

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5678

Kapillarzonelektrophorese mit direkter und indirekter UV-Detektion

W. Bühler, W. Faubel, H. J. Ache

Institut für Radiochemie
Projekt Mikrosystemtechnik

Dezember 1995

**Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5678**

**KAPILLARZONENELEKTROPHORESE MIT
DIREKTER UND INDIREKTER UV-DETEKTION**

W. Bühler, W. Faubel und H.J. Ache

**Institut für Radiochemie
Projekt Mikrosystemtechnik**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1995**

Zusammenfassung

Kapillarzonenelektrophorese mit direkter und indirekter UV-Detektion

Diese Arbeit beschreibt den experimentellen Aufbau, die Optimierung und die Resultate der Anwendung der Kapillarelektrophorese (CE) als analytische Trennmethode unter Verwendung eines Absorptionsdetektors im ultravioletten Wellenlängenbereich. Anhand von zwei prinzipiell unterschiedlichen Detektionsverfahren - direkte und indirekte UV-Detektion - wurden am Beispiel von Vitaminen und anorganischen Anionen die Einsatzmöglichkeiten der CE gezeigt.

Als Beispiel für die direkte Absorption wurde eine Trennung der wasserlöslichen Vitamine Thiaminhydrochlorid, Nicotinamid und Nicotinsäure in einer mit 20 mmol Phosphatpuffer pH 7 gefüllten Kapillare mit 50 μm Durchmesser gewählt. Die Probenaufgabe erfolgte elektrokinetisch. Da die verwendeten Vitamine bei einer Wellenlänge von 215 nm eine sehr hohe Absorption haben, konnten sie mit der direkten UV-Detektion kathodenseitig nachgewiesen werden. Die relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten betragen: Thiaminhydrochlorid 1,12%, Nicotinamid 3,21% und Nicotinsäure 9,50%. Aus den Migrationszeiten ergaben sich die Mobilitäten und die aufgegebenen Probemengen. Die relativen Standardabweichungen der aufgegebenen Probemengen lagen für alle drei Vitamine unter 6,2 %.

Bei der quantitativen Analyse der Vitamine ergaben sich wegen des kurzen Absorptionsweges in der verwendeten 50 μm Kapillare nur geringe Nachweisgrenzen: Thiaminhydrochlorid 404 $\mu\text{g/l}$, Nicotinamid 97 $\mu\text{g/l}$ und Nicotinsäure 616 $\mu\text{g/l}$.

In einer zweiten Trennung wurden die 8 anorganischen Anionen Bromid, Chlorid, Sulfat, Nitrit, Nitrat, Fluorid, Hydrogenphosphat und Hydrogencarbonat nach dem Prinzip der indirekten UV-Detektion untersucht. Dabei kam ein Chromathintergrundelektrolyt pH 8,05 mit einer sehr hohen UV-Absorption in einer 75 μm Kapillare zum Einsatz. Um die schnellen und langsamen Anionen gleichzeitig erfassen zu können, wurde der Hintergrundelektrolyt mit einem kationischen Tensid versetzt. Die Detektion erfolgte anodenseitig bei 254 nm. Die relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten fast aller Anionen lagen unter 2,35%. Eine Ausnahme bildete lediglich das Hydrogencarbonat mit einer Standardabweichung von 7,09%.

Die quantitative Analyse der Anionen ergab folgende Nachweisgrenzen: Bromid 63 $\mu\text{g/l}$, Chlorid 80 $\mu\text{g/l}$, Sulfat 25 $\mu\text{g/l}$, Nitrit 20 $\mu\text{g/l}$, Nitrat 8 $\mu\text{g/l}$, Fluorid 13 $\mu\text{g/l}$, Hydrogenphosphat 100 $\mu\text{g/l}$ und Hydrogencarbonat 80 $\mu\text{g/l}$.

Summary

Capillary electrophoresis with direct and indirect UV detection

This paper describes the experimental set up and the results of the application of capillary electrophoresis as a modern analytical separation technique. Two different experimental procedures were used for these purpose: The direct UV detection of vitamins and the indirect UV detection of inorganic anions.

As an example for the direct absorption technique, the separation of the water soluble vitamins, has been performed with a 50 μm inner diameter capillary using 20 mmol phosphate buffer at pH 7. The vitamins samples were introduced by electromigration to the capillary and detected by direct UV-detection at a 215 nm wavelength. The rms-values of the migration times were determined as follows: thiamine hydro chloride 1.12%, nicotinic acid amide 3.21% and nicotinic acid 9.50%. The rms values for the introduced amounts of samples show to be lower than 6.2% for all 3 vitamins.

The limit of detections (LOD) for three vitamins were: thiamine hydrochloride 404 $\mu\text{g/l}$, nicotinic acid amide 97 $\mu\text{g/l}$ and nicotinic acid 616 $\mu\text{g/l}$ using a 50 μm diameter capillary.

According to the principal of indirect absorption, the 8 inorganic anions, bromide, chloride, sulfate, nitrite, nitrate, fluoride, hydrophosphate and hydrocarbonate acid have been separated in a second separation procedure by using a UV background providing compound (chromate pH 8.05) in a 75 μm inner diameter capillary. Furthermore a cationic tenside has been added to the buffer solution to improve the detection scheme for anions of different migration speeds. The detection wavelength was 254 nm at the anode. The rms values obtained for the migration times were below 2.35%, except for hydrocarbonate acid with a rms value of 7.09.

The limit of detections of the quantitative analysis of the anions separation were as follows: bromide 63 $\mu\text{g/l}$, chloride 80 $\mu\text{g/l}$, sulfate 25 $\mu\text{g/l}$, nitrite 20 $\mu\text{g/l}$, nitrate 8 $\mu\text{g/l}$, fluoride 13 $\mu\text{g/l}$, hydrophosphate 100 $\mu\text{g/l}$ and hydrocarbonate acid 80 $\mu\text{g/l}$.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	3
2.1	Aufbau eines CE Gerätes	3
2.2	Elektrophorese und elektrophoretische Mobilität	4
2.3	Elektroosmose und elektroosmotischer Fluß (EOF)	5
2.3.1	Qualitative Beschreibung des Phänomens	5
2.3.2	Das elektroosmotische Strömungsprofil	8
2.4	Elektrophoretische Trennung	9
2.4.1	Trenneffizienz	10
2.5	Quantitative Analyse in der CE	14
2.5.1	Nachweisgrenzen	14
3	Experimenteller Teil	15
3.1	Beschreibung der CE- Apparatur	15
3.2	Probenaufgabe	18
3.3	Trennkapillaren	19
3.3.1	Strom-Spannungskurven	21
3.3.2	Detektion	23
3.3.3	EOF / pH-Charakteristik der FS-Kapillaren	24
3.4	Trennung von wasserlöslichen Vitaminen	28
3.4.1	Durchführung der Trennung	30
3.4.2	Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und der aufgegebenen Probenmengen	32
3.4.3	Parametervariation bei der elektrokinetischen Probenaufgabe	34
3.4.4	Quantitative Analyse der Vitamine	37
3.4.5	Abhängigkeit der Trenneffizienz von der Ionenstärke des Puffers	39

3.5 Trennung von anorganischen Anionen	41
3.5.1 Indirekte UV-Detektion.....	41
3.5.2 Durchführung der Anionentrennung.....	43
3.5.3 Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und deren Abhängigkeit von der Konzentration des Hintergrundelektrolyten	45
3.5.4 Quantitative Analyse der Anionen.....	47
3.6 Vergleich quantitativer Bestimmungen mit Referenzanalytikmethoden	51
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	54
5 Literaturverzeichnis	57

1 Einleitung

Die grundlegenden Erkenntnisse zur Kapillarelektrophorese (CE) wurden bereits zu Beginn unseres Jahrhunderts erarbeitet und gehen unter anderem auf Arbeiten von Kendall, Hardy und Tiselius zurück [1], [2], [3].

Die erste elektrophoretische Trennung führte Tiselius [4], [5], [6] in den dreißiger Jahren durch. Eine effiziente elektrophoretische Trennung von komplexen Analytgemischen in diskrete Zonen war in freier Lösung jedoch nicht möglich.

Das Hauptproblem der frühen Formen der trägerfreien Elektrophorese stellte die freiwerdende Joulesche Wärme und die daraus resultierende Konvektionsströmung dar. Um die damit verbundenen Verluste auf ein Minimum zu reduzieren, wurden schon frühzeitig Trägermaterialien wie Papier, Polyacrylamid, Agarose, etc. eingesetzt. Dies hatte jedoch verlängerte Trennzeiten, sowie eine erschwerte quantitative Detektion des Systems zur Folge [7].

Die Papierelektrophorese erfuhr besonders durch die Arbeiten von T. Wieland und E. Fischer seit 1950 einen großen Aufschwung [8].

Die ersten elektrophoretischen Trennungen in freier Lösung, bei gleichzeitiger Unterdrückung der Konvektion, wurden von Hjertén im Jahre 1958 in einem um seine Achse rotierenden Quarzrohr durchgeführt [9]. Durch die Ausnutzung der Zentrifugalkräfte bei der Rotation des Rohres (Innendurchmesser 1-3mm) um seine Längsachse gelang es, den konvektionsbestimmenden Dichtegradienten durch einen radialen Dichtegradienten zu überlagern. Diese Methode konnte sich jedoch wegen des hohen instrumentellen Aufwandes nicht durchsetzen.

Viele der durch die Joulesche Wärme verursachten Probleme können durch die Verwendung von sehr dünnen Kapillaren vermieden werden. Das günstige Oberflächen-Volumen-Verhältnis ermöglicht eine rasche Abführung der Jouleschen Wärme. Die Verwendung von Glaskapillaren wurde bereits im Jahre 1967 von Hjertén [10] vorgeschlagen. Erste elektrophoretische Trennungen mit Glas- [11] oder Teflonkapillaren [12] von 200-500 μm Innendurchmesser waren in den 70er Jahren erfolgreich. Anfang der 80er Jahre wurden von Jorgenson und Lukacs Quarzkapillaren mit weiter reduziertem Innendurchmesser eingeführt [13], [14]. Hocheffiziente Trennungen von Proteinen und Dansylaminosäuren wurden vorgestellt, die allgemein als der Beginn der modernen Kapillarelektrophorese anzusehen sind. Mit ihren Arbeiten demonstrierten sie die Leistungsfähigkeit der modernen Kapillarzonenelektrophorese (CZE).

Heute stellt die CZE eine Technik mit hoher Trenneffizienz und kurzen Analysenzeiten dar. Anfangs nur im biochemischen Bereich zur Trennung von Proteinen und Aminosäuren eingesetzt, reicht heute ihr Anwendungsspektrum von anorganischen Ionen bis zu Viren und Bakterien [15], [16].

In der vorliegenden Diplomarbeit soll ein System für die Kapillarelektrophorese aufgebaut und charakterisiert werden. Ausgewählte Trennungen mit der Kapillarzonenelektrophorese sollen durchgeführt, sowie die Nachweisgrenzen der einzelnen Substanzen ermittelt werden.

Als Detektionsverfahren dienen die direkte und die indirekte UV-Detektion.

Ziel der Arbeit ist es, die Funktionsweise des Systems zu erfassen, um in einer nachfolgenden Dissertation auf dieser Grundlage die thermische Linse als Detektionsverfahren mit einer verbesserten Nachweisgrenze einsetzen zu können.

2 Grundlagen der Kapillaronenelektrophorese (CZE)

Die Grundlagen der Kapillaronenelektrophorese sind kürzlich in der Literatur von H. Engelhardt, W. Beck und T. Schmitt ausführlich diskutiert worden [17]. Im folgenden sollen die für diese Arbeit wesentlichen Aspekte dargestellt werden.

2.1 Aufbau eines CE Gerätes

Der Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abbildung (1) gezeigt. Eine mit Polyimid ummantelte dünne Quarzkapillare (fused silica) mit einem Innendurchmesser zwischen 50-100 μm und einer Länge von 20 cm bis 100 cm taucht gemeinsam mit den Elektroden jeweils in ein mit Elektrolytlösung gefülltes Gefäß ein.

Zwischen den beiden Elektroden wird eine Gleichspannung von bis zu etwa 30 kV angelegt. Die Probenaufgabe erfolgt üblicherweise am Hochspannungsende der elektrolytgefüllten Kapillare. Am anderen Ende können die getrennten Analyten durch Absorptionsdetektion mit UV/VIS-Licht, bzw. Fluoreszenz im Durchstrahlverfahren, in-line detektiert werden. Dabei stellt ein Kapillarsäulensegment die Detektorzelle dar.

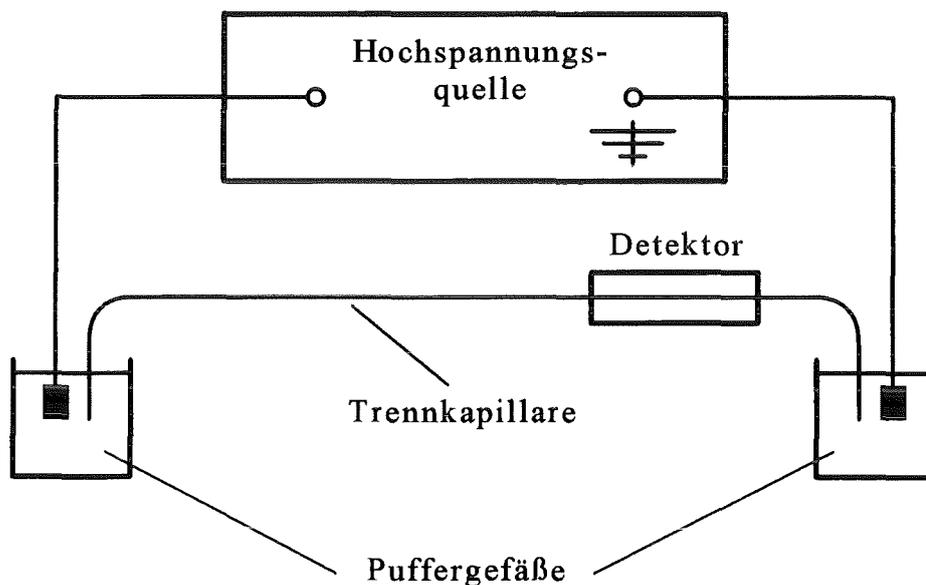


Abbildung (1): Prinzipieller Aufbau einer CE-Apparatur

Die Kapillaronenelektrophorese (CZE) stellt das am häufigsten verwendete Verfahren in der Kapillarelektrophorese dar. Der Puffer bzw. Elektrolyt erzeugt ein konstantes elektrisches Feld entlang der Trennachse. Die Ionen wandern mit einer konstanten Geschwindigkeit durch die Kapillare und bilden, wenn sie eine unterschiedliche Mobilität besitzen, verschiedene Zonen [18].

Neben der Kapillarzonen-**elektrophorese** werden auch die folgenden Trenntechniken zu den Methoden der Kapillarelektrophorese gezählt:

- Kapillargelelektrophorese (CGE)
- Micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)
- Isotachophorese (ITP)
- Isoelektrische Fokussierung (IEF)

2.2 Elektrophorese und elektrophoretische Mobilität

Elektrophoretische Trennungen sind nur möglich, wenn die Analyten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit im elektrischen Feld wandern. Die Wanderung der Probenmoleküle erfolgt durch Elektrophorese und / oder Elektroosmose [19].

Geladene Probenmoleküle werden im elektrischen Feld durch die Kraft F_{ep} beschleunigt:

$$F_{ep} = z \cdot e_0 \cdot E \quad (1)$$

F_{ep} : Kraft auf eine Ladung im elektrischen Feld ;
 E : elektrische Feldstärke; e_0 : Elementarladung
 z : Ladungszahl

Gleichzeitig wirkt die Stokessche Reibungskraft, durch die die migrierenden Ionen abgebremst werden. Die Geschwindigkeit der wandernden Ionen wächst so lange an, bis sich die elektrophoretische Kraft im Gleichgewicht zu der entgegengesetzt gerichteten Reibungskraft befindet.

Für kugelförmige Analyten gilt:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_A \cdot v_{ep} \quad (2)$$

F_R : Stokessche Reibungskraft; η : dynamische Viskosität der Lösung,
 v_{ep} : elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit ;
 r_A : Radius des Analyten

Im Gleichgewicht ergibt sich aus Gleichung (1) und (2):

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad \text{mit} \quad \mu_{ep} = \frac{z \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_A} \quad (3)$$

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} ist folglich proportional zur elektrischen Feldstärke. Die Proportionalitätskonstante μ_{ep} wird als elektrophoretische Mobilität oder auch Ionenbeweglichkeit des Analyten bezeichnet.

Die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} ist durch die Größe der Ladung und die Geometrie des Analyten gegeben. Außerdem hängt sie von der dynamischen Viskosität des Puffers ab.

Durch Gleichung (3) werden die elektrophoretischen Mobilitäten starrer sphärischer Ionen in unendlich verdünnten Lösungen beschrieben [20].

Der Einfluß der Gegenionen, die sich um ein Ion anordnen, wird bei dieser einfachen Betrachtungsweise nicht berücksichtigt.

In einer realen Elektrolytlösung wirken auf den Analyten während der Migration neben der elektrophoretischen Triebkraft F_{ep} und der Stokesschen Reibungskraft F_R die elektrostatische Bremskraft F_{Rel} der unsymmetrischen Ladungswolke und die Kraft der Gegenströmung der Elektrolytlösung F_L . Dennoch ermöglicht Gleichung (3) eine Abschätzung der elektrophoretischen Mobilitäten, wenn bei gegebenem pH-Wert die Gesamtladung und der Stokessche Radius r_A des Analyten bekannt sind.

2.3 Elektroosmose und elektroosmotischer Fluß (EOF)

2.3.1 Qualitative Beschreibung des Phänomens

Unter Elektroosmose versteht man die Migration von Elektrolyten durch Kapillaren oder Membranen im elektrischen Feld.

Verantwortlich für den elektroosmotischen Fluß ist nach einem Modell von Helmholtz und Stern [20] die Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Phasengrenze der Elektrolytlösung.

Durch Dissoziation der Silanolgruppen auf der Kapillareninnenoberfläche entstehen negative Oberflächenladungen, so daß sich hydratisierte Kationen aus der Pufferphase dort anordnen, um die Ladungen zu kompensieren.

Die erste monomolekulare Schicht ist fest an die Oberfläche adsorbiert und unterliegt keinen thermisch bedingten Sorptions- und Desorptionsprozessen. Aufgrund der großen hydrodynamischen Kationenradien können aus Platzgründen nicht alle Oberflächenladungen direkt an der Phasengrenzfläche kompensiert werden. Deshalb folgt auf die fixierte Schicht eine weitere Schicht aus Gegenionen. Da die Coulombwechselwirkungen mit zunehmendem Abstand von der Phasengrenze schwächer werden, handelt es sich hierbei um eine bewegliche und diffuse Schicht.

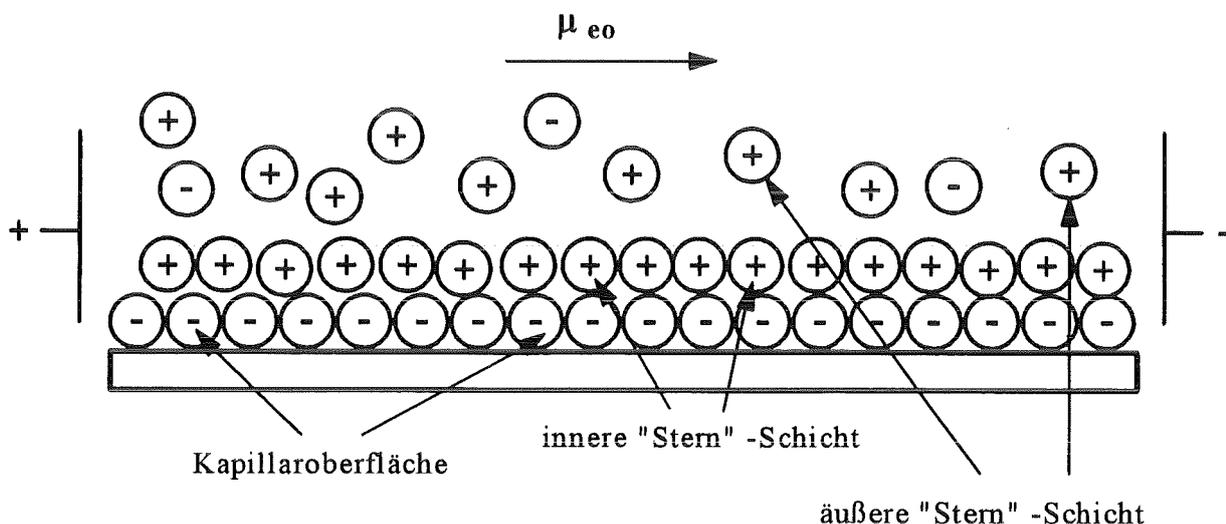


Abbildung (2): Modell einer Fused Silica/Puffer Grenzfläche

Der Potentialverlauf in der starren und diffusen Doppelschicht kann aus der Poissonschen Gleichung der Elektrostatik hergeleitet werden. Diese beschreibt das Potential Ψ als Funktion der Raumladungsdichte [21], [22]. In Abbildung (3) ist der Potentialverlauf mit zunehmender Entfernung von der Kapillarwand dargestellt.

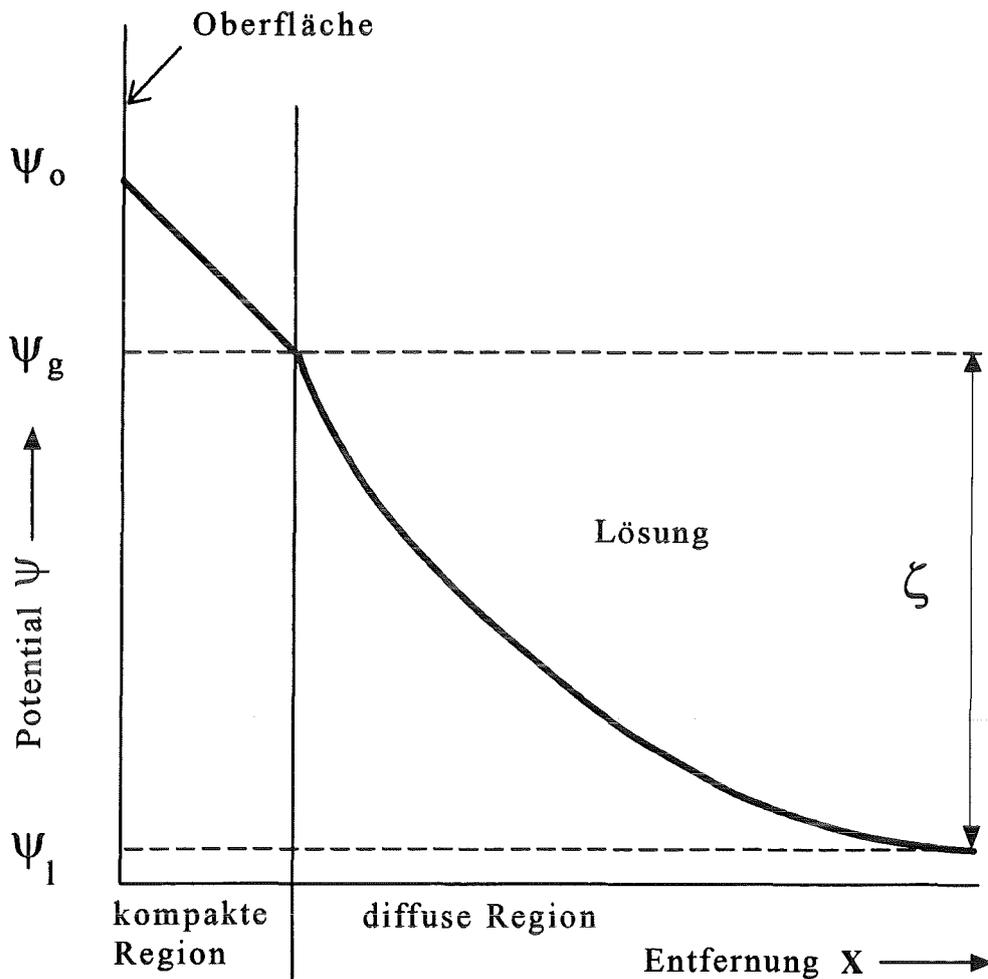


Abbildung (3): Potentialverlauf mit zunehmender Entfernung von der Kapillarwand

Im Bereich der starren Grenzschicht nimmt das Oberflächenpotential Ψ_0 bis zum Grenzflächenpotential Ψ_g linear ab. In der diffusen Grenzschicht liegt dagegen eine exponentielle Potentialabnahme vor. Der exponentielle Potentialabfall in der diffusen Region ist die Ursache der Elektroosmose und entspricht dem ζ -Potential dieser Phasengrenze.

Wird ein elektrisches Feld an eine mit einem Elektrolyt gefüllte Kapillare angelegt, so wandern die solvatisierten Kationen in der diffusen Schicht kollektiv zur Kathode und bewegen so infolge der inneren Reibung die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit sich. Als Konsequenz entsteht ein kathodischer Elektroosmotischer Fluß (EOF), der auch ungeladene Analyten transportiert.

Die elektroosmotische Wanderungsgeschwindigkeit v_{eo} des EOF kann vereinfacht mit Hilfe der Helmholtz-Gleichung beschrieben werden:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E \quad \text{mit} \quad \mu_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (4)$$

v_{eo} : Wanderungsgeschwindigkeit des EOF; μ_{eo} : elektroosmotische Mobilität;

ε : Dielektrizitätskonstante der Lösung; ζ : Zeta - Potential;

η : dynamische Viskosität der Lösung;

E : elektrische Feldstärke

2.3.2 Das elektroosmotische Strömungsprofil

Im Gegensatz zu dem laminaren Strömungsprofil des hydrodynamischen Flusses, wie es z.B. in der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie HPLC vorliegt, zeichnet sich die Strömung des EOF durch ein nahezu stempelförmiges Profil aus.

Aufgrund dieses günstigen Strömungsverhaltens führt der EOF kaum zu einer Verschlechterung der Trenneffizienz durch eine Verbreiterung der Trennzonen.

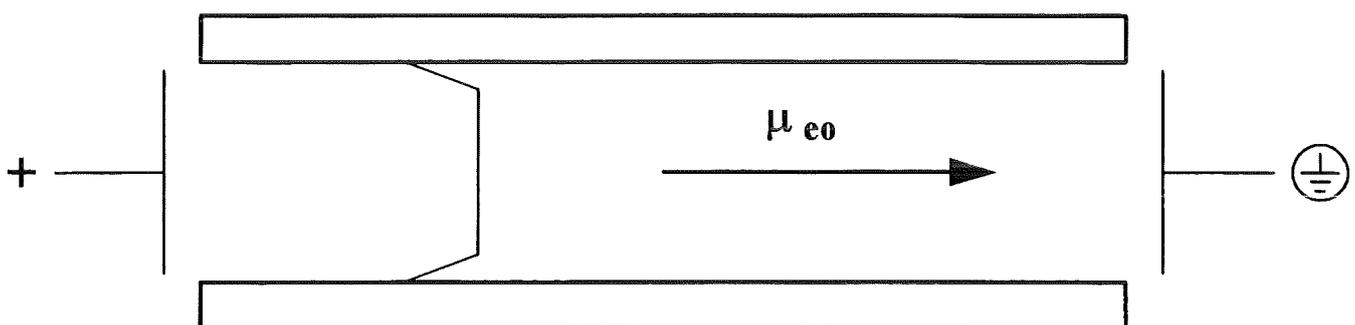


Abbildung (4): Elektroosmotisches Strömungsprofil

Ein stempelförmiges Strömungsprofil bildet sich aus, wenn

- der Kapillarradius ca. 7 mal größer ist als die Dicke der Doppelschicht [23]
- kein zusätzlicher hydrodynamischer Fluß erzeugt wird, d. h., beide Kapillarenden sich auf der gleichen Höhe befinden und kein Druckunterschied zwischen den Kapillarenden vorhanden ist, weil sich sonst das Hagen- Poisseuillesche Strömungsprofil ergibt.
- radiale Temperaturgradienten senkrecht zur Migrationsrichtung verhindert werden.

2.4 Elektrophoretische Trennung

Die effektive Mobilität μ_{eff} des Analyten ergibt sich additiv aus seiner elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} und der Mobilität des EOF μ_{eo} :

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}} = \frac{l_{\text{eff}} L}{t U} \quad (5)$$

μ_{eff} : effektive elektrophoretische Mobilität ;

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität ;

μ_{eo} : elektroosmotische Mobilität ;

l_{eff} : effektive Kapillarlänge bis zum Detektor ;

L: Gesamtlänge der Kapillare ;

t: Migrationszeit ;

U: Spannung

Analog zu den Gleichungen (3) und (4) resultiert für die Migrationsgeschwindigkeit v_{eff} eines Analytmoleküls:

$$v_{\text{eff}} = \mu_{\text{eff}} E = v_{\text{ep}} + v_{\text{eo}} \quad (6)$$

v_{eff} : Migrationsgeschwindigkeit des Analyten;

E : elektrische Feldstärke;

v_{ep} : elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit;

v_{eo} : Wanderungsgeschwindigkeit des EOF;

Aus Gleichung (6) folgt, daß es von der Größe und dem Vorzeichen der beiden Einzelmobilitäten (μ_{ep} und μ_{eo}) abhängt, ob der Analyt zur Kathode oder zur Anode wandert.

Die ungeladenen Analytmoleküle werden nur durch den elektroosmotischen Fluß μ_{eo} transportiert.

Die Trennung der Ionen beruht auf einer unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle.

Alle Moleküle wandern in die gleiche Richtung, wenn die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses höher ist als die elektrophoretische Geschwindigkeit der Analytmoleküle im Puffer.

2.4.1 Trenneffizienz

In der Kapillarzonenelektrophorese führen eine Reihe von Faktoren zur Verbreiterung der bei der Probenaufgabe noch schmalen Substanzzonen, so daß man gaußförmige Konzentrationsverteilungen erhält [24].

Wird die Probe in einer sehr schmalen Zone in die Kapillare eingebracht, und trägt im Idealfall die Axialdiffusion als einziger Faktor zur Bandenverbreiterung bei, so nimmt die Breite der Konzentrationsverteilung der Analytzone mit der Zeit t nach der Einsteinschen Gleichung zu.

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2D l_{\text{eff}} L}{\mu_{\text{eff}} U} \quad (7)$$

σ : Standardabweichung des gaußförmigen Peaks durch Axialdiffusion;

D : Diffusionskoeffizient des Analyten im Puffer;

t : Migrationszeit

Im Realfall existieren neben der Axialdiffusion noch andere Effekte, die zur Bandenverbreiterung beitragen.

Die Gesamtzonenverbreiterung σ^2_{tot} ergibt sich additiv aus den Einzelbeiträgen:

$$\sigma^2_{\text{tot}} = \sigma^2_{\text{Kap}} + \sigma^2_{\text{Kopp}} + \sigma^2_{\text{Det}} + \sigma^2_{\text{Ads}} + \sigma^2_{\text{PA}} + \sigma^2_{\Delta T} + \sigma^2_{\text{Siph}} + \sigma^2_{\Delta\mu} \quad (8)$$

σ^2_{tot} : gesamte Zonenverbreiterung; σ^2_{Kap} : Beiträge durch die Kapillare ;

σ^2_{Kopp} : Kapillarkopplung ; σ^2_{Det} : Detektorbeitrag; σ^2_{Ads} : adsorptive Beiträge;

σ^2_{PA} : Probenaufgabe; $\sigma^2_{\Delta T}$: Bandenverbreiterung durch Thermokonvektion ;

σ^2_{Siph} : Zonenverbreiterung durch hydrodynamischen Fluß in der Kapillare ;

$\sigma^2_{\Delta\mu}$: Bandenverbreiterung durch Mobilitätsdifferenz von Probenion und Pufferion

Im folgenden werden die Beiträge zur Zonenverbreiterung bei der Kapillarzonenelektrophorese diskutiert, die im Rahmen dieser Arbeit am wichtigsten sind.

Nach Gleichung (9) ist die durch die elektrische Leistung erzeugte Wärme unter anderem von der spezifischen Leitfähigkeit und dem Kapillarinnendurchmesser abhängig.

$$P = UI = RI^2 = U^2 d^2 \frac{\pi \kappa}{2L} \quad (9)$$

P: Leistung;

d: Kapillarinnendurchmesser;

κ : spezifische Leitfähigkeit des Puffers ;

L: Gesamtlänge der Kapillare

Eine Bandenverbreiterung durch Thermokonvektion $\sigma^2_{\Delta T}$ kann vermindert werden, wenn Trennungen in Kapillaren geringen Innendurchmessers durchgeführt werden. Außerdem kann durch die Pufferzusammensetzung Einfluß auf den Widerstand der Kapillarfüllung und damit auf die Entstehung der Jouleschen Wärme genommen werden. Durch eine Kapillarkühlung wird die Aufheizung des Systems wirkungsvoll reduziert. Solange das Ohmsche Gesetz gilt, sind die Auswirkungen der Temperatureffekte auf die Bandenverbreiterung im allgemeinen zu vernachlässigen.

Befinden sich die Puffergefäße am Anfang und am Ende der Kapillare nicht auf gleichem Flüssigkeitsniveau, so resultiert eine Flüssigkeitsströmung in der Kapillare, die ein parabolisches Strömungsprofil aufweist und zu einer zusätzlichen Dispersion der Zonen führt ($\sigma^2_{\text{Siphoning}}$).

Wenn eine Mobilitätsdifferenz von Probenion und Pufferion vorliegt, ist die Symmetrie einer Zone generell asymmetrisch [12].

Ist die Leitfähigkeit der Analytzone geringer als die des Elektrolyten, so konzentrieren sich die Analyten aufgrund der höheren Feldstärke an der Front der Analytzone auf und es entstehen Peaks mit Leading (Abb. 5 (A)). Dieser Effekt wird bei der Probenaufgabe ausgenutzt, um die Analytzone durch das sogenannte "stacking" zu fokussieren und damit die Detektionsempfindlichkeit bei der UV-Detektion zu erhöhen. Wenn die Leitfähigkeit der Analytzone höher ist als die des ihn umgebenden Elektrolyten, erfolgt eine Störung der Symmetrie in umgekehrter Weise und man erhält Peaks mit Tailing (Abb. 5 (C)). Haben die Analytzone und der Elektrolyt die gleiche Leitfähigkeit entstehen symmetrische Peaks (Abb. 5 (B)).

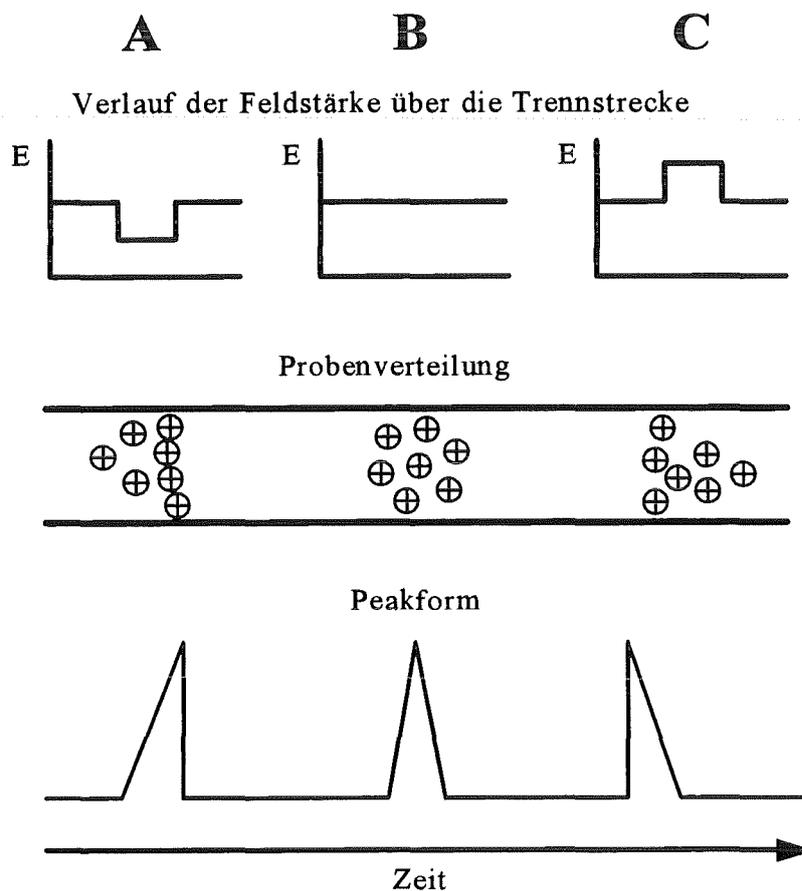


Abbildung (5): Verlauf der Feldstärke der Probenverteilung und der Peakform in der Probenzone

Die Trenneffizienz in der Kapillarelektrophorese kann wie in der Chromatographie mit dem Konzept der theoretischen Bodenzahl beschrieben werden: [13], [14]. Die theoretische Bodenzahl ergibt sich nach Gleichung (10):

$$N = \frac{l_{\text{eff}}^2}{\sigma^2} \quad (10)$$

N : theoretische Bodenzahl;
 l_{eff} : effektive Trennstrecke;
 σ^2 : Peakvarianz ;

Die Größenordnungen der maximalen theoretischen Bodenzahlen liegen in einem Bereich von 10^5 bis 10^6 theoretische Böden N pro Meter.

Wenn man davon ausgeht, daß die Axialdiffusion den einzigen Beitrag zur Bandenverbreiterung leistet, wird die Auflösung R zweier nahe zusammen wandernder Peaks durch Gleichung (11) beschrieben [25].

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \frac{\Delta v_{\text{eff}}}{\bar{v}_{\text{eff}}} \quad (11)$$

R : Auflösung;
 N : Mittlere Anzahl der theoretischen Böden ;
 Δv_{eff} : Differenz der Zonengeschwindigkeiten ;
 \bar{v}_{eff} : mittlere Zonengeschwindigkeit

Die Auflösung in der Kapillarzonenelektrophorese kann durch eine Variation des EOF beeinflusst werden. Die beste Auflösung wird erreicht, wenn die mittlere Zonengeschwindigkeit durch die entgegengesetzte Elektroosmose fast vollständig kompensiert wird. Dies führt jedoch zu sehr langen Analysenzeiten.

Daher resultiert aus einem kathodengerichteten EOF stets eine bessere Auflösung für anionische Analyten, während für kationische Analyten unter diesen Bedingungen schlechtere Auflösungen erzielt werden. Bei einem anodengerichteten EOF liegen die entsprechend inversen Verhältnisse vor.

Unter idealen Bedingungen (keine Adsorption der Analyten an die Kapillarwand) kann mit zunehmender Kapillarlänge bei gleichbleibender Feldstärke ebenfalls eine Auflösungsverbesserung erzielt werden.

2.5 Quantitative Analyse in der CE

Bedingt durch Mobilitätsdifferenzen, bzw. Leitfähigkeitsunterschiede zwischen dem Trennpuffer und den Analyten, erhält man in der CE meist asymmetrische Peaks. Nur bei gaußförmigen Peaks ist die Konzentration sowohl zur Peakfläche, als auch zur Peakhöhe proportional. Um in der CE lineare Konzentrationsreihen zu erhalten, ist es deshalb erforderlich, die Peakflächenintegration der Höhenauswertung vorzuziehen.

2.5.1 Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenze C_{Min} berechnet sich aus dem kleinsten Meßwert X_{Min} , der sich mit definierter Sicherheit detektieren läßt, und der Empfindlichkeit S [26].

$$C_{\text{Min}} = \frac{X_{\text{Min}}}{S}$$

$$X_{\text{Min}} = \bar{X}_B + K\sigma_B \quad \text{mit} \quad \sigma_B = \sqrt{\frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X}_B)^2} \quad (12)$$

S : Empfindlichkeit der Messung; \bar{X}_B : Mittelwert der Extinktionsblindmessung;
 K : Meßwertsicherheitsfaktor; σ_B : Standardabweichung der Blindmessung;
 m : Anzahl der Meßpunkte; X_i : Meßwert

Die Empfindlichkeit S entspricht der Steigung des linearen Teils der Extinktions-Konzentrationskurve. Zur Ermittlung des Mittelwertes \bar{X}_B des Grundlinienrauschens und der Standardabweichung σ_B , werden mindestens 20 Blindmessungen durchgeführt.

Der kleinste Meßwert X_{Min} , hat einen Abstand vom Mittelwert, der K -mal so groß ist wie die Standardabweichung σ_B .

Nach Kaiser [27] wird für K oft ein Wert von 3 eingesetzt, der im Falle einer Gaußverteilung der Meßwerte der Blindmessungen zu einem Vertrauensintervall von 99,6% führt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Beschreibung der CE- Apparatur

Alle Experimente wurden mit einem in Eigenbau erstellten CE-Gerät, welches in den Abbildungen (6) bis (8) dargestellt ist, durchgeführt. Eine schematische Darstellung ist der Abbildung (1) zu entnehmen (Seite 3).

Das Gerät besteht aus zwei Puffergefäßen, in die die Enden der Kapillare und die Platinelektroden eintauchen, einer Hochspannungsquelle, einem UV-Detektor und einem Computersystem für die Aufnahme der Elektropherogramme.

Als Puffergefäße dienen 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße. Die Einführung der Elektrode und der Kapillare in das Puffergefäß erfolgt durch zwei Bohrungen in einem PVC-Deckel. Um Überschlüge zu vermeiden, sind die Elektroden an zwei PVC-Sockeln fixiert.

Speziell für die Verwendung von kürzeren Kapillaren ist der Detektor im Elektrodenbereich mit einer Isolationsfolie ("Grappafolie") überzogen, die sich durch eine besonders hohe Durchschlagfestigkeit auszeichnet. Die Elektrode auf der Hochspannungsseite ist mit einer Hochspannungsquelle, die eine Maximalspannung von (\pm) 30 kV liefert, verbunden. Sowohl das 6267B DC Power Supply, als auch der Hochspannungsgenerator stammen von Hewlett Packard (Waldbronn). Die Elektrode ist auf der Detektorseite geerdet (außer bei den Anionentrennungen).

Die in-line Detektion erfolgt über einen UV-Detektor Linear UVIS 200 (TSP Darmstadt) mit variabler Wellenlängeneinstellung. In der Detektionszelle kann das UV-Licht durch eine eingebaute Kugellinse optimal auf die Kapillare fokussiert werden (siehe 3.3.2).

Die Elektropherogramme werden mit Software der Firma GynkoSoft (Germering) aufgenommen und ausgewertet. Die computergestützte Elektropherogrammauswertung erlaubt die Bestimmung der Migrationszeiten, der Peakflächen, der Auflösungen und der theoretischen Bodenzahlen.

Für Spül- und Konditionierungsvorgänge wird eine Spritzenpumpe von Orion Research eingesetzt.

Mit der so aufgebauten Apparatur können im Rahmen dieser Arbeit nur elektrokinetische Probenaufgaben reproduzierbar erfolgen (siehe 3.4.1, 3.5.2). Durch den Einsatz eines Schrittmotors besteht jedoch in einer nachfolgenden Arbeit die Möglichkeit, zusätzlich eine hydrodynamische Probenaufgabe anzuwenden.

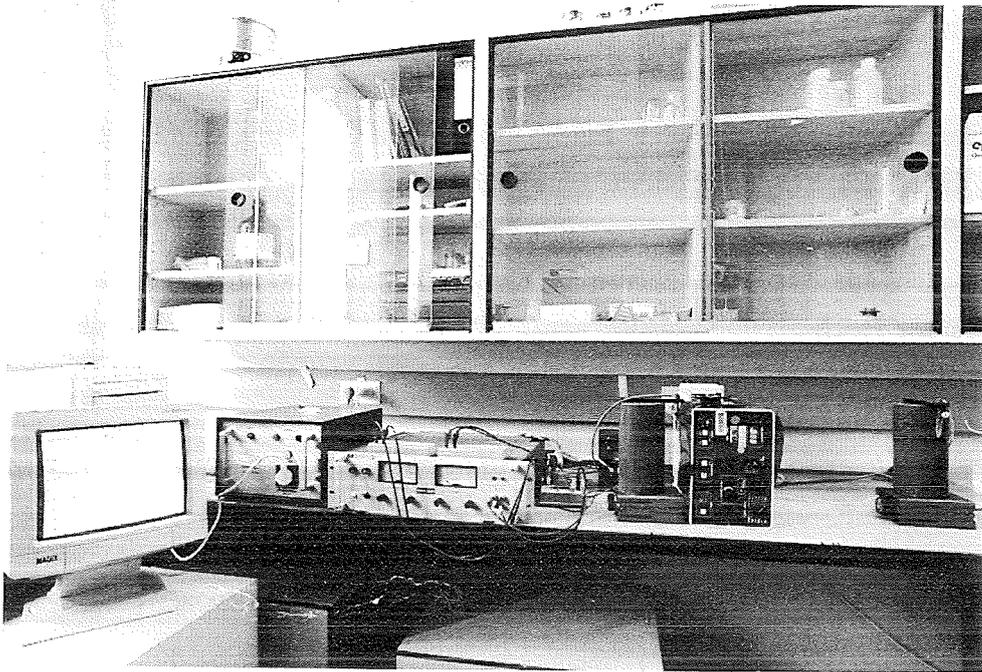


Abbildung (6): Gesamtansicht der Apparatur

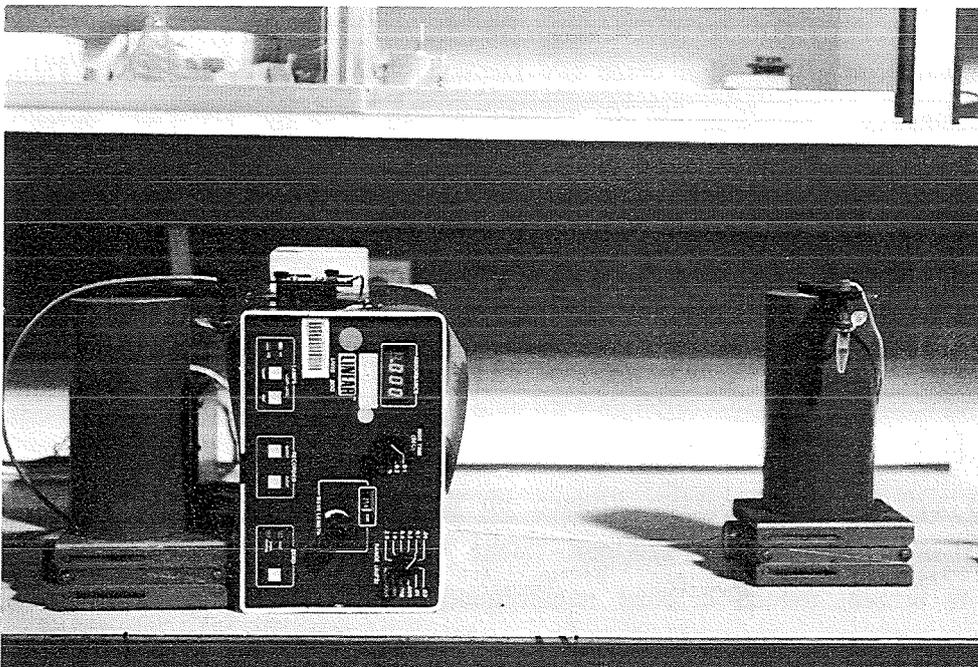


Abbildung (7): Trenneinheit

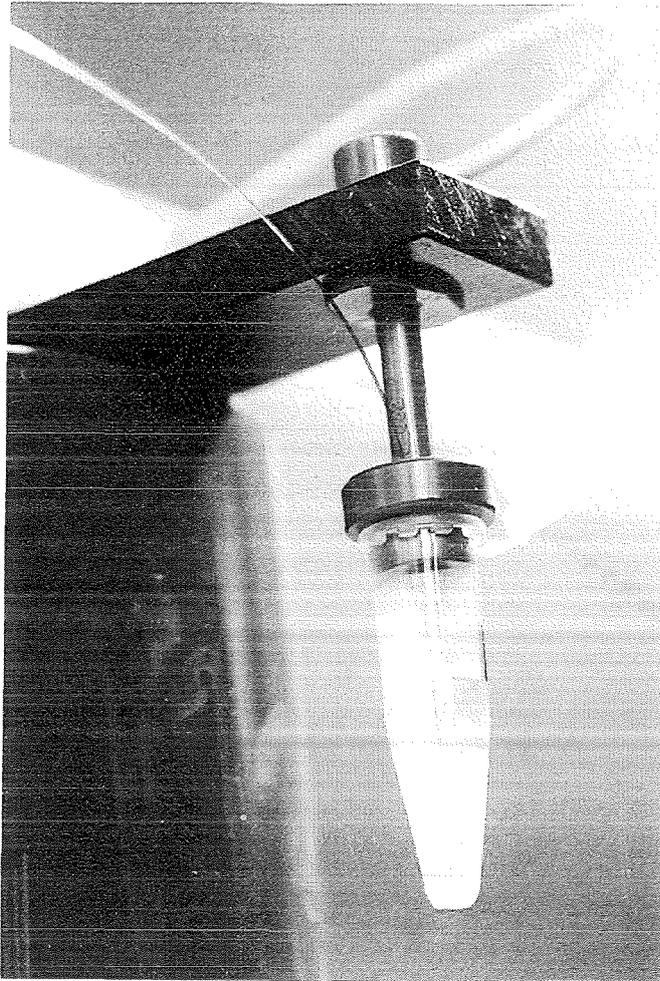


Abbildung (8) : Kapillar- und Elektrodeneinführung in das Puffergefäß

Kalibrierung der Elektrodenspannung:

Vor der Durchführung der ersten Trennung mußte eine Kalibrierung der Hochspannung erfolgen: Die Elektrodenspannung wurde über einen Tastkopf gemessen, der die Spannung um den Faktor 1000 reduzierte. Gleichzeitig wurde an zwei Meßpunkten der elektronischen Steuereinheit des Hochspannungsgenerators eine zur Hochspannung proportionale Spannung (in mV) registriert. In Abbildung (9) ist die Elektrodenspannung als Funktion der an den Meßpunkten der elektronischen Steuereinheit anliegenden Spannung aufgetragen. Mit Hilfe der Regressionsgleichung konnten alle bei der Probenaufgabe und bei der Trennung gewählten Hochspannungswerte an der elektronischen Steuereinheit eingestellt und kontrolliert werden.

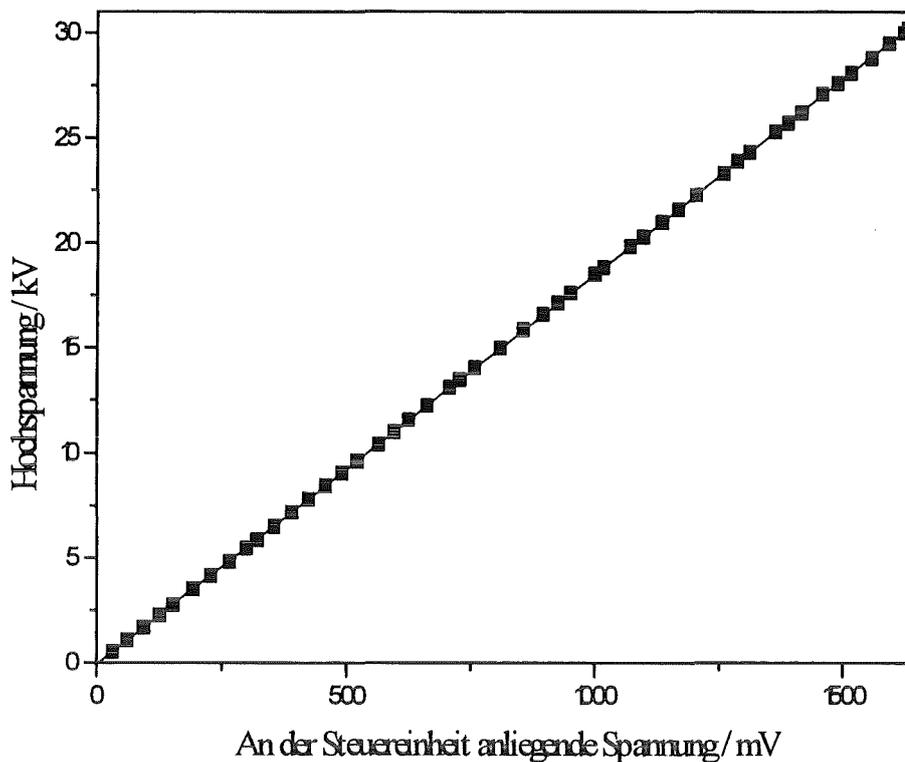


Abbildung (9): Kalibrationskurve der Elektrodenspannung
 $y = 0,01856 x - 0,03607$

3.2 Probenaufgabe

Um durch die Probenaufgabe nicht zur Bandenverbreiterung beizutragen, müssen sehr kleine Probenvolumina im Bereich von 1nL-20nL reproduzierbar injiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Probe elektrokinetisch aufgegeben (siehe 3.1):

Bei dieser Aufgabetechnik wird kurzzeitig ein elektrisches Feld angelegt, während sich ein Kapillarende im Probenbehälter befindet. Die aufgegebene Probenmenge Q hängt von folgenden Parametern ab [17]:

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \pi r^2 U_i t_i c}{L_{ges}} \quad (13)$$

Q : Aufgegebene Probenmenge ;	μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität ;
μ_{eo} : elektroosmotische Mobilität ;	r : Radius der Kapillare ;
U_i : Probenaufgabespannung ;	t_i : Probenaufgabezeit ;
c : Konzentration der Probe ;	L_{ges} : Gesamtlänge der Kapillare

Eine quantitative Bestimmung wird durch Diskriminierungseffekte erschwert, da Ionen mit größerer Ionenbeweglichkeit bevorzugt in die Kapillare gelangen, während die langsamer Wandernden diskriminiert werden. Außerdem hängt die injizierte Probenmenge vom elektrischen Widerstand der Probenlösung und der Stärke, sowie Richtung des EOF ab. Im Extremfall werden Probenmoleküle mit $\mu_{ep} - \mu_{eo} < 0$ nicht injiziert.

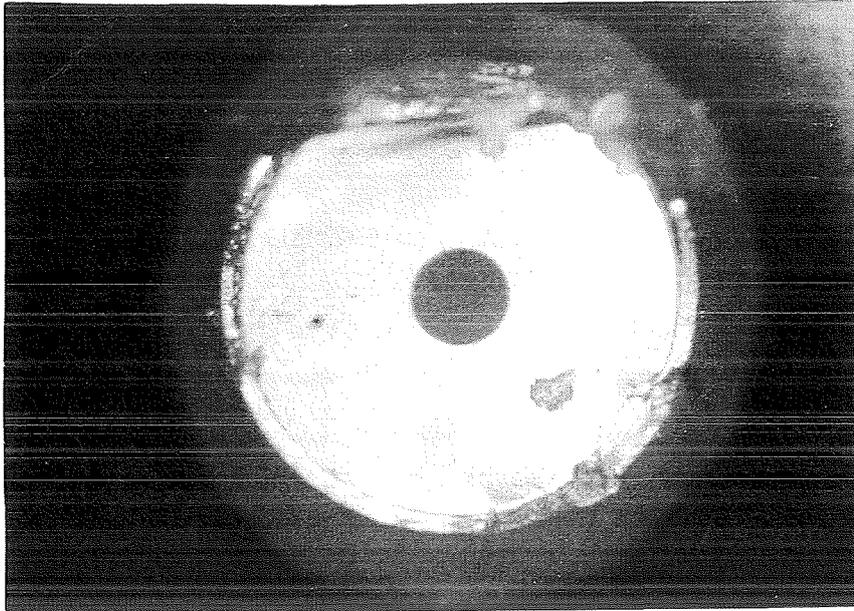
Ist die Leitfähigkeit der Probelösung niedriger als die des Puffers, wird die Probe bis zur Grenzfläche zwischen den beiden fluiden Phasen im elektrischen Feld beschleunigt. Da in der Pufferphase die auf die Probenmoleküle wirkende elektrische Feldstärke niedriger ist, verlangsamt sich die Migrationsgeschwindigkeit. Es erfolgt eine Aufkonzentrierung der Ionen in der Grenzzone zwischen Probenlösung und Elektrolyt (Sample Stacking) [28].

Bei normaler Polung des CE-Gerätes (Outlet geerdet) und kathodisch gerichtetem EOF können positiv geladene Probenmoleküle aufkonzentriert werden, während im entgegengesetzten Feld bei der Injektion eine Anionenreicherung stattfindet.

3.3 Trennkapillaren

In der Kapillarelektrophorese werden hauptsächlich Quarzkapillaren als Trägermaterial eingesetzt, da diese sich durch gute optische Eigenschaften und ihre chemische Inertheit auszeichnen. Als Ausgangsmaterial für die Kapillarherstellung wird kein natürlicher Quarz, sondern sog. "fused silica" (FS) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein in der Gasphase zu hochreinem Siliciumdioxid hydrolysiertem Siliciumtetrachlorid, das anschließend zu Quarzglas geschmolzen wird. "Fused silica" wird verwendet, weil es als Verunreinigungen lediglich etwa 0,2 mg/kg Aluminiumtrioxid neben 1 mg/kg anderen Metalloxiden enthält [29].

Die FS-Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 und 75 μm und einem Außendurchmesser von 360 μm wurden in Meterware von Bischoff (Böblingen) bezogen. Das FS-Material ist außen mit einer 50 μm dicken lichtundurchlässigen Polyimidschicht umgeben, die eine flexible und dennoch robuste Handhabung der Kapillaren ermöglicht (siehe Abb. (10)).



Abbildungen (10): *Kapillarquerschnitt einer 75 µm Kapillare bei 200-facher Vergrößerung*

Vorbehandlung der FS-Kapillare

Der elektroosmotische Fluß EOF in FS-Kapillaren ist abhängig von der Vorbehandlung der Kapillaren. Für eine reproduzierbare Durchführung von Messungen müssen die Kapillaren deshalb neben den wohldefinierten Parametern wie Innendurchmesser, Quarz- und Polyimidschichtdicke auch über einen einheitlichen Hydroxilierungsgrad der inneren Oberfläche verfügen.

Neue Kapillaren müssen deshalb vor ihrem erstmaligen Gebrauch einheitlich konditioniert werden.

Nach Engelhardt [17] wurde die Kapillare zunächst mit 1 M NaOH (10 Minuten) und mit 2 N HCl behandelt, danach mit Wasser gespült und anschließend 20 Minuten mit dem Trennpuffer äquilibriert.

Außerdem wurden die Kapillaren nach jeder Messung mit 0,1 M NaOH und mit dem Trennpuffer jeweils 3 Minuten lang gespült.

Durch Ätzen der inneren Oberfläche mit wässriger NaOH-Lösung konnte die Zahl der negativen Oberflächenladungen auf der Kapillarinnenoberfläche vergrößert werden, wobei die Ladungskompensation durch Natriumionen erfolgte. Durch den zusätzlichen Spülvorgang mit Salzsäure wurden die eingeführten Natriumionen gegen Protonen ersetzt.

Nach der Konditionierung wurden die Kapillaren mit Hilfe eines Kapillarschneiders von Newport (Darmstadt) auf die gewünschte Länge zugeschnitten. An der Detektionsstelle mußte die Polyimidschicht durch Abbrennen entfernt werden. Dies geschah mit Hilfe eines Kapillarbrenners von Bischoff (Böblingen). Das Detektionsfenster wurde anschließend vorsichtig mit Ethanol gereinigt, um noch vorhandene Rußpartikel zu entfernen. Abbildung (11) zeigt eine Kapillare mit Detektionsstelle.

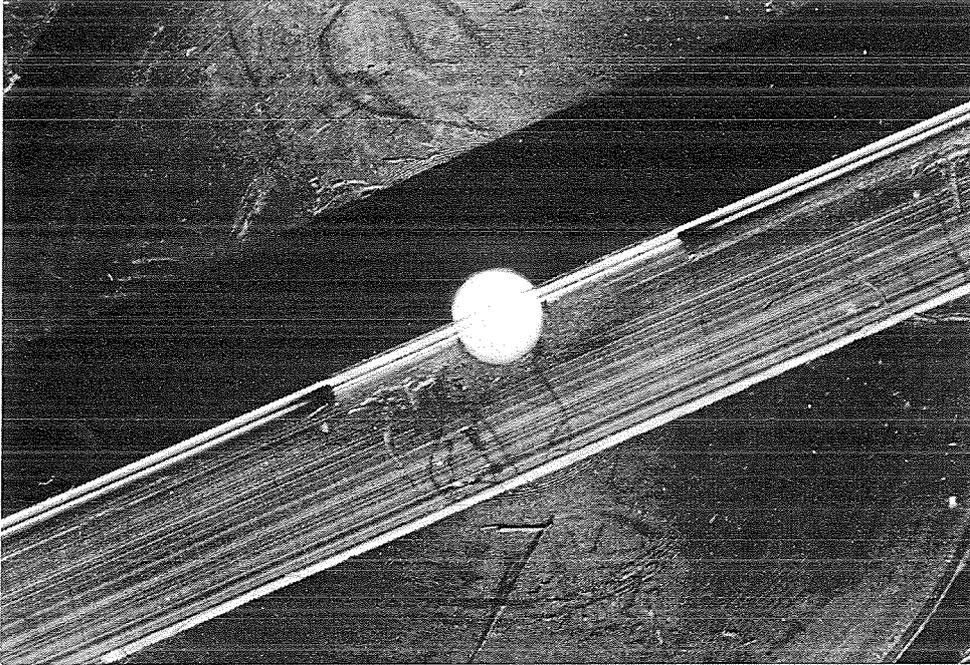


Abbildung (11): Kapillare mit Detektionsstelle

3.3.1 Strom-Spannungskurven

Da Auflösungsverluste durch Thermokonvektion nach Kapitel 2.4.1 vernachlässigt werden können (solange man sich im Bereich des Ohmschen Gesetzes befindet), wurden Strom-Spannungsdiagramme bei zwei verschiedenen Kapillarinnendurchmessern ohne Kapillarkühlung ermittelt.

Die Kapillaren in Abbildung (12) waren mit 20 mmol Phosphatpuffer bei pH 7 gefüllt und hatten eine Gesamtlänge L von 54,1 cm.

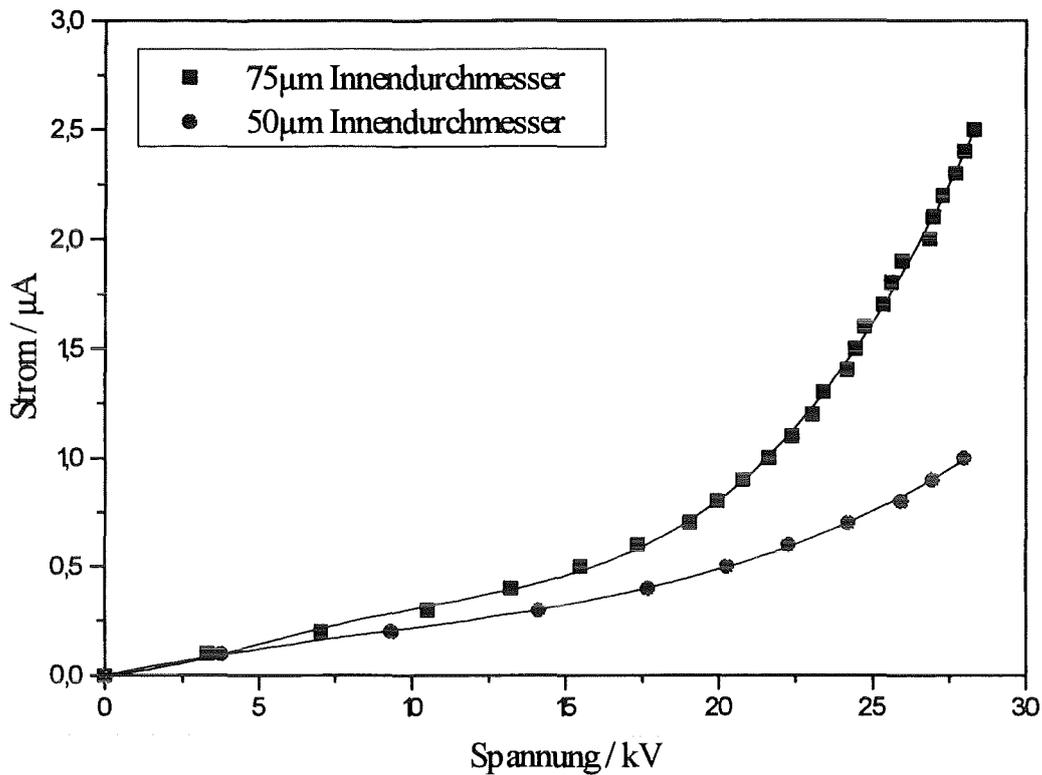


Abbildung (12): Zunahme des Stroms in Abhängigkeit von der angelegten Spannung und dem Kapillarinne Durchmesser

Wie Abbildung (12) zeigt, gilt bei beiden Kapillarinne Durchmessern das Ohmsche Gesetz nur bis zu einer charakteristischen Grenzspannung. Bei der 50 µm Kapillare ist diese Grenzspannung bei 16 kV, bei der 75 µm Kapillare schon bei 12 kV erreicht. Anschließend erfolgt ein überproportionaler Kurvenanstieg, welcher bei der 75 µm Kapillare deutlich stärker ausgeprägt ist.

Bis zur Grenzspannung wird die gesamte Joulesche Wärme über die Kapillarwand abgeführt, so daß sich der Strom nur so lange verändert, bis ein stabiler radialer Temperaturgradient vorliegt und somit das Ohmsche Gesetz erfüllt ist.

Da bei Spannungswerten über der Grenzspannung nicht mehr die gesamte Wärme abgeführt werden kann, steigt die Puffertemperatur und somit die Leitfähigkeit überproportional mit der angelegten Spannung an, so daß das Ohmsche Gesetz seine Gültigkeit verliert.

Weil die durch die elektrische Leistung erzeugte Wärme proportional zum Quadrat des Kapillarinne Durchmessers ist (Gleichung (9)), zeigt die Strom-Spannungskurve der 50 µm Kapillare eine deutlich geringere Steigung als die der 75 µm Kapillare. Das Ohmsche Gesetz gilt

somit in einem größeren Spannungsbereich. Außerdem sind die durch den Temperaturgradienten hervorgerufenen Auflösungsverluste bei geringeren Spannungen und kleinerem Kapillarinnendurchmesser schwächer ausgeprägt.

Die Wahl des Kapillarinnendurchmessers hängt folglich davon ab, ob man eine optimale Auflösung oder eine höhere Detektionsempfindlichkeit, die durch einen längeren Lichtweg erreicht wird, anstrebt.

3.3.2 Detektion

Mit der aufgebauten Apparatur erfolgte eine in-line Detektion direkt in der Kapillare. Nur in den seltensten Fällen, z. B. bei der Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektroskopie (MS) oder mit ionenselektiven Elektroden (Potentiometrie), wird außerhalb der Trennkapillare detektiert [30]. Ein entscheidender Vorteil der in-line Detektion ist, daß keine Kopplung an eine Detektorzelle notwendig ist, die zu einer Bandenverbreiterung durch Totvolumina führen würde.

Ein Nachteil der UV-Detektion ist jedoch die geringe Nachweisempfindlichkeit, welche nach dem Lambert Beerschen Gesetz (14) auf den kurzen Absorptionsweg d zurückzuführen ist.

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon c d \quad (14)$$

E: Extinktion

I_0 : Intensität des in das Medium einfallenden Lichtes

I: Intensität des aus dem Medium austretenden Lichtes

ϵ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke

c: Konzentration

Da die in-line UV-Detektion, im Vergleich zu den anderen bisher für die CE entwickelten Nachweismethoden, für eine wesentlich größere Anzahl von Analyten eingesetzt werden kann, hat sie sich jedoch als das am häufigsten verwendete Detektionsprinzip durchgesetzt.

Als Lichtquelle diente eine Deuteriumlampe, die das gesamte UV-Spektrum von 190-350 nm emittiert. Das Licht wird gebündelt und an einem holographischen Gitter spektral zerlegt. Anschließend wird es durch die Kapillare geleitet und die Absorption mit einer Photozelle bestimmt. Durch eine Drehung des Gitters können verschiedene Detektionswellenlängen eingestellt werden.

Durch mangelnde Fokussierung des Lichts durch die Kapillarwand und durch Abweichungen von der ideal zylindrischen Kapillargeometrie, kommt es bei der in-line Detektion zu Streulichtanteilen, die sich störend bemerkbar machen. Um den Streulichtanteil zu minimieren, werden deshalb zwischen Lichtquelle und Kapillare fokussierende Linsensysteme eingebaut, die einen Bereich der Kapillare von etwa 0,5 mm und weniger ausleuchten.

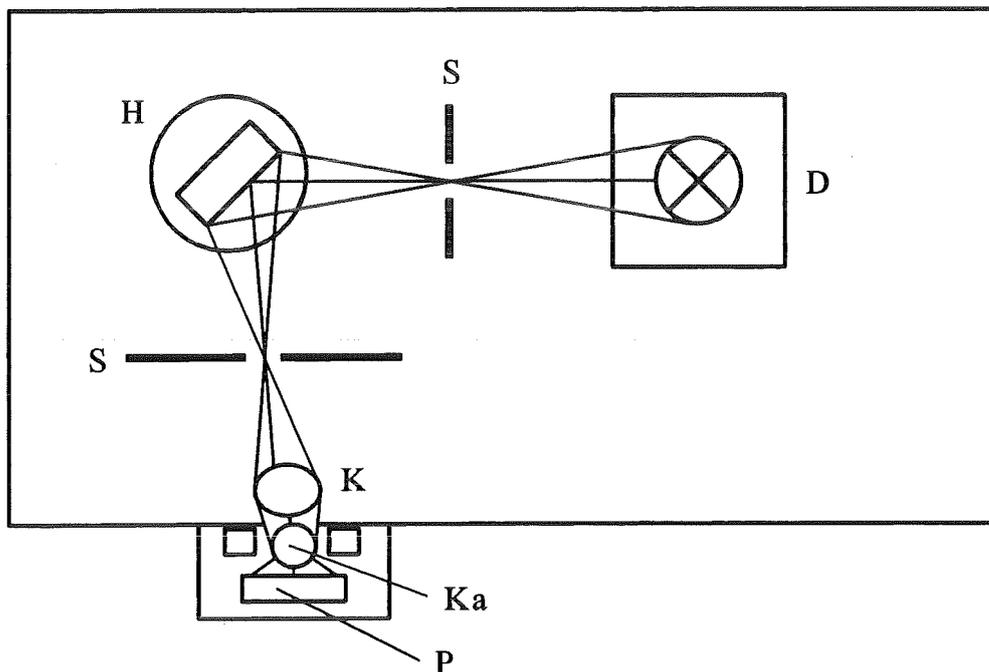


Abbildung (13): Das Detektionsprinzip

P: Photozelle, Ka: Kapillare, K: Kugellinse, S: Spalt, H: drehbares holographisches Gitter, D: Deuteriumlampe,

3.3.3 EOF / pH-Charakteristik der FS-Kapillaren

Da ungeladene Moleküle ausschließlich durch den elektroosmotischen Fluß transportiert werden, kann mit Dimethylsulfoxid DMSO das elektroosmotische Fließverhalten in einer FS-Kapillare untersucht werden.

Zur Ermittlung der optimalen Detektionswellenlänge wurde ein UV-Spektrum von reinem DMSO gegen Luft mit einem Spektralphotometer Cary 2400 aufgenommen. Das ermittelte UV-Spektrum in Abbildung (14) zeigt, daß das Extinktionsmaximum bei 215 nm liegt.

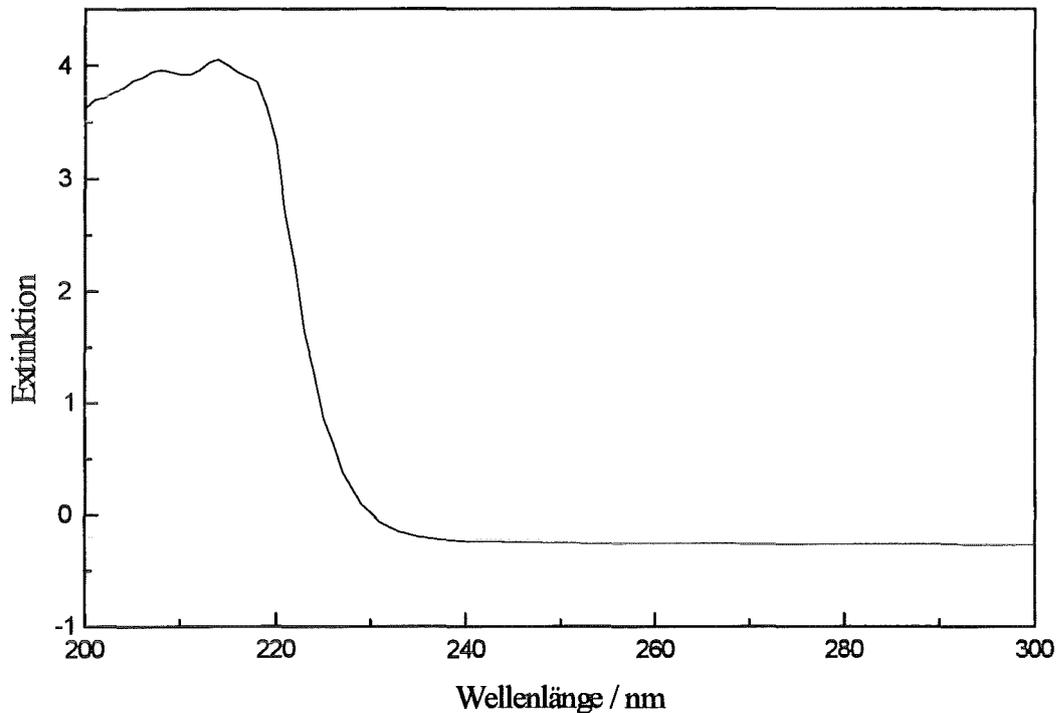


Abbildung (14): *UV-Spektrum von DMSO gegen Luft*

Für den Ansatz der Probenlösung wurden 10 μl Dimethylsulfoxid in 10 ml eines 20 mmol Phosphatpuffers gelöst. Der Innendurchmesser der verwendeten Kapillare betrug 75 μm , die Gesamtlänge L 51,1 cm und die effektive Länge l_{eff} 31,6 cm. Die Probenaufgabe erfolgte 4 s lang bei einer Aufgabespannung von 4 kV.

Durch den Zusatz von Salzsäure bzw. Natronlauge zu einem 20 mmol Phosphatpuffer wurden Elektrolytlösungen in einem pH-Bereich zwischen pH 2,5 und pH 9,7 hergestellt und nacheinander in die Puffergefäße, sowie in die Kapillare gefüllt. Auf diese Weise konnte die Abhängigkeit der Migrationszeit des DMSO vom pH-Wert des Elektrolyten bestimmt werden (siehe Abb. 15).

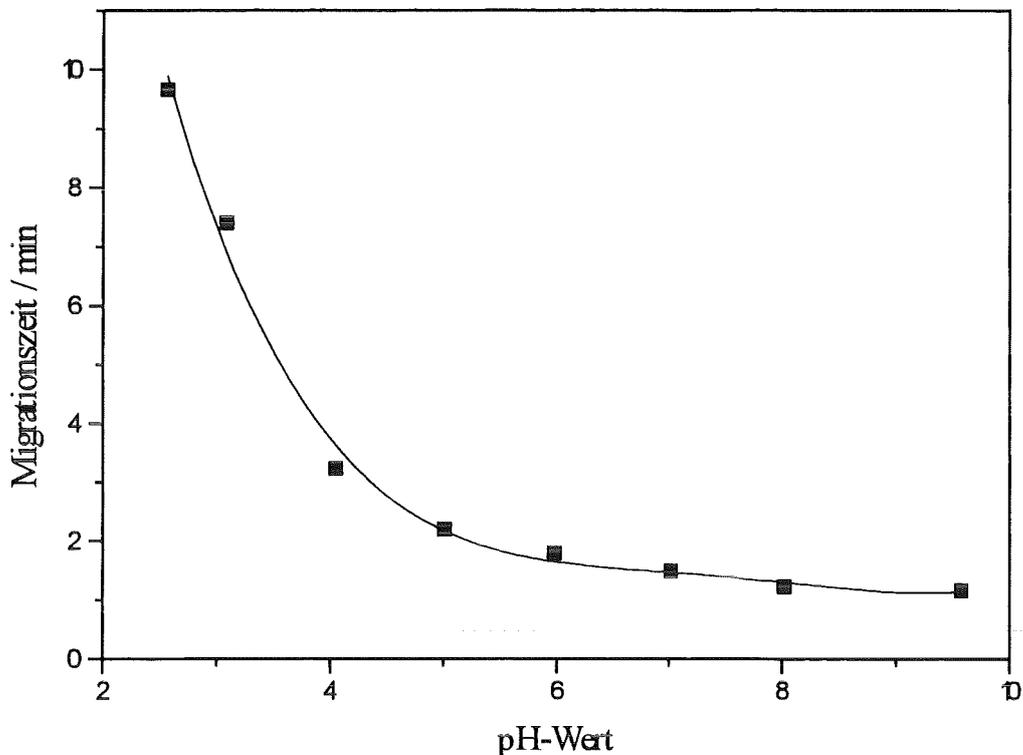


Abbildung (15): *pH-Abhängigkeit der Migrationszeit*

Nach Abbildung (15) bewirkt eine Zunahme des pH-Wertes der Elektrolytlösung eine Abnahme der Migrationszeit, wobei die stärkste Abnahme zwischen pH 2,6 und pH 5 zu erkennen ist (7,5 min). Insgesamt verkürzt sich die Migrationszeit von pH 2,6 bis pH 9,6 um 8,5 Minuten.

Unterhalb von pH 2,6 konnte die Migrationszeit des DMSO nicht mehr gemessen werden, weil der elektroosmotische Fluß EOF unterbunden ist. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß alle Silanolgruppen protoniert sind und sich deshalb keine Doppelschicht mehr ausbilden kann (siehe Abb. 2, Seite 6).

Mit steigendem pH-Wert wirkt sich der EOF immer stärker aus, wodurch kürzere Migrationszeiten gemessen wurden. Bei pH 9,6 ist eine vollständige Deprotonierung der Silanolgruppen erreicht, so daß bei höheren pH-Werten der elektroosmotische Fluß ebenfalls unterbunden ist.

Aus den Migrationszeiten ergaben sich nach Gleichung (5) die Werte für die elektrophoretischen Mobilitäten. Abbildung (18) zeigt die Ergebnisse der Berechnungen:

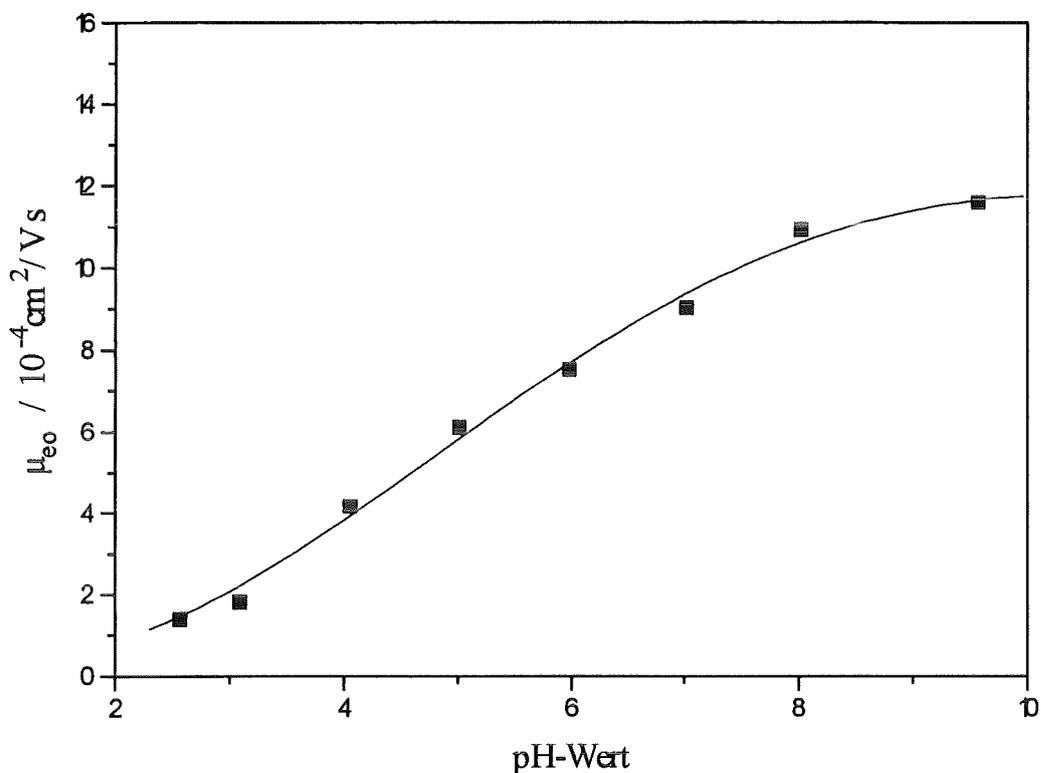


Abbildung (18): *pH-Abhängigkeit der elektroosmotischen Mobilität*

Der Wert der elektroosmotischen Mobilität zeigt mit zunehmendem pH-Wert einen leicht s-förmigen Anstieg. Von pH 2,6 bis pH 9,6 nimmt die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} insgesamt um $10,21 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 / \text{Vs}$ zu. Der Wendepunkt der Kurve stimmt ungefähr mit dem pK-Wert der Silanolfunktionen überein.

3.4 Trennung von wasserlöslichen Vitaminen

Um die Funktionsfähigkeit der Apparatur zu testen, wurde für die erste Trennung eine von Hewlett Packard (Waldbronn) empfohlene Standardtrennung eingesetzt. Diese bestand aus den drei Vitaminen Thiaminhydrochlorid, Nicotinamid und Nicotinsäure, deren Kurzstrukturformeln in Abbildung (19) dargestellt sind.

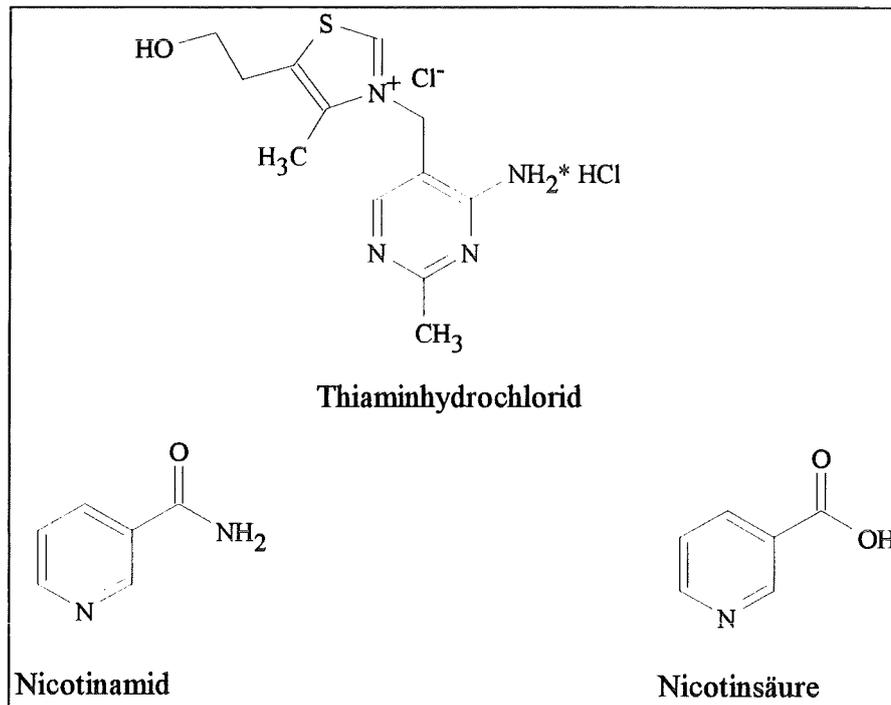


Abbildung (19): Kurzstrukturformeln der verwendeten Vitamine

Für die Trennung wurde eine wässrige Standardlösung angesetzt, in der die Konzentration jedes Vitamins 1 mmol/l betrug. Die verwendeten Chemikalien stammten von Hewlett Packard (Waldbronn). Bei dem verwendeten Wasser handelte es sich um 18-M Ω -Wasser aus einem Wasseraufbereitungssystem der Firma Millipore (Bedford, U.S.A).

Da das Thiaminhydrochlorid und die Nicotinsäure in Wasser dissoziieren, wird ein Thiaminkation und ein Nicotinsäureanion gebildet. Das Nicotinamid dissoziiert dagegen nicht und liegt als neutrales Molekül in der Lösung vor.

Um eine geeignete Detektionswellenlänge für die Vitamintrennung zu ermitteln, wurden 0,3 mmol wässrige Lösungen der einzelnen Vitamine (Merck, Darmstadt) angesetzt und mit einem Cary

2400 die UV-Spektren gegen Wasser aufgenommen. Die charakteristischen UV-Spektren der drei Vitamine von 200-330 nm sind in den Abbildungen (20) bis (22) dargestellt.

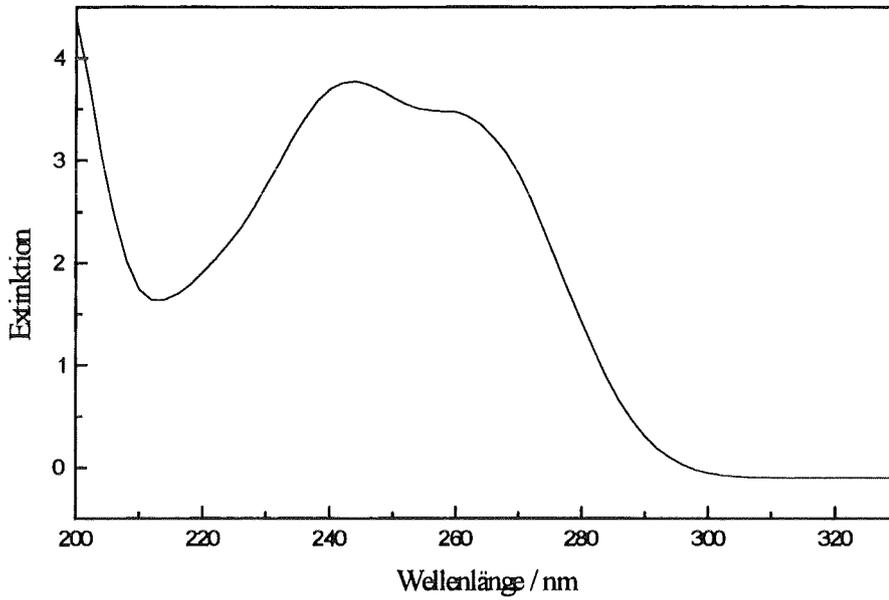


Abbildung (20): *UV-Spektrum von Thiaminhydrochlorid*

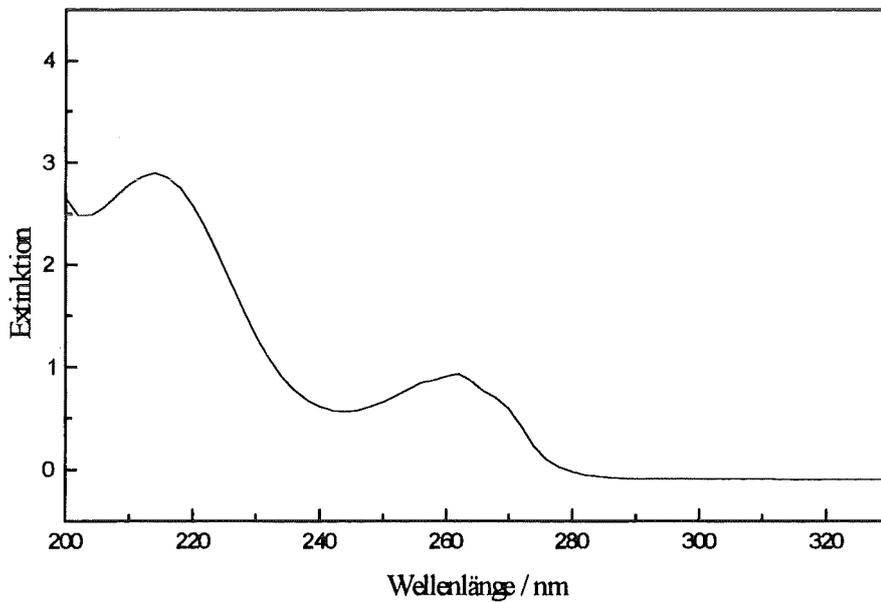


Abbildung (21): *UV-Spektrum von Nicotinamid*

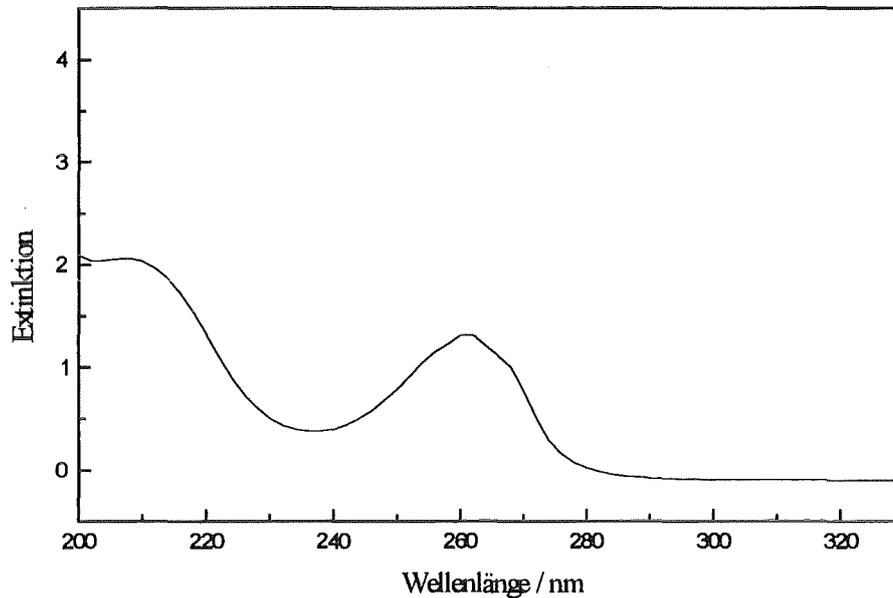


Abbildung (22): *UV-Spektrum von Nicotinsäure*

Aus den UV-Spektren der Vitamine wurde das Extinktionsmaximum des Nicotinamids bei 215 nm als geeignete Detektionswellenlänge für die Trennung gewählt (Abb. 21). Im Vergleich zu den Extinktionswerten der beiden anderen Vitamine (Abb.20 und Abb. 22) ist bei dieser Wellenlänge die Extinktion des Nicotinamids am höchsten (2,8). Da außerdem bei der Nicotinsäure ein Extinktionswert vorliegt, der nicht weit vom Extinktionsmaximum entfernt ist, schien diese Wellenlänge besonders geeignet zu sein.

Obwohl in einem Wellenlängenbereich zwischen 230-270 nm die Extinktion des Thiaminhydrochlorids besonders hoch ist (3-4), ist dieser aufgrund der geringen Extinktionswerte des Nicotinamids (1,9) und der Nicotinsäure (1,3) als Detektionswellenlängenbereich ungeeignet.

3.4.1 Durchführung der Trennung

Die Trennungen wurden in einer 50µm Kapillare mit einer Gesamtlänge L von 54,1 cm durchgeführt. Als Trennpuffer diente ein 20 mmol Phosphatpuffer pH 7. Zur elektrokinetischen

Probenaufgabe wurde für 3 Sekunden eine Aufgabespannung von 6 kV gewählt. Die Trennungsspannung betrug 25 kV. Da bei dieser Spannung nach Abbildung (12) der Gültigkeitsbereich des Ohmschen Gesetzes verlassen wird, wurde die Kapillare mit einem Ventilator gekühlt. Die Detektion erfolgte kathodenseitig bei 215 nm nach einer Migrationsstrecke l_{eff} von 35 cm. In Abbildung (23) ist das Elektropherogramm einer Trennung dargestellt.

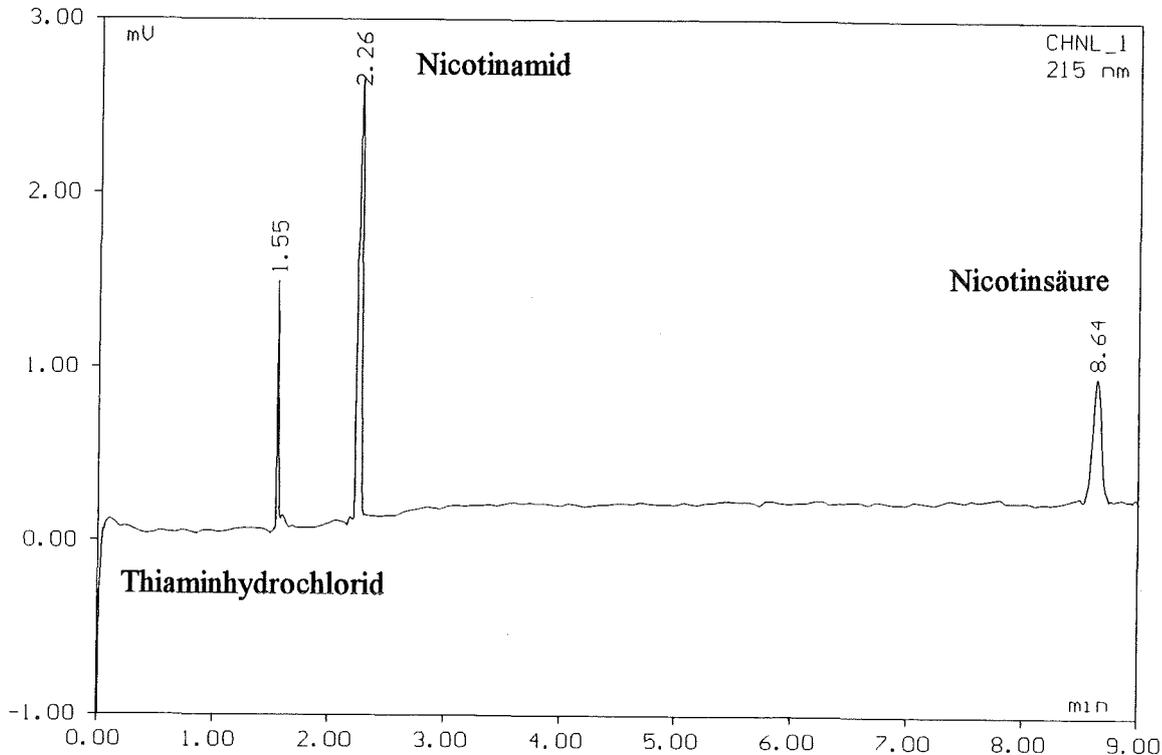


Abbildung (23): Elektropherogramm der Vitaminentrennung

Der Abbildung (23) sind die Migrationszeiten der 3 Vitamine zu entnehmen:

Nach Gleichung (12) ergibt sich die effektive Mobilität μ_{eff} eines Analyten additiv aus seiner elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} und der Mobilität des EOF μ_{eo} .

Den Erwartungen entsprechend konnte das Thiamin aufgrund seiner positiven Ladung nach 1,55 min als erstes detektiert werden. Seine effektive Mobilität μ_{eff} ist am größten, da die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} und die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} das gleiche Vorzeichen haben.

Da das Nicotinamid bei pH 7 in neutraler Form vorliegt, war für dessen Transport ausschließlich der EOF verantwortlich; die Migration dauerte 2,26 min.

Die Migration der Nicotinsäure dauerte mit 8,64 min am längsten, weil die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} eines Anions der Mobilität des EOF μ_{eo} entgegengerichtet ist. Die Detektion der Nicotinsäure kann nur deshalb erfolgen, weil die elektrophoretische Mobilität durch die elektroosmotische Mobilität überkompensiert wird (siehe Tabelle 3).

3.4.2 Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und der aufgegebenen Probenmengen

Ein gutes analytisches Verfahren setzt eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen voraus. Zur Überprüfung des Verfahrens erfolgte deshalb eine Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und der aufgegebenen Probenmengen.

Es wurden 20 Messungen der Migrationszeiten der drei Vitamine durchgeführt und deren Relative Standardabweichungen berechnet. Abbildung (24) zeigt die Migrationszeiten als Funktion der Analysenzahl.

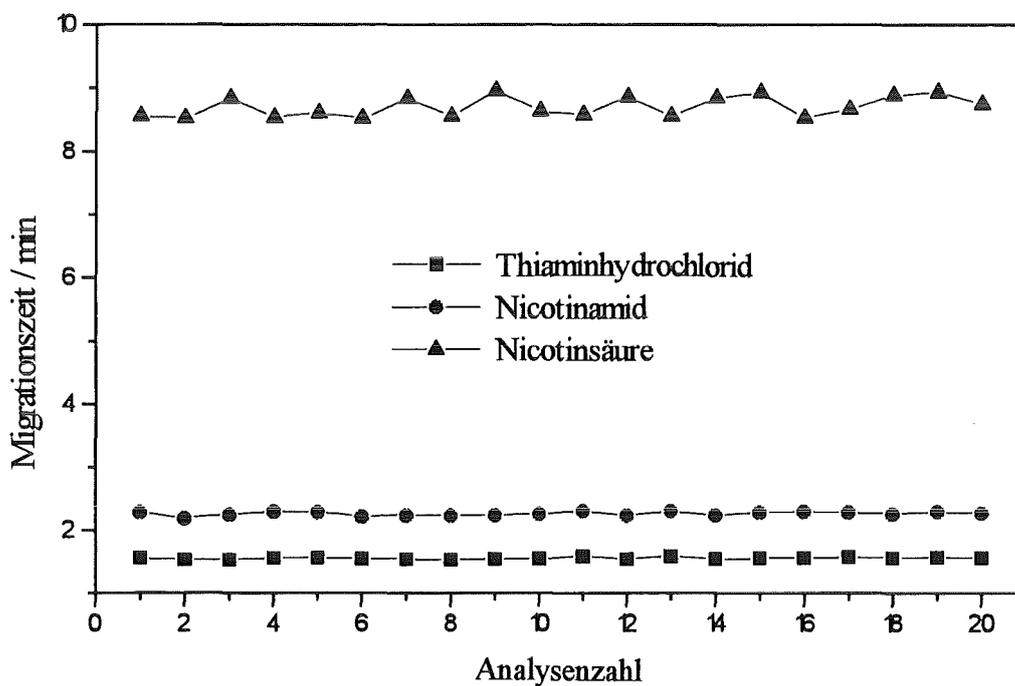


Abbildung (24): Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten

In Tabelle (2) sind die Ergebnisse der Berechnungen dargestellt:

	Mittelwert der Migrationszeiten / min	RSD / %
Thiaminhydrochlorid	1,55	1,12
Nicotinamid	2,26	3,21
Nicotinsäure	8,61	9,5

Tabelle (2): Mittelwerte und Relative Standardabweichungen der Migrationszeiten

Die niedrigen Relativen Standardabweichung der Migrationszeiten beim Nicotinamid (3,21 %) in Tabelle 2 zeigen, daß bei den 20 Messungen die EOF-Schwankungen nur sehr gering waren. Diese sind im allgemeinen für die gute Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten verantwortlich. Die geringen Veränderungen des elektroosmotischen Flusses EOF in der Meßreihe sind auf die pH-abhängige Dissoziation der aziden Silanolgruppen der Kapillarenoberfläche zurückzuführen.

Aus den Migrationszeiten der Vitamine (Abbildung 24) konnten mit Gleichung (5) deren Mobilitäten berechnet werden.

In Tabelle (3) sind die Mittelwerte der berechneten Mobilitäten zusammengefaßt:

<i>Mobilitäten / $10^{-4} \text{ cm}^2 / \text{Vs}$</i>		
Thiaminhydrochlorid	$\mu_{ep} = 2,55$	$\mu_{eff} = 8,12$
Nicotinamid	$\mu_{eo} = 5,57$	$\mu_{eff} = 5,57$
Nicotinsäure	$\mu_{ep} = -4,12$	$\mu_{eff} = 1,45$

Tabelle (3): Mittelwerte der Mobilitäten

Um die Reproduzierbarkeit der Probenaufgabe zu überprüfen, wurden mit den Mobilitäten aus Tabelle (3) die elektrokinetisch aufgegebenen Probenmengen mit Gleichung (13) berechnet.

	<i>Probenaufgabemenge / mol</i>	<i>Probenaufgabevolumen / nL</i>	<i>RSD / %</i>
Thiaminhydrochlorid	$5,31 \cdot 10^{-12}$	5,31	6,18
Nicotinamid	$3,64 \cdot 10^{-12}$	3,64	5,21
Nicotinsäure	$9,5 \cdot 10^{-13}$	0,95	1,87

Tabelle (4): Probenaufgabemengen und Probenaufgabevolumen der Vitamine

Tabelle (4) zeigt, daß die aufgegebenen Probenmengen der drei Vitamine im Nanoliterbereich liegen. Somit können die Trennungen mit sehr geringen Probenmengen durchgeführt werden. Die aufgegebene Probenmenge ist nach Gleichung (13) proportional zur effektiven Mobilität μ_{eff} der Analyten (Tab.3), so daß bei der elektrokinetischen Probenaufgabe langsamer migrierende Probenmoleküle diskriminiert werden.

Die Relativen Standardabweichungen RSD der aufgegebenen Probenmengen liegen alle unter 6,19% und können als gering betrachtet werden. Daraus läßt sich auf eine gute Reproduzierbarkeit der Probenaufgabe schließen.

3.4.3 Parametervariation bei der elektrokinetischen Probenaufgabe

Um optimale Parameter für die Probenaufgabe der Vitamine zu finden, wurden verschiedene Probenaufgabezeiten und Probenaufgabespaltungen gewählt. Diese Untersuchungen erfolgten in einer 50 μm Kapillare mit einer Gesamtlänge L von 47,7 cm und einer effektiven Länge l_{eff} von 35,5 cm.

Durch die Wahl verschiedener Aufgabezeiten (im Bereich von 2-16 s) bzw. Aufgabespaltungen (im Bereich von 2-14 kV) konnte deren Einfluß auf die Peakfläche und die Auflösung systematisch untersucht werden. Bei diesen Messungen betrug die Spannung jeweils 6 kV bei einer Variation der Zeit, während bei Veränderungen der Spannung die Zeit bei 3s konstant gehalten wurde (siehe Abb. 25-28).

In den Abbildungen (25) und (26) sind die Peakflächen in mV/min als Funktion der Aufgabezeit bzw. der Aufgabespaltung dargestellt.

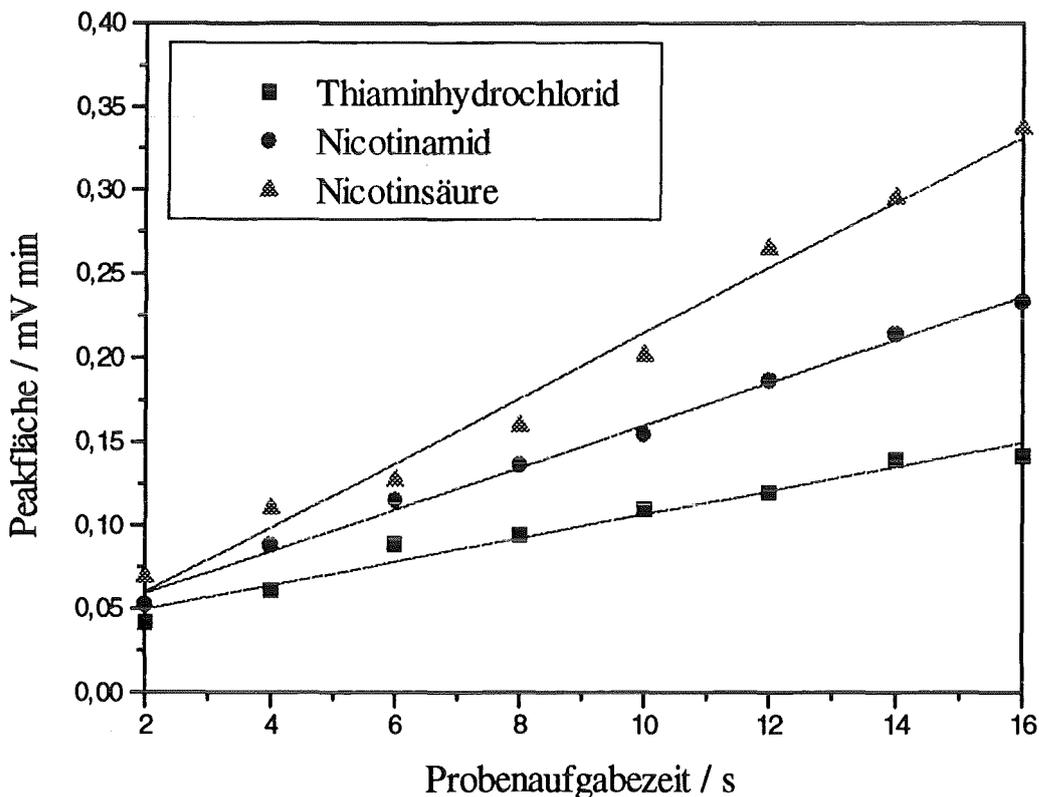


Abbildung (25): Die Peakfläche als Funktion der Probenaufgabezeit

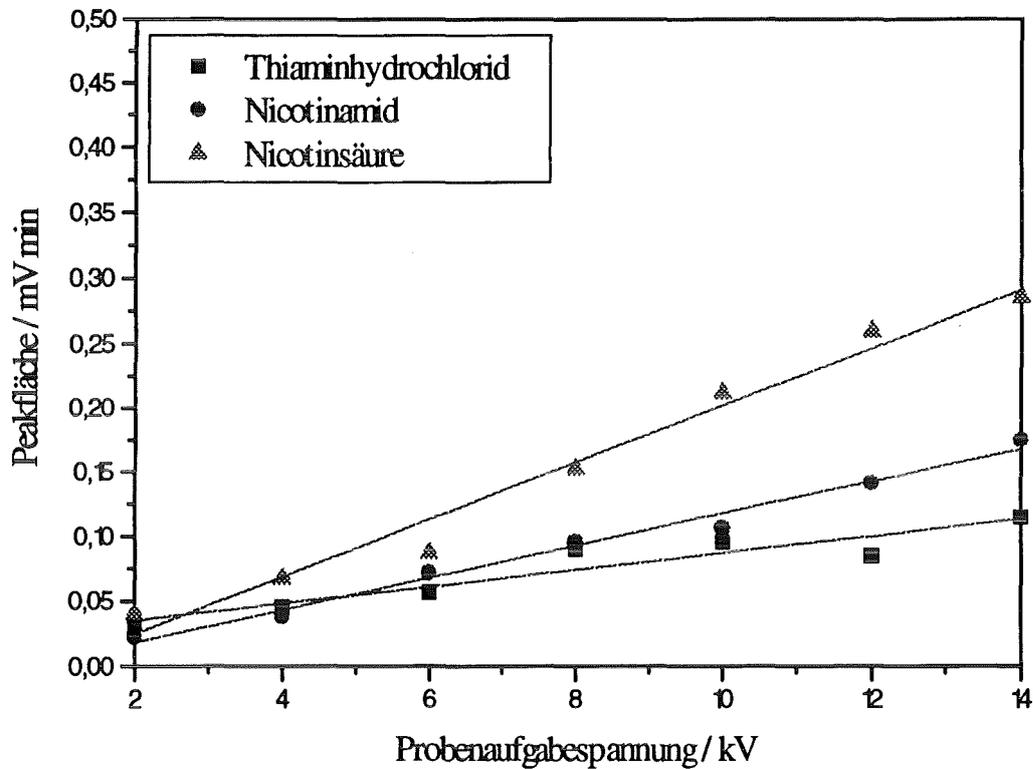


Abbildung (26): Die Peakfläche als Funktion der Probenaufgabespannung

Die Abbildungen (25) und (26) zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der Aufgabemenge und der Aufgabespannung bzw. der Aufgabespannung. Außer von den aufgegebenen Probenmengen hängen die Peakflächen von den Migrationsgeschwindigkeiten der Analyten ab:

Obwohl bei 215 nm die Extinktion der Nicotinsäure deutlich niedriger ist als die des Nicotinamids (siehe Abb. 21 und 22), liegt der Peakflächenwert der Nicotinsäure über dem Wert des Nicotinamids. Dies ist auf die längere Verweilzeit der Nicotinsäure im Detektionsbereich zurückzuführen.

Die beiden folgenden Abbildungen (27 und 28) zeigen die Auflösung R (Gleichung (11)) in Abhängigkeit von der Probenaufgabespannung bzw. der Probenaufgabezeit.

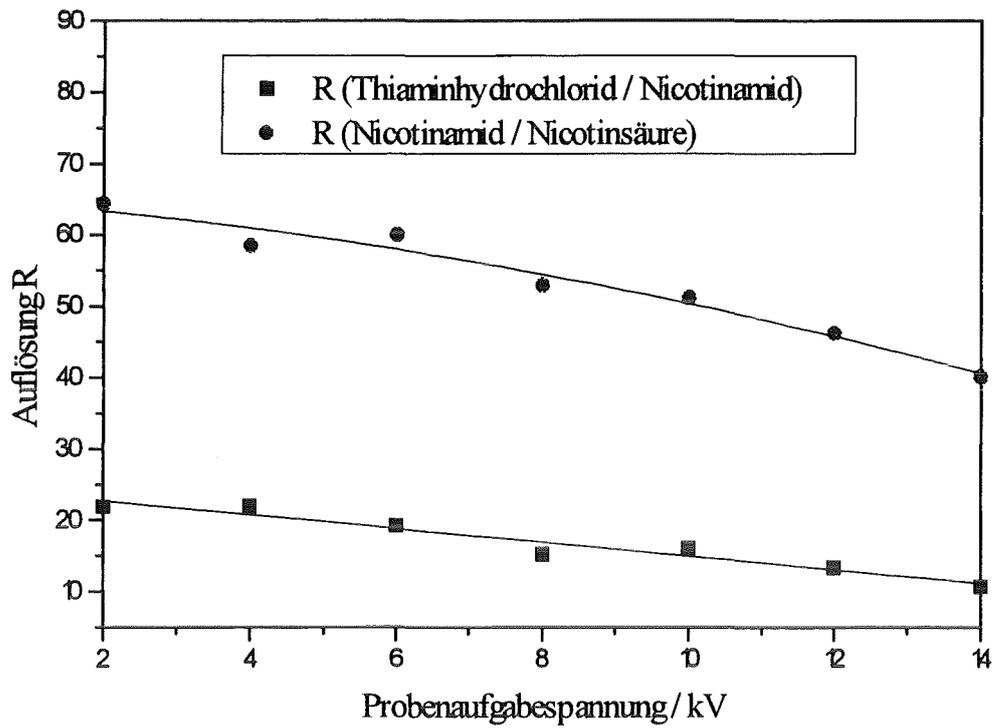


Abbildung (27): Die Auflösung als Funktion der Probenaufgabespannung

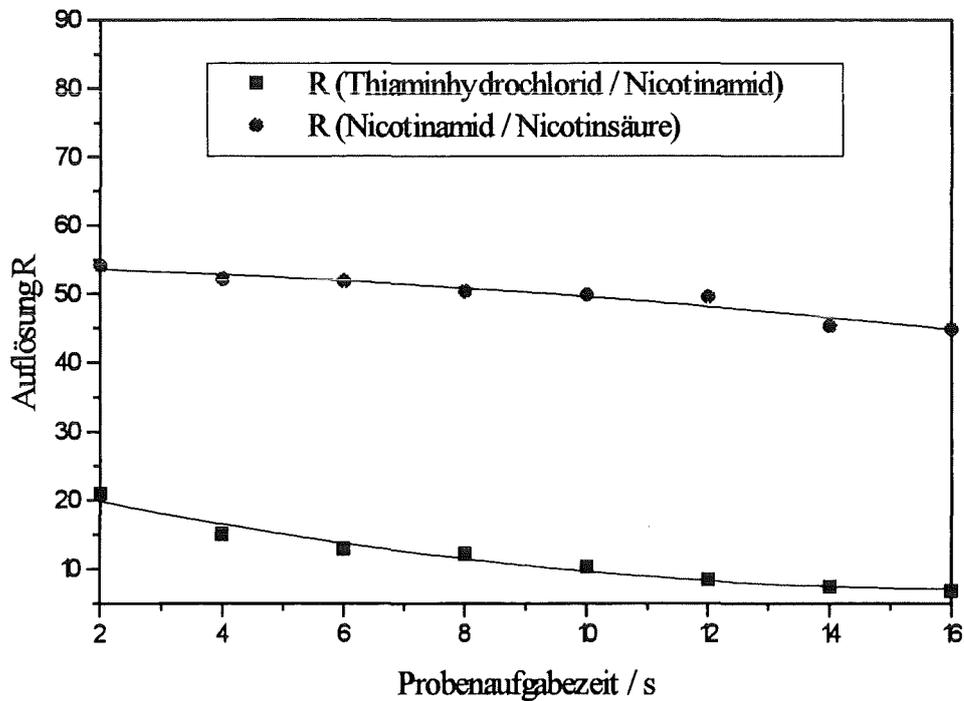


Abbildung (28): Die Auflösung als Funktion der Probenaufgabezeit

Aus den Abbildungen (27) und (28) ist zu entnehmen, daß mit einer Zunahme der Aufgabespannung bzw. der Aufgabezeit eine Abnahme der Auflösung (Gleichung 11) verbunden ist: Da die Axialdiffusion zur Bandenverbreiterung beiträgt und keine Streudiffusion auftritt, wird durch die Aufgabe großer Probenmengen die Auflösung deutlich verschlechtert. Um hohe Auflösungen zu erzielen, ist es deshalb erforderlich, niedrige Probenaufgabespannungen und kurze Probenaufgabezeiten zu wählen.

Die Wahl der Aufgabespannung bzw. der Aufgabezeit hängt folglich davon ab, ob man eine hohe Auflösung oder eine optimale Detektionsempfindlichkeiten anstrebt.

3.4.4 Quantitative Analyse der Vitamine

Um Aussagen über die Nachweisgrenzen treffen zu können, wurden Eichreihen erstellt, die einen Bezug zwischen der Peakfläche und der Konzentration herstellten. Diese als Konzentrationsreihen bezeichneten Eichmessungen sind substanz- und kapillarspezifisch.

Die Peakflächen [mV min] konnten computergestützt gemessen werden. Zur Ermittlung der Nachweisgrenzen wurde die IUPAC-Konvention (2.5.1) verwendet.

In den Abbildungen (29) bis (31) sind die Eichreihen, die sich bei der Bestimmung der Vitamin-Nachweisgrenzen ergaben, dargestellt:

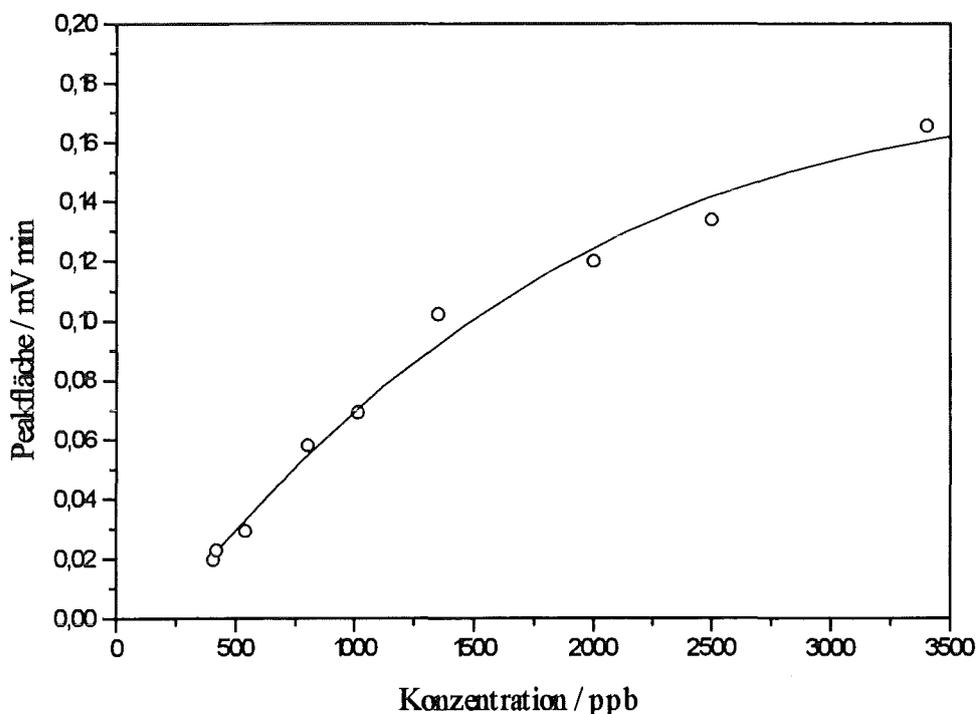


Abbildung (29): Konzentrationsreihe von Thiaminhydrochlorid

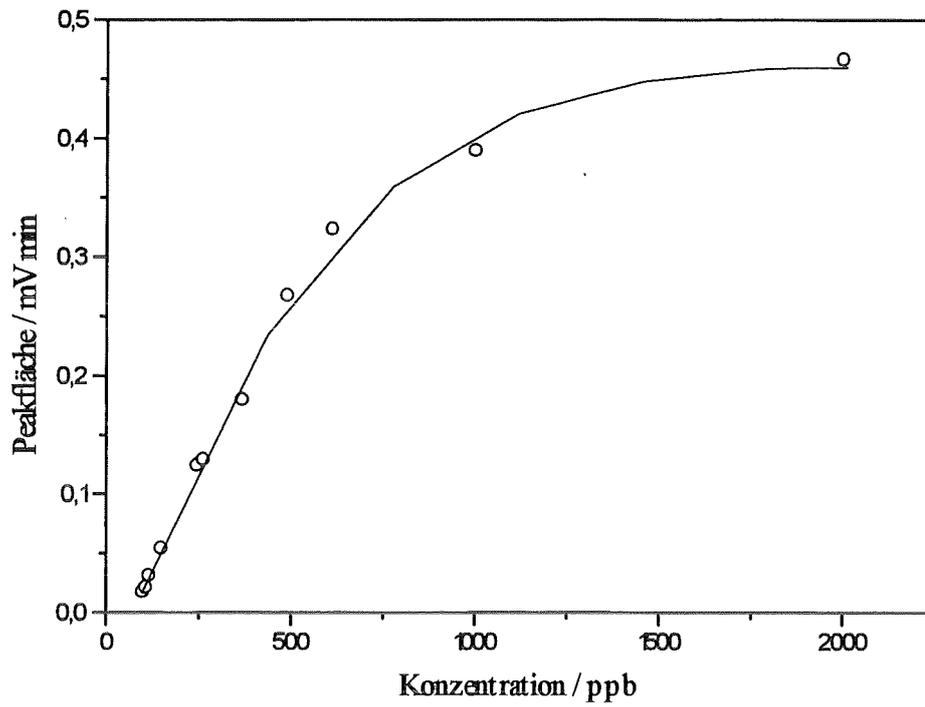


Abbildung (30): Konzentrationsreihe von Nicotinamid

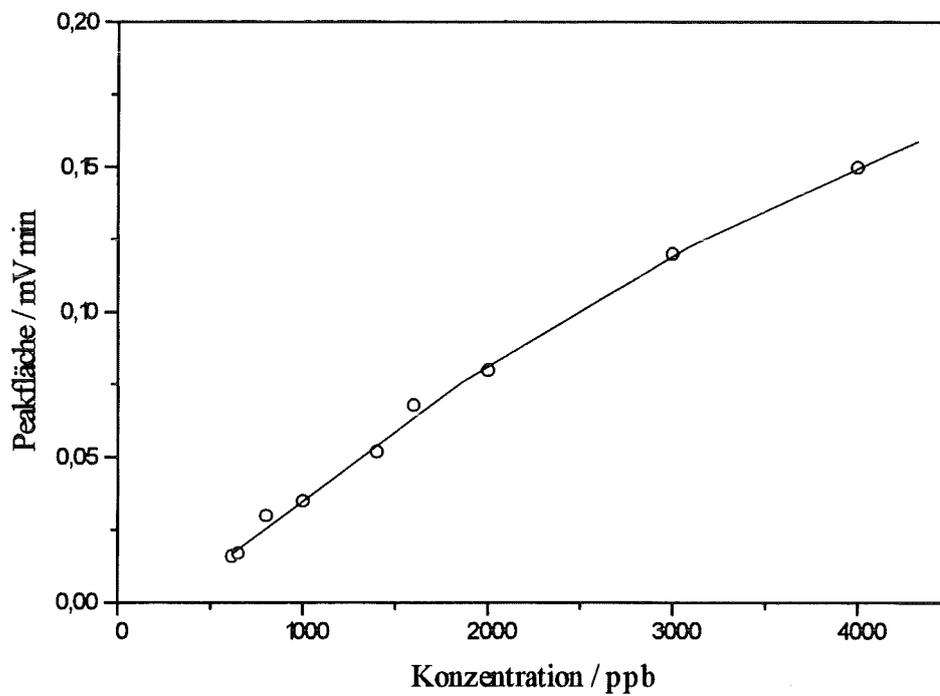


Abbildung (31): Konzentrationsreihe der Nicotinsäure

Im Bereich der Nachweisgrenzen zeigen die Kurven der drei Vitamine vergleichbare Verläufe: Zunächst ist ein steiler Anstieg erkennbar, der mit einer steigenden Konzentration allmählich abflacht. Dieser Verlauf ist insbesondere bei der Konzentrationsreihe des Nicotinamid zu beobachten. Die ermittelten Detektionsgrenzen sind in Tabelle (5) zusammengefaßt:

<i>Nachweisgrenze / ppb</i>	
Thiaminhydrochlorid	404
Nicotinamid	97
Nicotinsäure	616

Tabelle (5): Nachweisgrenzen der getrennten Substanzen

Durch den kurzen Absorptionsweg in der verwendeten 50 µm Kapillare ergeben sich insgesamt nur geringe Nachweisempfindlichkeiten.

Da die Extinktion des Nicotinamids bei 215 nm am größten ist (siehe Abb. 21), zeigt dieses im Vergleich zu den beiden anderen Vitaminen mit 97 ppb die beste Nachweisgrenze. Obwohl bei der elektrokinetischen Probenaufgabe eine Aufkonzentrierung des Thiaminkations durch sample stacking [vergl. 3.2.] erfolgt, kann die Nachweisempfindlichkeit des Nicotinamids nicht erreicht werden. Durch die bei der Probenaufgabe auftretenden Diskriminierungseffekte (siehe 3.2) ist die Nachweisgrenze der Nicotinsäure mit 616 ppb am schlechtesten.

3.4.5 Abhängigkeit der Trenneffizienz von der Ionenstärke des Puffers

Der Einfluß der Ionenstärke eines Puffers auf die Peakform, und folglich auf die Trenneffizienz der drei Vitamine, wurde am Beispiel eines 20 mmol Boratpuffers pH 8 (Merck, Darmstadt) untersucht. Um dessen Ionenstärke zu steigern und den pH-Wert konstant zu halten, wurde diesem 16,7 mmol/l Menge Natriumchlorid zugesetzt. Als Trennkapillare diente eine 50 µm Kapillare mit einer Gesamtlänge L von 53,1 cm und einer effektiven Länge L_{eff} von 34 cm. Die Probenaufgabe erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

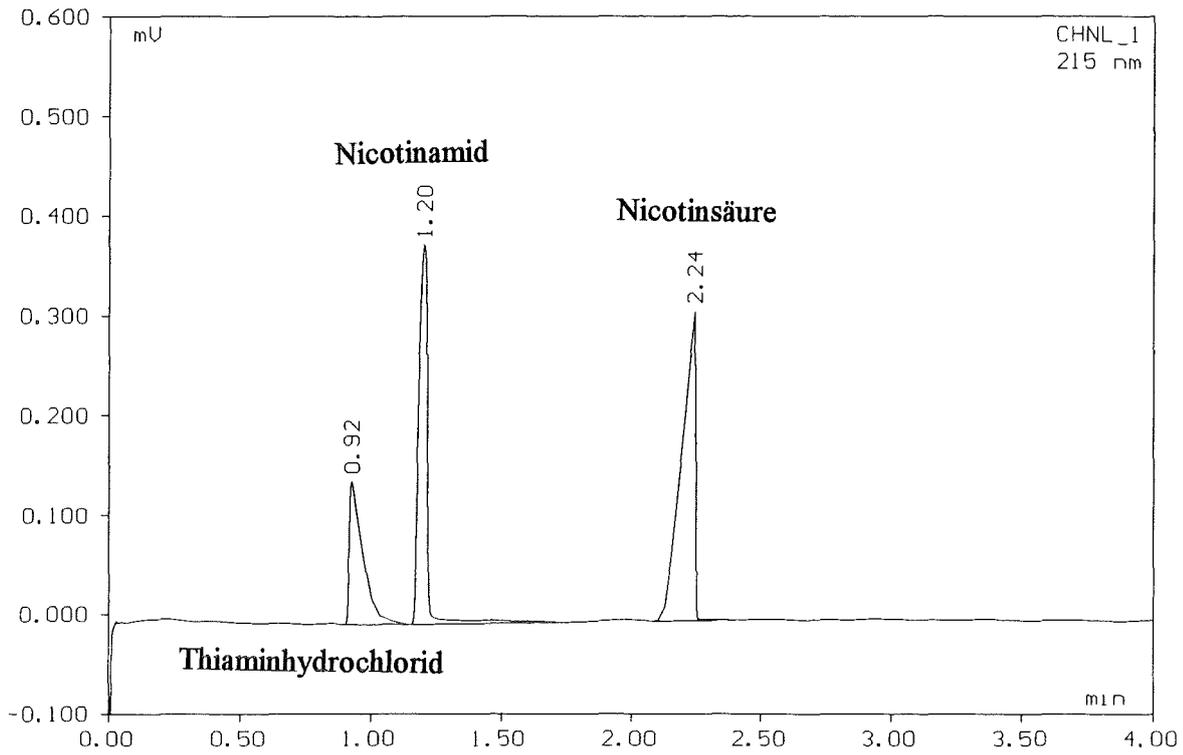


Abbildung (36): *Elektropherogramm der Vitamine ohne Natriumchloridzusatz*

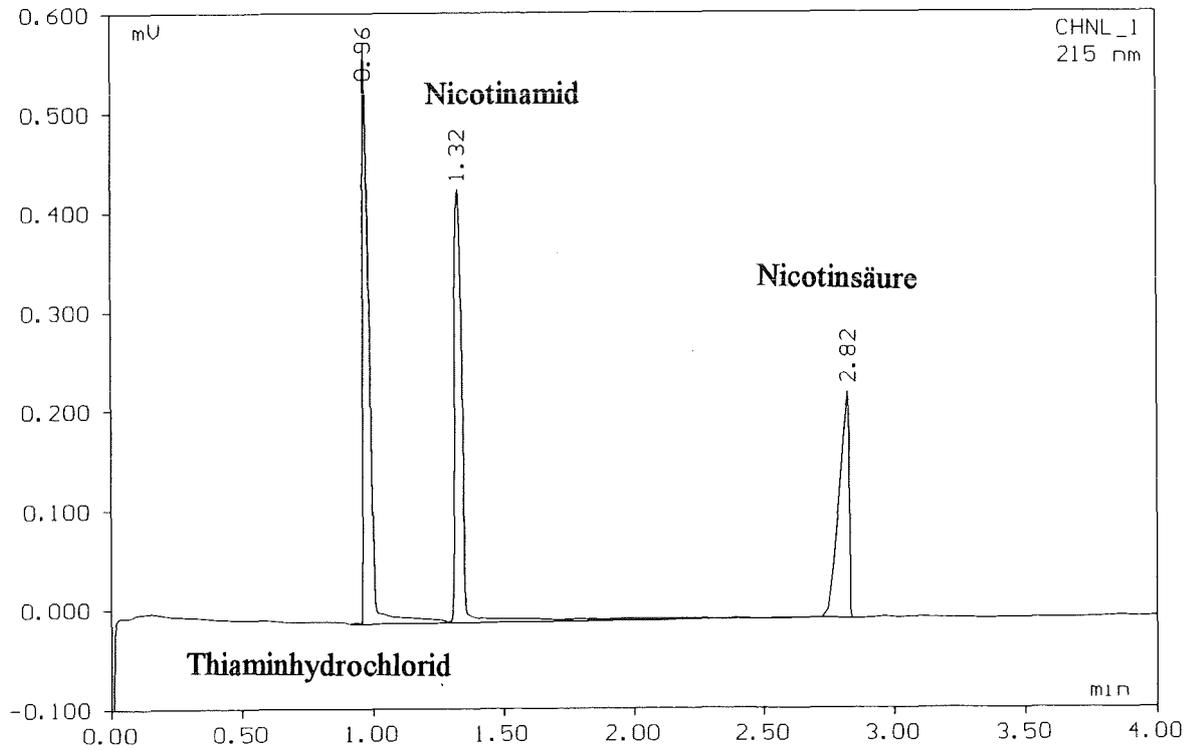


Abbildung (37): *Elektropherogramm nach einem Natriumchloridzusatz von 16,7 mñmol/l*

Mit Hilfe der in 3.1 beschriebenen Software konnten die theoretischen Bodenzahlen N aus den Elektropherogrammen ermittelt werden:

	<i>Bodenzahl ohne NaCl</i>	<i>Bodenzahl mit NaCl</i>
Thiaminhydrochlorid	1654	7607
Nicotinamid	5838	9797
Nicotinsäure	7818	24647

Tabelle (6):Theoretische Bodenzahlen

Eine Zunahme der Ionenstärke des Trennpuffers durch einen Natriumchloridzusatz führte, wie in Tab.6 dargestellt, bei allen drei Vitaminen zu einem Anstieg der theoretischen Bodenzahl (z.B. beim Thiaminhydrochlorid von 1654 ohne NaCl zu 7607 mit NaCl) und somit zu einer höheren Trenneffizienz. Nach [25] ist die gleichzeitige Zunahme der elektrischen Feldstärke E für die höhere Trenneffizienz verantwortlich.

Außerdem zeigte die Peakfläche des Thiaminhydrochlorids nach dem Zusatz von Natriumchlorid kein Tailing mehr, da die Thiaminkationen durch Natriumionen ausgetauscht wurden und somit zonale Ladungsasymmetrien ausgeglichen werden konnten.

Die Migrationszeit der Nicotinsäure verlängerte sich von 2,24 min (ohne Zusatz von NaCl) auf eine Zeit von 2,82 min (nach Zusatz von 16,7 mmol NaCl).

An dieser Veränderung der Anionenmigrationszeit ist eine Abnahme des EOF mit zunehmender Ionenstärke des Puffers deutlich erkennbar. Die EOF-Abnahme ist auf eine Abnahme des ζ -Potentials zurückzuführen (siehe Gleichung (4)).

3.5 Trennung von anorganischen Anionen

3.5.1 Indirekte UV-Detektion

Um Analyten ohne oder mit geringer Absorption im UV-Bereich nachzuweisen, führt man eine indirekte UV-Detektion durch. Man setzt dem Puffer einen UV-absorbierenden Hintergrundelektrolyten zu, der eine ähnliche Mobilität wie die zu trennende Probe besitzt, so daß Peaks mit zu starkem Leading oder Tailing vermieden werden können.

Erfolgt eine Verdrängung von UV-absorbierenden Hintergrundelektrolytmolekülen durch Probenmoleküle, resultiert daraus eine höhere Transmission des Puffers. Als Signal entsteht ein negativer Peak (Abb. (32)).

Von geladenen Analyten werden ausschließlich gleichgeladene Pufferionen verdrängt [31]. Bei ungeladenen Analyten findet dagegen eine Volumenverdrängung statt [32]. Das Detektionssignal wird um die Extinktion der Probenmoleküle erniedrigt, so daß sich für die Größe des Signals Gleichung (15) ergibt.

$$E = (\epsilon_H - \epsilon_A) c_A d \quad (15)$$

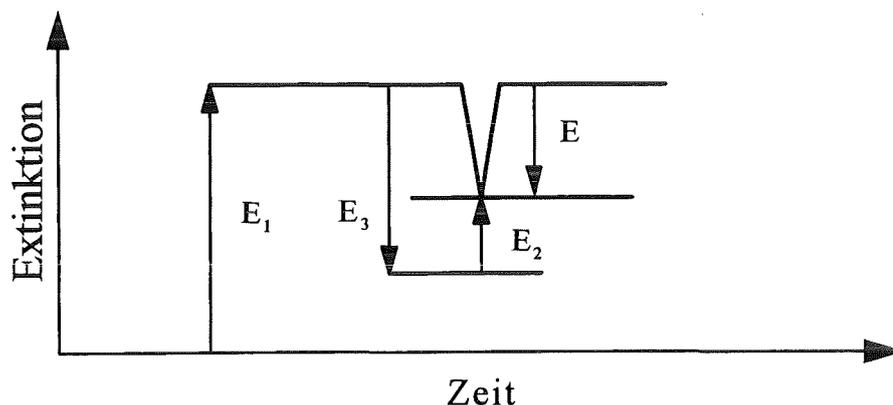
E : Extinktion

ϵ_H : Extinktionskoeffizient des Hintergrundelektrolyten

ϵ_A : Extinktionskoeffizient des Analyten

c_A : Konzentration des Analyten

d : Schichtdicke



E : Extinktionssignal; E_1 : Extinktion des Hintergrundelektrolyten;

E_2 : Extinktion der Probe; E_3 : Erniedrigung des Hintergrundsignals ohne
Eigenabsorption der Probe

Abbildung (32): Prinzip der indirekten UV-Detektion

Zur Detektion von Anionen, die keine oder eine nur sehr geringe UV-Absorption zeigen, muß ein Hintergrundelektrolyt verwendet werden, dessen Anionen eine sehr hohe UV-Absorption besitzen und eine ähnliche Mobilität wie die der Probenionen aufweisen. Wandern die Anionen der Probe

schneller als das verdrängte Ion des Hintergrundelektrolyten, entstehen Peaks mit Leading. Wandern sie langsamer, erhält man Peaks mit Tailing.

Zur Detektion von Anionen mit mittlerer und hoher Mobilität hat sich das Chromation (Mobilität: ca. $0,8\text{cm}^2\text{ kV}^{-1}\text{ s}^{-1}$) in schwefelsaurer Lösung bewährt, wobei Chromatkonzentrationen von 2 mmol L^{-1} bis 10 mmol L^{-1} eingesetzt werden [33], [34].

Da Anionen gegen den EOF migrieren, können bei einer normalen Detektionsanordnung (kathodenseitige Detektion) keine schnell wandernden Probenionen detektiert werden. Durch eine Umpolung der Spannungsquelle kann eine Bestimmung dieser schnellen Anionen stattfinden. Dann wandern jedoch die langsamen Anionen nach der Probenaufgabe wieder in das Puffergefäß zurück. Um sowohl langsame, als auch schnelle Anionen erfassen zu können, muß deshalb neben der Umpolung eine Umkehr des EOF erfolgen.

Die EOF-Umkehr wird häufig durch quaternäre Ammoniumverbindungen (kationische Tenside) hervorgerufen und ist auf die Ausbildung einer Doppelschicht an der Kapillarwand zurückzuführen.

Die Adsorption des kationischen Tensids an die Kapillarwand erfolgt durch eine Wechselwirkung des positiv geladenen Molekülteils mit den negativ geladenen Silanolgruppen auf der Kapillaroberfläche.

Durch hydrophobe Wechselwirkungen wird auf dieser monomolekularen Belegung eine zweite Schicht angelagert, welche nun mit den positiven Ladungen des kationischen Tensids ins Innere der Kapillare zeigt. Die positiven Ladungen an der Außenseite dieser Doppelschicht sind die Ursache für den elektroosmotischen Fluß, der folglich nicht mehr kathodisch ist, sondern zur Anode verläuft.

3.5.2 Durchführung der Anionentrennung

Um das Detektionsprinzip der indirekten UV-Detektion zu testen, wurde für die zweite Trennung ein Testgemisch aus 8 Anionen (Bromid, Chlorid, Sulfat, Nitrit, Nitrat, Fluorid, Hydrogenphosphat, und Hydrogencarbonat) verwendet. In der wässrigen Standardlösung betrug die Konzentration jedes Anions 125 ppm.

Zu 200 ml einer 5 mmol wässrigen Na_2CrO_4 -Lösung (Merck Darmstadt) wurden 5 ml eines kationischen Tensids (CIA-Peak OFM Anion-BT Solution (Waters Division of Millipore)) gegeben. Die chemische Zusammensetzung dieses Tensids wird von der Firma nicht angegeben. Anschließend erfolgte mit 0,05 m H_2SO_4 eine Abstumpfung auf einen pH-Wert von 8,05. [35].

Die Trennung erfolgte in einer 75 μm Kapillare mit einer Gesamtlänge L von 59,9 cm. Bei der Probenaufgabe betrug die Aufgabespannung 15 s lang 1 kV. Die Trennungsspannung lag bei 20 kV. Detektiert wurde nach einer effektiven Kapillarlänge l_{eff} von 50 cm bei 254 nm. Bei dieser Wellenlänge ist die Absorption des Hintergrundelektrolyten deutlich höher als die Eigenabsorption der Analyten [35].

Ein Elektropherogramm der Trennung ist in Abbildung (33) dargestellt:

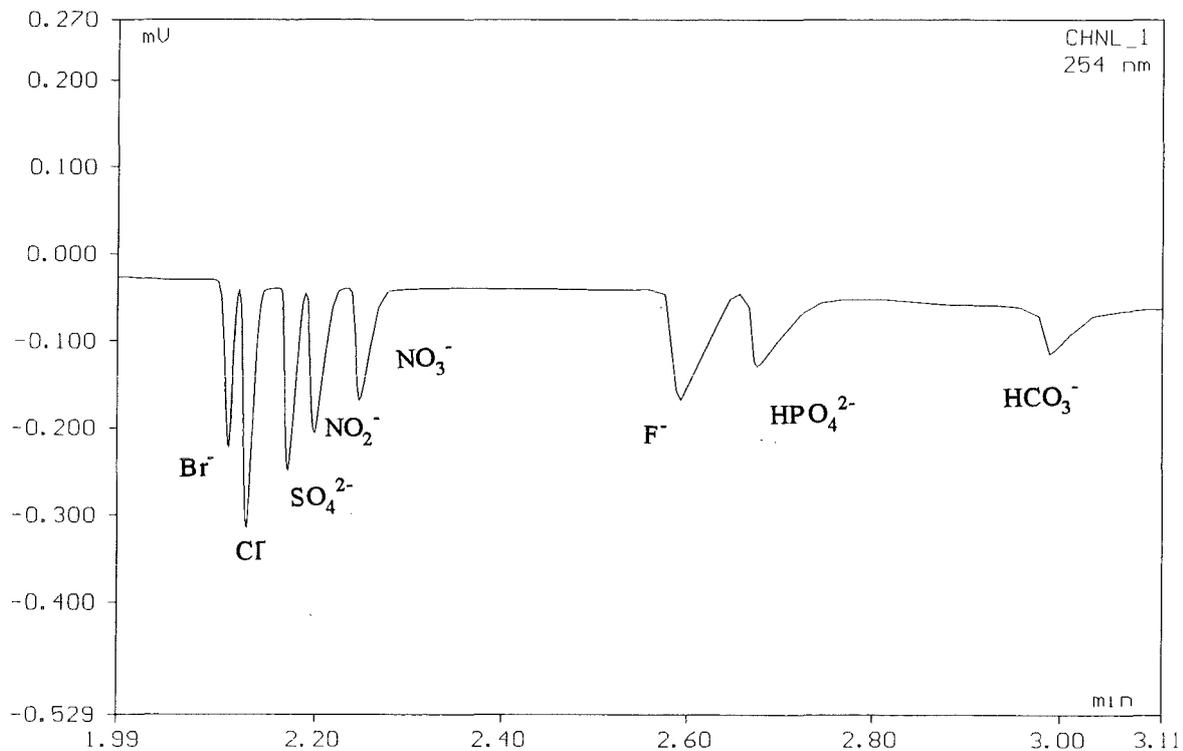


Abbildung (33): Elektropherogramm der Anionentrennung

Wie aus Abbildung (33) zu erkennen ist, konnte die Trennung der acht Anionen in weniger als drei Minuten erfolgen (Detektion von Bromid bei 2,08 min, von Hydrogencarbonat bei 2,99 min). Dies stellt eine auffallend kurze Analysenzeit dar.

Da alle Analyten negativ geladen sind, sind die Vorzeichen aller elektrophoretischen Mobilitäten μ_{ep} positiv. Deshalb entscheidet allein deren Betrag über die Detektionsreihenfolge der Anionen.

3.5.3 Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und deren Abhängigkeit von der Konzentration des Hintergrundelektrolyten

Um die Migrationszeiten der Anionentrennung auf ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden 11 Messungen durchgeführt und die Mittelwerte der Migrationszeiten, sowie die Relativen Standardabweichungen RSD ermittelt.

In Tabelle (7) sind die Ergebnisse der Berechnungen dargestellt.

	<i>Mittelwerte der Migrationszeiten / min</i>	<i>RSD / %</i>
Bromid	2,06	1,1
Chlorid	2,08	0,98
Sulfat	2,12	1,19
Nitrit	2,16	0,93
Nitrat	2,2	1,08
Fluorid	2,53	1,51
Hydrogenphosphat	2,59	2,34
Hydrogencarbonat	2,85	7,09

Tabelle (7): Mittelwerte und Relative Standardabweichungen der Migrationszeiten in einem 5 mmol Natriumchromathintergrundelektrolyten

Bei fast allen Anionen liegen die Relativen Standardabweichungen unter 2,35 %. Eine Ausnahme bildet das Hydrogencarbonat mit 7,09%. Aus den überwiegend niedrigen Werten läßt sich auf eine insgesamt gute Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und geringe EOF-Schwankungen schließen.

Abhängigkeit der Migrationszeiten von der Konzentration des Hintergrundelektrolyten:

Um den Einfluß der Ionenstärke des Hintergrundelektrolyten auf die Migrationszeiten der Anionen zu untersuchen, erfolgten außerdem Trennungen in einem 7 mmol bzw. 9 mmol Hintergrundelektrolyten. Die Mittelwerte der Migrationszeiten, die aus jeweils 10 Messungen resultierten, wurden mit den Ergebnissen aus Tabelle (7) als Funktion der Konzentration aufgetragen.

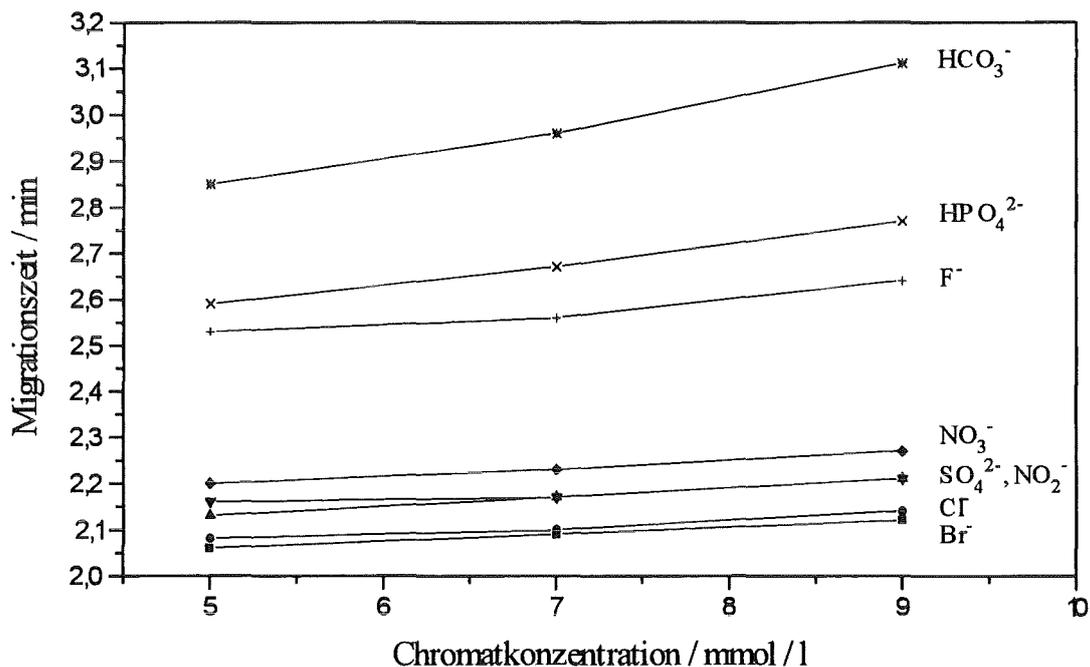


Abbildung (34): Die Migrationszeit als Funktion der Konzentration des Hintergrundelektrolyten

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, nehmen die Migrationszeiten der Anionen mit steigender Chromatkonzentration zu. Die Zunahme der Ionenstärke des Hintergrundelektrolyten führt zu längeren Migrationszeiten, da sich daraus eine Abnahme des ζ -Potentials ergibt. Dies hat nach Gleichung (4) eine EOF-Abnahme zur Folge.

Gleichzeitig führen höhere Ionenstärken zu höheren Feldstärken, die für eine Zunahme der Trenneffizienz verantwortlich sind [25]. Außerdem treten geringe Selektivitätsveränderungen auf, welche sich am deutlichsten bei pH 7 zeigen: Sulfat- und Nitritpeak fallen zusammen.

3.5.4 Quantitative Analyse der Anionen

Ebenso wie bei den Vitaminen wurden für die 8 Anionen Konzentrationsreihen erstellt und deren Nachweisgrenzen nach der IUPAC-Konvention bestimmt (3.5.4). In den Abbildungen (35)-(42) sind die ermittelten Eichreihen dargestellt, welche die Peakfläche (mV min) als Funktion der Konzentration aufzeigen.

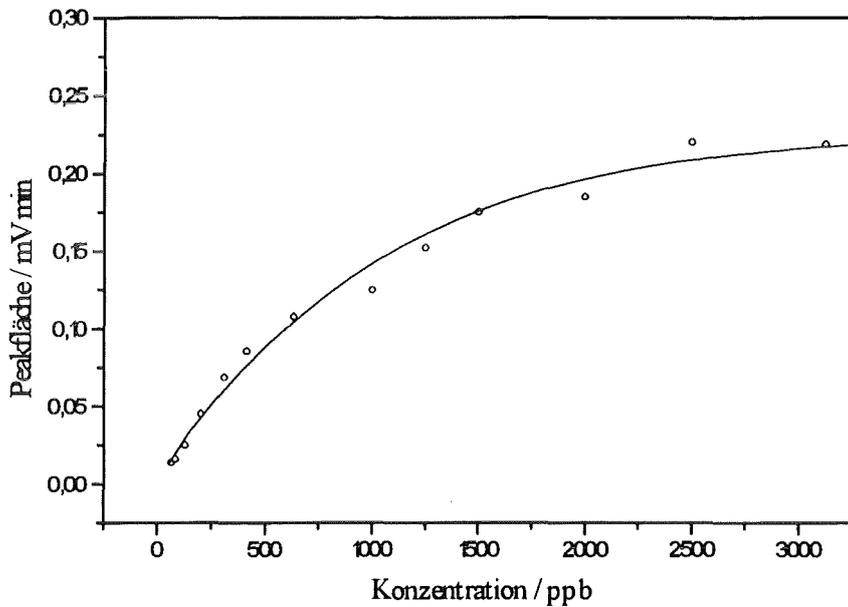


Abbildung (35): Konzentrationsreihe des Bromids

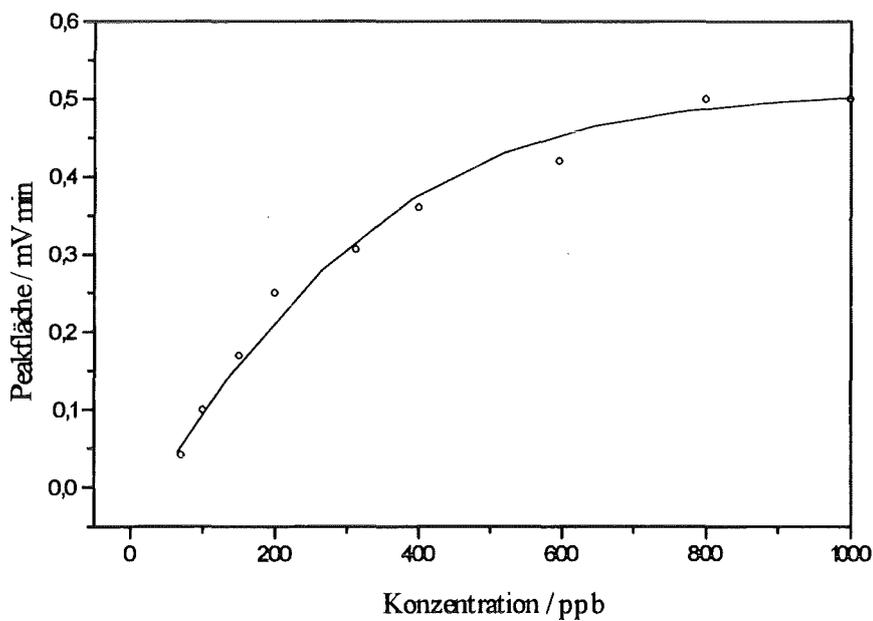


Abbildung (36): Konzentrationsreihe des Chlorids

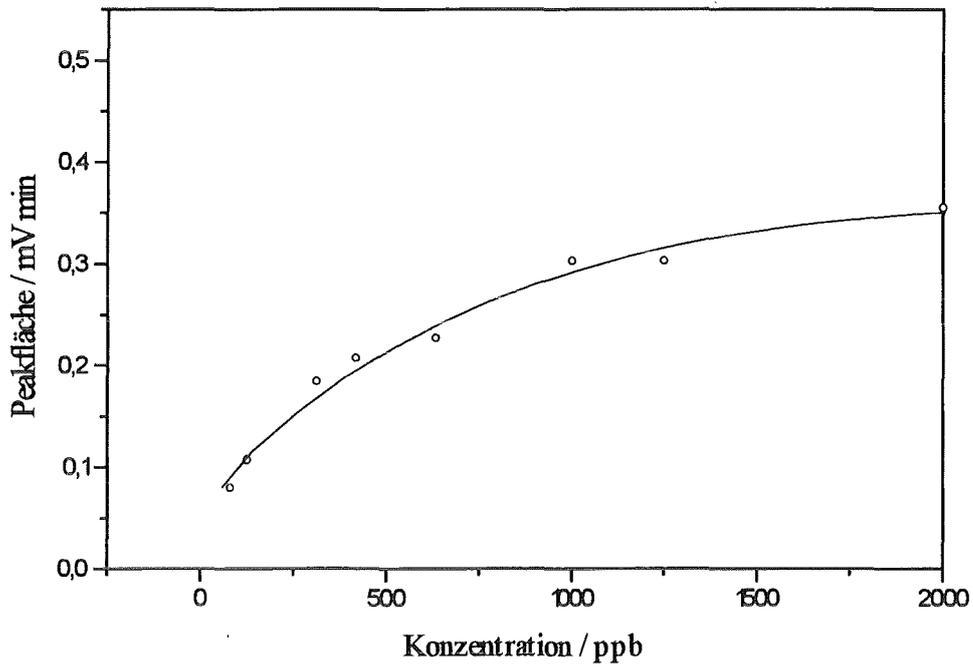


Abbildung (37): Konzentrationsreihe des Sulfats

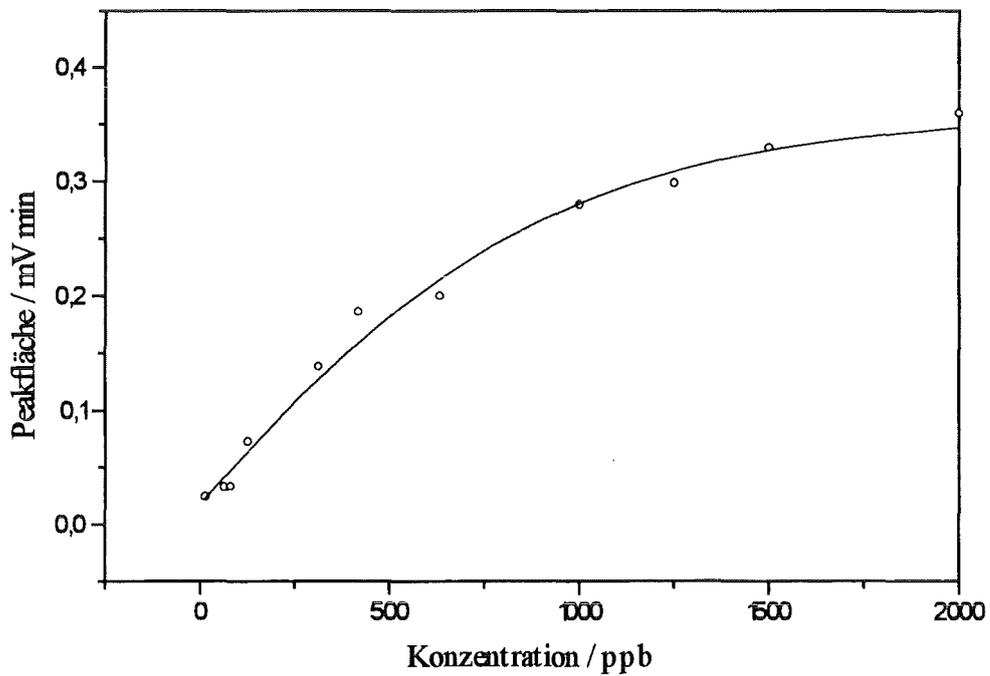


Abbildung (38): Konzentrationsreihe des Nitrits

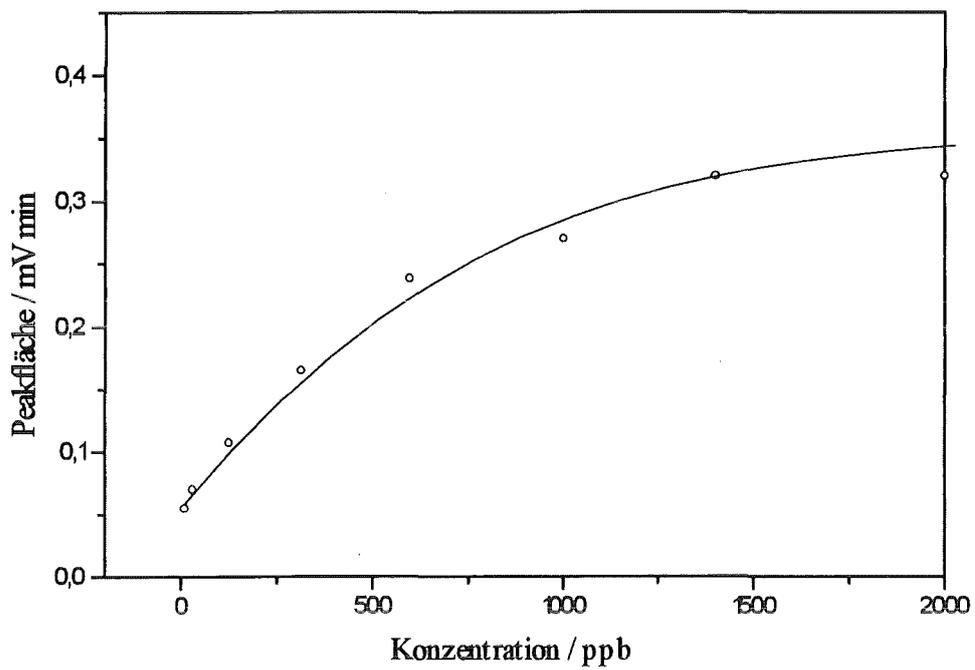
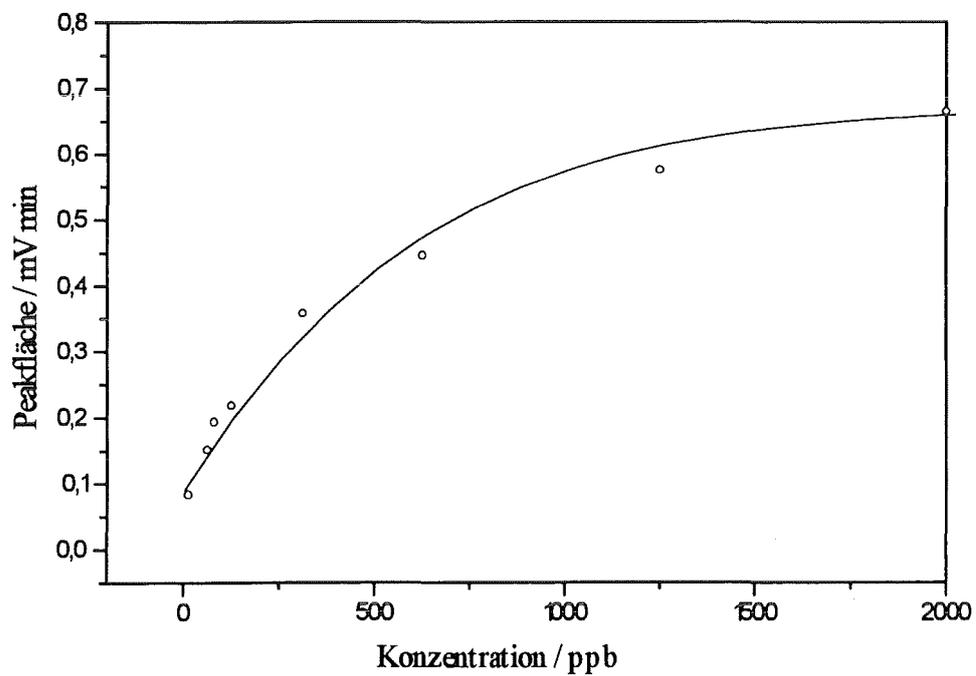


Abbildung (39): Konzentrationsreihe des Nitrats



Abbildung(40): Konzentrationsreihe des Fluorids

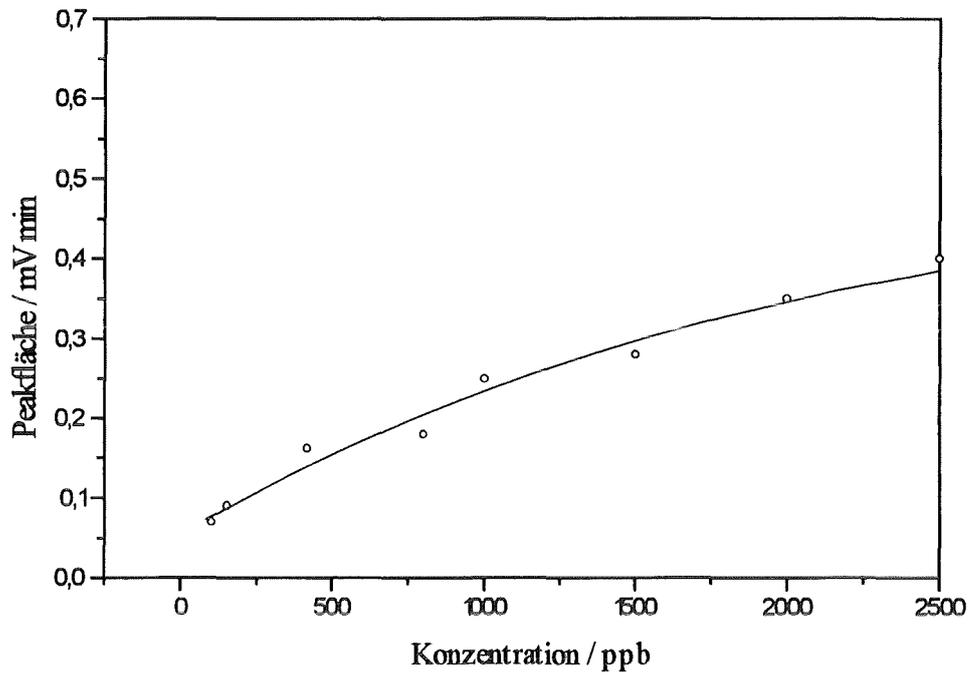


Abbildung (41): Konzentrationsreihe des Hydrogenphosphats

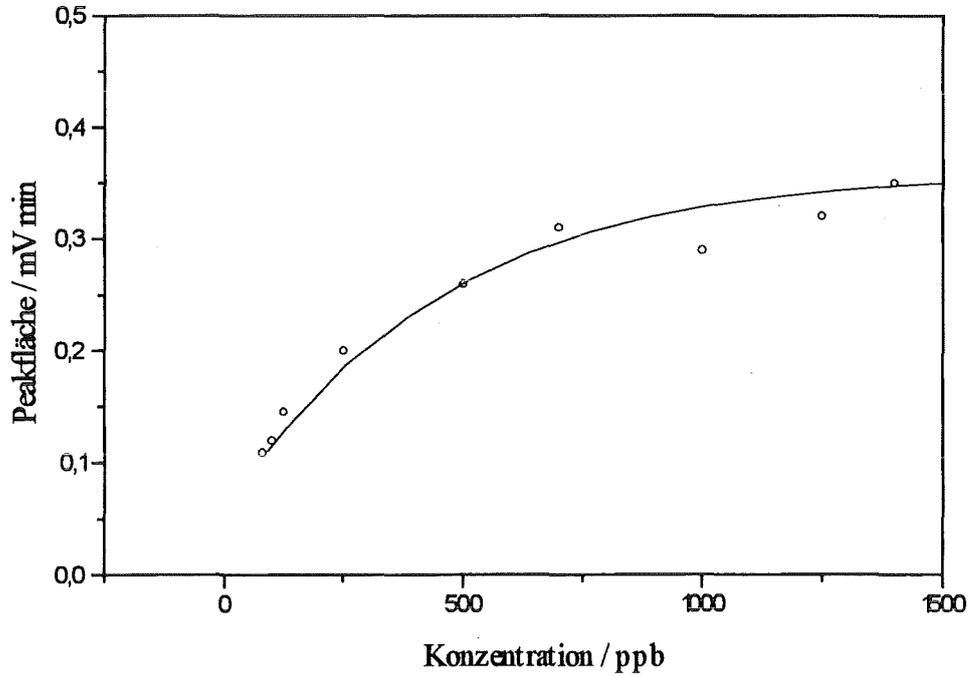


Abbildung (42): Konzentrationsreihe des Hydrogencarbonats

Die acht Konzentrationsreihen zeigen einen vergleichbaren Verlauf: Nach einem steilen Anstieg im Konzentrationsbereich der Nachweisgrenzen, flachen die Kurven ab und gehen in einen linearen Verlauf über. Bei der Kurve des Hydrogenphosphats Abbildung (41), ist die Krümmung am geringsten ausgeprägt.

Die genauen Werte der Nachweisgrenzen sind der Tabelle (9) zu entnehmen:

	<i>Nachweisgrenzen / ppb</i>
Bromid	63
Chlorid	80
Sulfat	25
Nitrit	20
Nitrat	8
Fluorid	13
Hydrogenphosphat	100
Hydrogencarbonat	80

Tabelle (9): Nachweisgrenzen der Anionen

Die Nachweisgrenzen der Anionen hängen vor allem von deren Eigenabsorption bei 254 nm ab. Je stärker die Eigenabsorption eines Anions ausgeprägt ist, desto geringer ist dessen Nachweisempfindlichkeit.

Die beste Nachweisgrenze konnte für das Nitrat mit 8 ppb ermittelt werden. Die Werte der anderen Anionen liegen zwischen 12 und 101 ppb.

Die Detektionsgrenzen der 8 Anionen liegen deutlich unter den aus der quantitativen Analyse der 3 Vitamine ermittelten Werte (Tab. 5): Dies ist vor allem auf den längeren Absorptionsweg in der verwendeten 75 µm Kapillare zurückzuführen, der nach dem Lambert Beerschen Gesetz (Gleichung 14) zu größeren Extinktionswerten führt. Da bei der indirekten UV-Detektion die elektrokinetische Probenaufgabe kathodenseitig erfolgt, können die Nachweisgrenzen durch Diskriminierungseffekte nicht verschlechtert werden, wie dies bei der Nicotinsäure aufgrund der anodenseitigen Probenaufgabe der Fall ist.

3.6 Vergleich quantitativer Bestimmungen mit Referenzanalytikmethoden

Um die quantitativen Ergebnisse der Kapillarzonenelektrophorese CZE mit zwei Referenzanalytischen Methoden zu vergleichen, kamen die wellenlängendispersive Röntgenfluoreszenzanalyse

(RFA) und die (Ionensensitive-Elektroden)-Potentiometrie zum Einsatz, die im Rahmen eines anderen Arbeitsprogramms des IRCHs routinemäßig durchgeführt wurden. Analysiert wurden dabei 10 wässrige Chloridlösungen, die bei Umsetzungen von Dichlormethan mit Wasserstoffperoxid und Wasser nach einer anschließenden Neutralisation angefallen waren.

Bei der wellenlängendispersiven RFA wird die Probe durch Röntgenstrahlung angeregt. Sie emittiert wiederum Röntgenstrahlung, deren Wellenlänge von den in der Probe vorhandenen Elementen abhängt. Diese Strahlung wird auf einen Kristall gelenkt und an den Netzebenen gebeugt. Die gebeugte Strahlung wird mit einem Strahlendetektor registriert und von einem Rechner ausgewertet.

Bei der (ISE)-Potentiometrie wird die Potentialdifferenz, die eine Indikatorelektrode während der Titration gegen eine Referenzelektrode mit konstantem Potential zeigt, gemessen. Die Indikatorelektroden arbeiten nach dem Prinzip der Glaselektrode. Das Membranpotential zwischen Elektrode und Lösung, das für das im Gleichgewicht befindliche Ion spezifisch ist, wird durch eine Ionenaustauschermembran bedingt. Bei der Chloridbestimmung wird mit Silbernitrat titriert, während eine Silbersulfid-Membran [36] zur Bestimmung des Äquivalenzpunktes eingesetzt wird.

In Tabelle (10) sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen zusammengefaßt:

<i>Proben Nr.</i>	<i>CZE Konz. (mol / l)</i>	<i>ISE/Potentiometrie Konz. (mol / l)</i>	<i>RFA Konz. (mol / l)</i>
1	0,117	0,117	0,123
2	0,137	0,12	0,113
3	0,128	0,112	0,109
4	0,135	0,116	0,113
5	0,242	0,23	0,216
6	0,199	0,174	0,176
7	0,159	0,175	0,173
8	0,091	0,103	0,104
9	0,327	0,307	0,283
10	0,334	0,31	0,315

Tabelle (10): Vergleich der Ergebnisse quantitativer Chloridbestimmungen

Die Abweichung zwischen den mit der CZE und der ISE-Potentiometrie durchgeführten Chloridmessungen liegt relativ zu den CZE-Messungen zwischen 0 % und 14,07 %. Die mittlere Abweichung liegt dagegen bei 4,67 %.

Beim Vergleich der CZE-Messungen mit den RFA-Messungen ergeben sich Abweichungen zwischen 5,13 % und 17,52 %, wobei die mittlere Abweichung 6,19 % beträgt.

Die geringen mittleren Abweichungen zeigen, daß die Kapillarzonenelektrophorese auch bei quantitativen Analysen durchaus ein konkurrenzfähiges Analytikverfahren darstellt.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine Apparatur zur Kapillarelektrophorese (CE) aufgebaut. Nach einer Überprüfung der Auflösungsverluste durch Thermokonvektion und der pH-Abhängigkeit des Elektroosmotischen Flusses (EOF) erfolgte die Durchführung von zwei Trennungen. Bei der ersten Trennung wurden Vitamine durch direkte UV-Detektion, bei der zweiten Trennung Anionen durch indirekte UV-Detektion nachgewiesen.

Die Apparatur bestand im wesentlichen aus einer Hochspannungsquelle, einem Detektor und zwei Puffergefäßen. Die für diese Arbeit gewählte Anordnung ist in Kapitel 3.1 detailliert beschrieben. Insbesondere konnten durch den gewählten Aufbau Spannungsüberschläge vermieden und eine optimale Fixierung der Kapillarenden auf gleichen Höhenniveaus realisiert werden.

Bei den verwendeten Trennkapillaren wurde die Zunahme des Stroms in Abhängigkeit von der Spannung untersucht. Es zeigte sich, daß das Ohmsche Gesetz bei höheren Feldstärken seine Gültigkeit verliert, da nicht mehr die gesamte Wärme abgeführt werden kann. Deshalb steigt die Leitfähigkeit überproportional mit der angelegten Spannung an.

Der EOF wurde als Funktion des pH-Wertes untersucht. Hierbei ergab sich ein s-förmiger Kurvenverlauf, der durch das Doppelschichtmodell von Helmholtz und Stern erklärt werden kann (vgl. 2.3.1).

Die erste Trennung wurde am Beispiel der wasserlöslichen Vitamine Thiaminhydrochlorid, Nicotinamid und Nicotinsäure in einer mit einem 20 mmol Phosphatpuffer pH 7 gefüllten Kapillare von 50 µm Innendurchmesser durchgeführt. Die Probenaufgabe erfolgte dabei elektrokinetisch. Da die Vitamine bei einer Wellenlänge von 215 nm eine sehr hohe UV-Absorption zeigen, konnten sie durch eine direkte UV-Detektion kathodenseitig nachgewiesen werden.

Die Relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten waren bis auf die der Nicotinsäure sehr gering (Thiaminhydrochlorid: 1,12 %, Nicotinamid: 3,21 %, Nicotinsäure: 9,5 %).

Aus den Migrationszeiten ergaben sich die Mobilitäten und die aufgegebenen Probenmengen. Die Relativen Standardabweichungen (RSD) der aufgegebenen Probenmengen waren ebenfalls gering und lagen für alle drei Vitamine unter 6,19 % (siehe 3.5.2).

In einem weiteren Experiment zeigte sich, daß ein linearer Zusammenhang zwischen der Probenaufgabemenge und der Aufgabespannung, bzw. der Aufgabezeit vorliegt.

Außerdem resultierte aus einer zunehmenden Probenaufgabezeit, bzw. -spannung eine Abnahme der Auflösung.

Bei der quantitativen Analyse der Vitamine ergaben sich aufgrund des kurzen Absorptionsweges in der verwendeten 50 µm Kapillare nur geringe Nachweisempfindlichkeiten: Für Thiaminhydrochlorid 404 ppb, für Nicotinamid 97 ppb und für Nicotinsäure 616 ppb.

Der Einfluß der Ionenstärke eines Puffers auf die Peakform, und somit auf die theoretische Bodenzahl, wurde am Beispiel eines 20 mmol Boratpuffers illustriert. Bei allen drei Vitaminen nahmen mit der Ionenstärke die theoretischen Bodenzahlen, und somit die Trenneffizienzen, zu. Außerdem konnte mit einer Zunahme der Ionenstärke eine Abnahme des EOF verzeichnet werden.

Bei der Durchführung einer zweiten Trennung wurden acht Anionen (Bromid, Chlorid, Sulfat, Nitrit, Nitrat, Fluorid, Hydrogenphosphat und Hydrogencarbonat) getrennt. Da sie keine, oder nur eine sehr geringe UV- Absorption zeigen, mußte das Prinzip der indirekten UV-Detektion angewandt werden. Dabei kam ein Chromathintergrundelektrolyt pH 8,05 mit einer sehr hohen UV-Absorption in einer 75 µm Kapillare zum Einsatz. Um die schnellen und langsamen Anionen gleichzeitig erfassen zu können, wurde der Hintergrundelektrolyt mit einem kationischen Tensid versetzt. Die Detektion erfolgte anodenseitig bei 254 nm.

Im Anschluß daran wurden nach einer elektrokinetischen Probenaufgabe die Mittelwerte der Migrationszeiten bestimmt.

Die Relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten fast aller Anionen lagen unter 2,35%. Eine Ausnahme bildete das Hydrogencarbonat mit einer Abweichung von 7,09 %.

Durch weitere Trennungsvorgänge mit variierten Hintergrundelektrolytkonzentrationen (7 mmol und 9 mmol) konnte auch bei der Anionentrennung gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Ionenstärke der Elektrolytlösung mit einer Abnahme des EOF verbunden ist und deshalb zu einer Zunahme der Migrationszeiten und geringen Selektivitätsänderungen führt.

Im Rahmen der quantitativen Analyse ergaben sich folgende Nachweisgrenzen: Bromid: 63 ppb, Chlorid: 80 ppb, Sulfat: 25 ppb, Nitrit: 20 ppb, Nitrat: 8 ppb, Fluorid: 13 ppb, Hydrogenphosphat: 100 ppb, Hydrogencarbonat: 80 ppb.

Um die mit der CE-Apparatur ermittelten quantitativen Werte zu überprüfen, wurden diese am Beispiel wässriger Chloridlösungen mit den Ergebnissen aus der Röntgenfluoreszeanalyse und der Potentiometrie verglichen. Die relativ gute Übereinstimmung der ermittelten Werte zeigte, daß die CE auch bei quantitativen Analysen ein konkurrenzfähiges Verfahren darstellt.

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse lassen sich zusammenfassend folgende Vorteile der CE benennen:

- **Geringe Probenmengen reichen zur Durchführung einer Trennung aus**
- **Vor allem bei der Anionentrennung fällt eine sehr kurze Analysenzeit auf**
- **Insgesamt wird eine hohe Trenneffizienz erreicht**

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen kann das Erreichen noch besserer Nachweisgrenzen durch eine Detektion mit der thermischen Linse erprobt werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] W. B. Hardy, *J. Physiol.* , 33 (1905) 273
- [2] J. Kendall und C. Crittenden, *Proc. Nat. Acad. Sci.* , 9 (1923) 75
- [3] A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.* , 33 (1937) 524
- [4] A. Tiselius, *Nova Acta Reg. Soc. Sve. Sci, Upsala.* , 4,7 no 4 (1930)
- [5] A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.* , 33 (1937) 524
- [6] A. Tiselius, *Kolloid-Zeitschrift*, 85 (1938) 129
- [7] J. Porath, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 151
- [8] T. Wieland, E. Fischer, *Naturwissenschaften* 35, (1958) 29
- [9] S. Hjertén, *Arkiv. Chem.*, 13 (1958) 151
- [10] S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.* 9, (1967) 122
- [11] R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand. Chem. Incl. Metall. Ser.* 123 (1974) 1
- [12] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169 (1979) 11
- [13] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 209
- [14] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298
- [15] W. G. Kuhr und C. A. Monning, *Anal. Chem.* , 64 (1992) 389
- [16] P. G. Righetti, *Isoelectric Focusing*, Elsevier, Amsterdam (1983)
- [17] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese*, Vieweg Verlag (1994)
- [18] A. Chrambach, M. J. Dunn, B. J. Radola (Hrsg), VCH, Weinheim (1989)
- [19] M. H. Kleemiß, *Dissertation*, Marburg (1993)
- [20] G. Kortüm, *Lehrbuch der Elektrochemie*, 4. Auflage, Weinheim (1966)
- [21] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Weinheim (1982) 723
- [22] A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surface*
(4th Edition), New York (1991)
- [23] T. S. Stevens and H. J. Cortes, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1365
- [24] S. Hjertén, *Electrophoresis* 11 (1990) 665
- [25] A. G. Ewing, A. Wallingford, *Advances in chromatogr.* Vol 29,
New York und Basel (1989)
- [26] *International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*; 45, (1976) 101
- [27] H. Kaiser, *Anal. Chem.* (1965) 209
- [28] D. S. Stegehuis, H. Irth, V. R. Tjaden, J. van der Graaf, *J. Chromatogr.* 538 (1991) 393

- [29] E. Leibnitz, H. G. Struppe, *Handbuch der Gaschromatographie*, Leipzig (1984)
- [30] C. Haber, I. Silvestri, S. Rösli, W. Simon, *CHIMIA*, 45 (1991) 117
- [31] M. Ackermans, F. M. Everaets, J. L. Beckers, *J. Chromatogr.*, 549 (1991) 335
- [32] R. Szücs, J. Vindevogel, P. Sandra, *HRC* 14 (1991) 692
- [33] B. J. Wildman, P. E. Jackson, W. R. Jones, P. G. Alden, *J. Chromatogr.*, 546 (1991) 431
- [34] J. Romano, P. Jandik, W. R. Jones, P. E. Jackson, *J. Chromatogr.*, 546 (1991) 411
- [35] P. Jandik, W. R. Jones, *Journal of Chromatography*, 546 (1991) 431
- [36] U. R. Kunze, *Grundlagen der quantitativen Analyse*, Thieme 1986