
*Anal. Chim. Acta* **309** (1995) 189
- 70 M. E. Walsh  
Determination of nitroaromatic, nitramine, and nitrate ester explosives in soil by gas chromatography and an electron capture detector  
*Talanta* **54** (2001) 427
- 71 M. Bader, T. Goen, J. Muller, J. Angerer  
Analysis of nitroaromatic compounds in urine by gas chromatography-mass spectrometry for the biological monitoring of explosives  
*J. Chromatogr. B* **710** (1998) 91
- 72 K. Florey  
Etoposide  
*Analytical Profiles of Drug Substances* **18** (1989) 121
- 73 S. Seeber, G. A. Nagel, W. Achterrath, C. G. Schmidt, R. Raetting  
Etoposid (Prüfbezeichnung VP 16-213). Derzeitiger Stand und neue Entwicklungen in der Chemotherapie maligner Neoplasien; Etoposid-Symposium der Arbeitsgemeinschaft Internistischer Onkologie der deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Bristol-Myers GmbH  
W. Zuckerschwedt Verlag GmbH, München 1981
- 74 C. Feisel  
Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Methode zum therapeutischen Drug Monitoring  
Dissertation, Marburg/Lahn 2001

- 75 H. Lüllmann, K. Mohr  
Pharmakologie und Toxikologie  
Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen  
Georg Time Verlag, Stuttgart 1999
- 76 D. J. Brooks, N. R. Srinivas, D. S. Alberts, T. Thomas, L. M. Igewemzie, L. M. McKinney, J. Randolph; L. Schacter, S. Kaul, R. H. Barbhaiva  
Phase I and pharmacokinetic study of etoposide phosphate  
*Anti-Cancer Drugs* **6** (1995) 637
- 77 R. S. de Jong, E. A. M. Slijfer, D. R. A. Uges, N. H. Mulder, E. G. E. de Vries  
Conversion of the prodrug etoposide phosphate to etoposide in gastric juice and bile  
*British J. of Cancer* **76** (1997) 1480
- 78 R. J. Strife, I. Jardine, M. Colvin  
Analysis of the Anticancer drugs VP 16-213 and VM 26 and their metabolites by high-performance Liquid chromatography  
*J. Chromatogr.* **182** (1980) 211
- 79 R. J. Strife, I. Jardine, M. Colvin  
Analysis of the Anticancer drugs etoposide (VP 16-213) and teniposide (VM 26) by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection  
*J. Chromatogr.* **224** (1981) 168
- 80 J. A. Sinkule, W. E. Evans  
High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of the Semisynthetic Epipodophyllotoxines Teniposide and Etoposide Using Electrochemical Detection  
*J. Pharm. Sci.* **73** (1984) 164
- 81 T. Saita, K. Fjiwara, T. Kitagawa, M. Mori, K. Takata  
A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for etoposide using  $\beta$ -D-galactosidasa as a Label  
*Cancer. Chemother. Pharmacol.* **27** (1990) 115
- 82 U. B. Soetebeer, M. O. Schierenberg, H. Schulz, G. Hempel, P. Andresen, G. Blaschke  
Simultaneous Quantification of Etoposide and Etoposide Phosphate in Human Plasma by Capillary Electrophoresis Using Laser-Induced Native Fluorescence Detection  
*Anal. Chem.* **73** (2001) 2178

- 83 Y. Mrestani, R. Neubert  
Separation of etoposide phosphate and methotrexate by capillary zone electrophoresis using UV detection with a high sensitivity cell  
*Electrophoresis* **19** (1998) 3022
- 84 Hoffman-La Roche AG und Urban & Schwarzenberg  
Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage  
Urban & Schwarzenberg Verlag, 1998
- 85 Wissenschaftliche Tabellen Geigy  
Teilband Hämatologie und Humangenetik  
8. Nachdruck, 1985
- 86 Z. K. Shihabi  
Sample matrix effects in capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* **652** (1993) 471
- 87 [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
- 88 B. Starczewska, K. Mielech, E. Kleszczewska  
Wybrane metody oznaczania fluoksetyny i fluwoksaminy  
*Psychiaria Poska* **XXXVI** (2002) 603
- 89 A. LLerena, P. Dorado, R. Berecz, A. Gonzalez, M. J. Norberto, A. de la Rubia, M. Cáceres  
Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection in psychiatric patients  
*J. Chromatogr. B* **783** (2003) 25
- 90 G. Tournel, N. Houdret, V. Hédouin; M. Deveaux, D. Gosset, M. Lhermitte  
High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum  
*J. Chromatogr. B* **761** (2001) 147
- 91 S. Atmaca  
Fluorimetric determination of fluoxetine hydrochloride  
*Pharmazie* **50** (1995) 300
- 92 R. Sukow, M. Zhang, T. Cooper  
Sensitive and selective liquid-chromatographic assay of fluoxetine and norfluoxetine in plasma with fluorescence detection after precolumn derivatization  
*Clin. Chem.* **38** (1992) 1756

- 93 R. Lantz, Z. Farid, J. Koons, B. Tenbarga, R. Bopp  
Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by capillary gas chromatography with electron-capture detection  
*J. Chromatogr.* **614** (1993) 175
- 94 J. A. Crifasi, N. X. Le, C. Long  
Simultaneous Identification and Quantitation of Fluoxetine and its Metabolite, Norfluoxetine, in Biological Samples by GC-MS  
*J. Anal. Toxicology* **21** (1997) 415
- 95 J. J. Berzas Nevado, A. M. Conteno Salcedo, M. J. Villasenor Llerena, E. Aguas Nuevo  
Method development and validation for the simultaneous determination of fluoxetine and fluvoxamine in pharmaceutical preparation by capillary electrophoresis  
*Anal. Chim. Acta* **417** (2002) 169
- 96 C. Desiderio, S. Rudaz, M. A. Raggi, S. Fanali  
Enantiomeric separation of fluoxetine and norfluoxetine in plasma and serum samples with high detection sensitivity capillary electrophoresis  
*Electrophoresis* **20** (1999) 3432
- 97 G. Miolo, S. Caffieri, L. Levorato, M. Imbesi, P. Giusti, T. Uz, R. Manev, H. Manev  
Photoisomerization of fluvoxamine generates an isomer that has reduced activity on the 5-hydroxytryptamine transporter and does not affect cell proliferation  
*Eur. J. Pharmacol.* **450** (2002) 223

## 11 Anhang

### 11.1 Verwendete Abkürzungen

ADC	Analog Digital Converter
A. U.	Absorbance Units
BGE	Hintergrundelektrolyt
CE	Kapillarelektrophorese
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DAD	Dioden-array-Detektor
DNS	Desoxyribonucleine Säure
DR	dynamische Reserve
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Liked-Immunsorbent-Assay
EOF	elektroosmotischer Fluß
EPA	Environmental Protection Agency
GC	Gaschromatographie
HDB	1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylen polymethobromide
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPTS	1-Hydroxypyren-3,6,8-trisulfonsäure
IC	Ionenchromatographie
I. D.	Innendurchmesser
ITP	Isotachophorese
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
LIPAS	laserinduzierte photoakustische Spektrometrie
LWL	Lichtwellenleiter
MeCN	Acetonitril
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
NBD-Cl	4-Chloro-7-nitrobenzofurazan
NFTL	Nahfeld-Thermische-Linse
NFTLD	Nahfeld-Thermische-Linse-Detektion
NFTLS	Nahfeld-Thermische-Linse-Spektrometrie



NTL	Nahfeld-Thermische-Linse
NTLD	Nahfeld-Thermische-Linse-Detektion
p. a.	pro analysi
PAS	photoakustische Spektrometrie
PDMS	Plasmadesorptions-Massenspektrometer
PDS	photothermische Ablenkungsspektrometrie
PEEK	Poly-ether-ether-keton
PI	photothermische Interferometrie
PPES	photopyroelektrische Spektrometrie
RSD	relative Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSRI	selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitor
TCA	trizyklische Antidepressiva
TL	Thermische-Linse
TLD	Thermische-Linse-Detektion
TLS	Thermische-Linse-Spektrometrie
TR	Transferrate
TTAB	Tetradecyltrimethylammoniumbromid
UVC	Ultraviolett Licht Gruppe C (200-290 nm)
UVB	Ultraviolett Licht Gruppe B (290 –320 nm)
UVD	photometrische Detektion im UV-Bereich
UV-VIS	photometrische Detektion im UV-Bereich und im sichtbaren Bereich des Lichtspektrum

### 11.1.2 Abkürzungen der untersuchten Nitroaromaten

2,4,6-TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
1,3,5-TNB	1,3,5-Trinitrobenzol
Tetryl	2,4,6, N- Tetranitro-N-methylanilin
HMX	1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyclooctan
NB	Nitrobenzol
4-NT	4-Nitrotoluol
2-NT	2-Nitrotoluol

1,3-DNB	1,3-Dinitrobenzol
2-M-3-NA	2-Methyl-3-nitroanilin
2,4-DNT	2,4-Dinitrotoluol
2,6-DNT	2,6-Dinitrotoluol
2,3-DNT	2,3-Dinitrotoluol
2-A-4,6-DNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
4-A-2,6-DNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol
1-F-2,4-DNB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

## 11.2 Verwendete Chemikalien

In der Tabelle 28 sind die im Laufe der Arbeit verwendeten Chemikalien mit Reinheitsgrad und Bezugsquelle aufgelistet.

*Tabelle 28: Verwendete Chemikalien mit Reinheitsgrad und Bezugsquelle*

<i>Substanz</i>	<i>Reinheit bzw. Gehalt</i>	<i>Bezugsquelle</i>
2,4,6-TNT	Lösung in Acetonitril (c = 1000±30 mg L <sup>-1</sup> )	Promochem (Wesel)
1,3,5-TNB	Lösung in Acetonitril (c = 1000±30 mg L <sup>-1</sup> )	Promochem (Wesel)
Tetryl	Lösung in Acetonitril (c = 1000±30 mg L <sup>-1</sup> )	Promochem (Wesel)
HMX	Lösung in Acetonitril (c = 1000±30 mg L <sup>-1</sup> )	Promochem (Wesel)
NB	rein	Promochem (Wesel)
4-NT	rein	Promochem (Wesel)
2-NT	rein	Promochem (Wesel)
1,3-DNB	rein	Promochem (Wesel)
2-M-3-NA	rein	Promochem (Wesel)
2,4-DNT	rein	Promochem (Wesel)
2,6-DNT	rein	Promochem (Wesel)
2,3-DNT	rein	Promochem (Wesel)

2-A-4,6-DNT	rein	Promochem (Wesel)
4-A-2,6-DNT	rein	Promochem (Wesel)
1-F-2,4-DNB	rein	Merck (Darmstadt)
Natriumtetraborat	p. a.	Fluka (Seelze)
Borsäure	suprapure	Merck (Darmstadt)
Thioharnstoff	p. a.	Fluka (Seelze)
Kaliumbromid	p. a.	Merck (Darmstadt)
Kaliumsulfat	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kaliumnitrat	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kaliumnitrit	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Ammoniumheptamolybdat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Kaliumazid	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kaliumthiocyanat	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kaliumchlorat	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kaliumfluorid	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Kaliumacetat	p. a.	Riedel-de-Haën (Seelze)
Natriumfluorid	p. a.	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	p. a.	Merck (Darmstadt)
Matriumbromid	p. a.	Merck (Darmstadt)
Natriumnitrat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Natriumsulfat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Natriumphosphat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Natriumnitrit	p. a.	Merck (Darmstadt)
HPTS	p. a. for fluorescence	Fluka (Seelze)
<i>L</i> -Lysine	p. a.	Sigma (Taufkirchen)
HDB (Polybren)		Sigma (Taufkirchen)
CTAB		Merck (Darmstadt)
Calciumhydroxid	p. a.	Merck (Darmstadt)
Methacryloxypropyltrimethoxysilane		Fluka (Seelze)
Acrylamid		Fluka (Seelze)
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylendiamin		Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat		Merck (Darmstadt)

Dinatriumcarbonat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	p. a.	Fluka (Seelze)
Natriumhydrogencarbonat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Etoposid	p. a.	Bristol-Myers Squibb (München)
Etoposidphosphat	p. a.	Bristol-Myers Squibb (München)
Teniposid	p. a.	Bristol-Myers Squibb (München)
Pufferlösung pH 4		Merck (Darmstadt)
Pufferlösung pH 7		Merck (Darmstadt)
Pufferlösung pH 9		Merck (Darmstadt)
Pufferlösung pH 10		Merck (Darmstadt)
Fluoxetinhydrochlorid	p. a.	Sigma (Taufkirchen)
Fluvoxaminmaleat	p. a.	Sigma (Taufkirchen)
Natriumdihydrogenphosphat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	p. a.	Merck (Darmstadt)
Thioharnstoff	p. a.	Merck (Darmstadt)
Methanol	für HPLC	Merck (Darmstadt)
Acetonitril	für HPLC	Merck (Darmstadt)

## 11.3 Verwendete Geräte und Software

### 11.3.1 CE-System 1

Das CE-System 1 wurde bei der Bestimmung von Niroaromaten (siehe Kapitel 6), Zytostatika (siehe Kapitel 7) sowie Antidepressiva (siehe Kapitel 8) verwendet. Das System bestand aus folgenden Einzelkomponenten:

**Kapillarelektrophoresegerät** *Spectra PhORESIS 100* (TSP100) der Firma *ThermoQuest*

**Detektion:** A UV-Absorptionsdetektor *Linear UVVIS 200* der Firma *Spektra Physics*

**B** Photothermischer Detektor (konstruiert im Forschungszentrum Karlsruhe) mit einem Argon-Ionen Laser (*Lexel 95 SHG*), mit einem miniaturisierten Chopper (*Modell 360 H, Scitec Instruments*) sowie mit einem Lichtwellenleiter (*Schaeffer and Kirchhoff*)

**Quarzkapillaren** der Firmen *Supelco and CS-Chromatographie-Service* mit 75 µm Innendurchmesser und 360 µm Außendurchmesser

**Software** *Gynkosoft* der Firma *Gynkotek*

**Messdatenauswertung** *Origin 6.1G* (Firma *Microcal*, Northampton, MA, USA).

### 11.3.2 CE-System 2

Das CE-System 2 wurde bei der indirekten Bestimmung von Anionen (siehe Kapitel 4) verwendet. Das System bestand aus folgenden Einzelkomponenten:

**Kapillarelektrophoresegerät** *Crystal CE System 310* der Firma *ATI Unicam* (Kassel)

**Detektion:** A UV-Absorptionsdetektor *Spectra 100* der Firma *Spectra Physics*

**B** LIF-Detektor (konstruiert an der Universität Marburg) mit einem frequenzverdoppeltem Diodenlaser (*FDDL 452, Crystal GmbH, Berlin*) mit einem Photosensormodul (*H5783P-03; Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan*)

**Quarzkapillaren** der Firma *Polymicro Technologies* (Phoenix, AZ, USA) mit 75 µm oder 100 µm I. D. und 360 µm Außendurchmesser

**Software** *HPLCMONO* der Firma *Planum GmbH, Kirchhain*

**Messdatenauswertung** *Origin 6.1G* (Firma *Microcal*, Northampton, MA, USA).

### 11.3.3 Andere Systeme

**Ionenchromatographiesystem** *Compact IC 761* der Firma *Metrohm* (Herisau, Schweiz) mit Supressor, Leitfähigkeitsdetektor und Meßsoftware. Die Trennung erfolgte in einer Trennsäule (*Shodex 61504D*) mit den Abmessungen 4×150 mm.

**HPLC-System**, bestehend aus einer *Gynkotek 580* Pumpe, einem *Dionex ASI 100* Autoinjektor und einer Trennsäule (*Nucleosil 120-3 C18, 250×3 mm*) der Firma *CS-Chromatographie-Service, Langerwehe*. Die Detektion erfolgte photometrisch mit einem *Gynkotek 340S* UV-Detektor.

*UV-VIS Spektrophotometer 2400 UV-VIS* der Firma *Varian Cary*

*Diodenarray-Fluoreszenzspektrometer TIDAS (Typ FL3095)* der Firma *J&M Analytische Mess- und Regeltechnik GmbH* (Aalen) für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren

*Piccolo plus* Präzisions-pH-Meters mit einer Platinelektrode *H11295* der Firma *Hanna Instruments* (Kehl Am Rhein)

*Abbe Refraktometer* der Firma *Carl Zeiss* (Jena) für Brechungsindex-Messungen

*Ultraschallbad KLN* der Firma *Dr. Lehfelddt&Co*

*Messdatenauswertung* erfolgte mit Hilfe des Auswertungsprogramms *Origin 6.1G* (Firma *Microcal*, Northampton, MA, USA).

#### **11.4 Konditionierung der Trennkapillare vor der ersten und nach der letzten Messung**

Die Trennkapillare wurde jeden Tag vor der ersten Messung und nach der letzten Messung konditioniert. Je nach Bedarf wurden während der Meßreihen zusätzliche Spülschritte eingefügt. In den Tabellen 29 und 30 sind die Spülschritte aufgelistet.

*Tabelle 29: Konditionierung der Kapillare vor der ersten Messung*

<i>Schritt</i>	<i>Dauer [s]</i>	<i>Druck [mbar]</i>	<i>Spannung [kV]</i>	<i>Inhalt des Einlaßgefäßes</i>
1	900	1000	0	0,1 mmol L <sup>-1</sup> NaOH im Wasser
2	900	1000	0	Trennpuffer

*Tabelle 30: Konditionierung der Kapillare nach der letzten Messung*

<i>Schritt</i>	<i>Dauer [s]</i>	<i>Druck [mbar]</i>	<i>Spannung [kV]</i>	<i>Inhalt des Einlaßgefäßes</i>
1	900	1000	0	Milli-Q Wasser
2	900	1000	0	Luft (leeres Einlaßgefäß)

## Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meiner Betreuerin, Frau PD Dr. Ute Pyell für die hochinteressante Aufgabenstellung, innovative Ideen und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn Dr. Werner Faubel danke ich ebenfalls für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, die Diskussionsbereitschaft und die kompromißlose finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Seubert danke ich für seine Unterstützung bei der Analyse der Anionen-Realproben mittels Ionenaustauschchromatographie mit einem Leitfähigkeitsdetektor.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Steinbach für die Bereitstellung einer Realprobe, für die Durchführung der HPLC-Referenzanalyse bei der Bestimmung von Nitroaromaten sowie für wissenschaftliche Diskussionen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. M. Proskurnin für die Vermittlung der Grundlagen zum Verständnis thermooptischer Effekte, seine tatkräftige experimentelle Unterstützung bei TL-Messungen, seine kompromißlose Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima während seines Aufenthalts in Deutschland.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Herrn Dipl. Ingenieur M. Mensch für die Bereitstellung des Thermischen-Linse-Detektors, für die große Hilfe bei dessen Bedienung und für seine Hilfsbereitschaft.

Für die ständige Bereitschaft, bei der praktischen Durchführung der TL-Experimente sowie bei der Software-Bedienung zu helfen, möchte ich Herrn St. Heissler ganz herzlich danken.

Frau N. Schmidt danke ich für die Analyse der Anionen-Realproben mittels Ionenaustauschchromatographie mit einem Leitfähigkeitsdetektor.

Für die Herstellung der beschichteten Kapillaren bei der indirekten Bestimmung von Anionen möchte ich Frau A. Wahl sowie Herrn A. El-Hamdan danken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Kernchemie, die ein angenehmes Arbeitsklima geschaffen haben. Namentlich erwähnen möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn S. Ritzel, Herrn Dr. A. Rother, Frau C. Huhn sowie Herrn S. Happel. Darüber hinaus danke ich allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Kernchemie, die zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Instrumentelle Analytik (Forschungszentrum Karlsruhe) für das angenehme Arbeiten sowie für die angeregten Unterhaltungen beim Mittagessen in der Betriebskantine.

Für die angenehme und abwechslungsreiche Zeit bei Dienstreisen möchte ich ganz herzlich Frau S. Bendrysheva, Frau A. Wahl sowie Frau C. Huhn danken. Außerdem möchte ich mich bei Frau S. Bendrysheva für die freundliche Unterstützung während der Laborarbeit im Forschungszentrum Karlsruhe bedanken.

Meinen Eltern möchte ich für die ständige Motivation und kompromißlose moralische und finanzielle Unterstützung danken, ohne welche diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Michael Pütz (Hase) danke ich besonders herzlich für die vielen temperamentvollen wissenschaftlichen Diskussionen bei der Durchführung der Arbeit, wertvolle Hilfe beim Zusammenschreiben, ständige Bereitschaft zu Helfen sowie für die Wegbegleitung weit über diese Arbeit hinaus.

Ich möchte auch den hier namentlich nicht genannten Personen danken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.