

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5823

Die Thermische Linse als Detektorsystem für die Kapillarelektrophorese und die Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie

E. Steinle

Institut für Instrumentelle Analytik
Projekt Mikrosystemtechnik

November 1996

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt
Wissenschaftliche Berichte
FZKA 5823

**Die Thermische Linse als Detektorsystem für die
Kapillarelektrophorese und die
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Elke Steinle

Institut für Instrumentelle Analytik
Projekt Mikrosystemtechnik

Von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe (TH)
angenommene Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
1996

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Die Thermische Linse als Detektorsystem für die Kapillarelektrophorese und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

In der vorliegenden Arbeit wird die Anpassung der Thermischen Linse an die Kapillarelektrophorese und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie beschrieben und die Eignung der Thermischen Linse als Detektor getestet. Dazu wurden unter anderem die Nachweisgrenzen die mit der Thermischen Linse erhalten wurden mit denen eines konventionellen UV-VIS-Detektors verglichen.

Der Aufbau der Thermischen Linse wurde so gewählt, daß durch entsprechende Strahlführung der Laserstrahlen ein kompakter Aufbau der Thermischen Linse ermöglicht wurde. Diese sogenannte Nahfeld-Thermische Linse konnte erfolgreich als Detektor für die Kapillarelektrophorese und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie eingesetzt werden.

Bei der Kapillarelektrophorese wurde sowohl eine indirekte als auch eine direkte UV-Detektion (364 nm) durchgeführt. Für die indirekte UV-Detektion wurden die Anionen Bromid, Sulfat und Nitrat mit Chromat als Hintergrundelektrolyt (pH 8,0) getrennt.

Bei der direkten UV-Detektion wurden 2,4-Dinitrophenol und Dinitroorthokresol mit der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie getrennt. Hierbei wurde mit der Thermischen Linse ein um den Faktor 50 bessere Nachweisgrenze als mit einem kommerziellen UV-Detektor erhalten.

Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie kamen die kollineare und transversale Thermische Linse zum Einsatz. Erstmals wurde die Thermische Linse auch für die Detektion mit einem Lösungsmittelgradienten eingesetzt. Dabei wurden sowohl Trennungen mit einem Stufengradienten als auch mit einem linearen Lösungsmittelgradienten durchgeführt. Bei der Detektion mit einem linearen Lösungsmittelgradienten erhält man ein erhöhtes Basislinienrauschen gegenüber Trennungen, die unter isokratischen Bedingungen durchgeführt werden.

Für isokratische Trennungen wurde mit der kollinearen Thermischen Linse eine um eine Größenordnung bessere Nachweisgrenze erhalten als mit einem UV-VIS-Detektor.

Summary

The thermal lens used as a detector for capillary electrophoresis and for high performance liquid chromatography

This work describes the adaption of the thermal lens at the capillary electrophoresis and the high performance liquid chromatography and proved (tested) the useability as a detector. The limits of detection (LOD) received from the thermal lens were compared with a conventional UV-VIS-detektor.

The two laser beams were guided in a special way so a miniaturized thermal lens was obtained. This so called near field thermal lens was successfully used as a detector for capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography.

In the capillary electrophoresis direct and indirect UV-detection were used. For the indirect UV-detection the anions bromide, sulfate and nitrate were separated with chromate as background electrolyte (pH 8.0).

For the direct UV-detection 2,4-Dinitrophenol and Dinitroortocresol was separated with the micellar electrokinetic chromatography. The thermal lens detection is 50 times more sensitive as a commercial UV-detector.

In the high performance liquid chromatography the collinear and transversal arrangement was used. For the first time the thermal lens was performed for gradient elution. Small changes of the eluent composition were obtained with linear gradients and large changes with step wise gradients. For the detection with a linear gradient a higher noise of the baseline is obtained compared to the isocratic conditions. For the isocratic separation the detection limit with the thermal lens is one magnitude superior as with a commercial UV-detector.

1	Einleitung	1
2	Grundlagen der Detektion	5
2.1	UV-VIS-Detektor	5
2.2	Thermische Linse	5
2.2.1	Signaldetektion bei der Thermischen Linse	7
3	Kapillarelektrophorese	9
3.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese	9
3.1.1	Elektrophoretische Wanderung	9
3.1.2	Elektroosmotischer Fluß	10
3.1.3	Elektrophoretische Trennung	11
3.2	Experimenteller Teil	11
3.2.1	Aufbau der Kapillarelektrophorese	11
3.2.2	Aufbau der Thermischen Linse	14
3.2.2.1	Elektronische Meßwerterfassung	16
3.2.3	Messungen mit der Thermischen Linse	17
3.2.4	Indirekte Detektion	18
3.2.5	Direkte Detektion	19
3.3	Ergebnisse und Diskussion	21
3.3.1	Die apparativen Einflußparameter	21
3.3.1.1	Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung	21
3.3.1.2	Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz	22
3.3.1.3	Abhängigkeit des TL-Signals von der Wanderungsgeschwindigkeit	24
3.3.1.4	Nachweisgrenze als Beurteilungskriterium	26
3.3.1.5	Definition der Nachweisgrenze	27
3.3.2	Indirekte Detektion	28
3.3.3	Direkte Detektion	30
4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	37
4.1	Einführung in die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	37
4.1.1	Reversed-Phase-Chromatographie	38
4.1.2	Ionenpaarchromatographie	39
4.1.3	Durchführung der chromatographischen Trennungen	39
4.2	Experimenteller Teil zur cw-modulierten Thermischen Linse	40
4.2.1	HPLC-Anlage	40
4.2.2	Aufbau der cw-modulierten Thermischen Linse	41
4.2.2.1	Kollinearer Aufbau der cw-modulierten Thermischen Linse	41
4.2.2.2	Aufbau der cw-modulierten transversalen Thermischen Linse	44
4.2.3	Verwendete Substanzen und Reagenzien	46

4.3	Ergebnisse und Diskussion der cw-modulierten Thermischen Linse	47
4.3.1	Die Abhängigkeit des TL-Signals von der Durchflußgeschwindigkeit	47
4.3.2	Kollinearer und transversaler Aufbau im Vergleich	51
4.3.3	Detektion bei Isokratischen Trennungen	53
4.3.4	Detektion von Lösungsmittelgradienten	62
4.3.4.1	Abhängigkeit des Thermischen Linsen-Signals vom Lösungsmittel	62
4.3.4.2	Detektion von Stufengradienten	64
4.3.4.3	Detektion von Trennungen mit einem Stufengradienten	69
4.3.4.4	Detektion von linearen Lösungsmittelgradienten	74
4.3.4.5	Detektion von Trennungen mit einem linearen Lösungsmittelgradienten	76
4.3.4.6	Abschließender Vergleich der Ergebnisse bei der Detektion von Gradienten	82
4.4	Experimenteller Teil zur gepulsten Thermischen Linse	84
4.4.1	Aufbau der gepulsten Thermischen Linse	84
4.4.1.1	Elektronische Meßwerterfassung	85
4.4.2	Verwendete Substanzen und Reagenzien	87
4.5	Ergebnisse und Diskussion zur gepulsten Thermischen Linse	89
4.5.1	Die Abhängigkeit des gepulsten TL-Signals von der Durchflußgeschwindigkeit	89
4.5.2	Detektion bei isokratischer Trennung der Harnstoffherbizide	90
4.5.3	Lösungsmittelgradienten	96
4.5.3.1	Detektion von Stufengradienten	96
4.5.3.2	Detektion von linearen Lösungsmittelgradienten	97
4.6	Abschließende Diskussion der gepulsten Thermischen Linse und Vergleich mit der cw-modulierten Thermischen Linse	98
5	Zusammenfassung	99
6	Anhang	102
	Anhang A: Die Temperaturverteilung	102
	Anhang B: Das Thermische Linsen-Signal S (t)	104
	Anhang C: Schaltbild des Lichtleistungs - Spannungs - Verstärkers	106
	Anhang D: Kalibrierkurven	107
7	Literaturverzeichnis	118

1 Einleitung

Die Entwicklung der Kapillarelektrophorese (CE) begann mit den Pionierarbeiten von Mikkers [MIKKERS ET AL.] Ende der 70er Jahre und Jorgenson und Lukacs [JORGENSEN UND LUKACS] zu Beginn der 80er Jahre. Der Durchbruch der Methode wurde durch den Einsatz von Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 μm - 100 μm mit einer hohen Transparenz im UV-Bereich erreicht. Diese ermöglichten die Detektion der getrennten Substanzen direkt in der Kapillare. Anfangs wurde die CE nur im biochemischen Bereich zur Trennung von Proteinen und Aminosäuren eingesetzt [MAZZEO UND KRULL]. Heute reicht ihr Anwendungsbereich von anorganischen Ionen bis hin zu Viren und Bakterien [GROSSMAN ET AL.]. Die Detektion mit einem UV-VIS-Detektor (mit feststehender oder variabler Wellenlänge, Diodenarray) ist die Standarddetektionsmethode in der CE und in allen kommerziellen Apparaturen integriert. In der Zwischenzeit sind auch Fluoreszenzdetektoren, laserinduzierte Fluoreszenzdetektoren, Leitfähigkeitsdetektoren und Schnittstellen zur Kopplung mit der Massenspektrometrie kommerziell erhältlich.

Ein Nachteil der UV-VIS-Detektion ist die geringe Nachweisempfindlichkeit, welche auf die geringe Schichtdicke der Kapillaren zurückzuführen ist. Hier gilt es neue Verfahren zu entwickeln.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) hat sich in den 60er Jahren aus der Säulenchromatographie entwickelt, als man erkannte, daß die Trennleistung einer Säule mit abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt [MEYER]. Die HPLC bietet sich in vielen Bereichen der Spurenanalytik als Methode der Wahl für die sensitive analytische Auftrennung von Vielkomponentengemischen an. Vor allem für die Trennung von nichtflüchtigen oder thermisch zersetzbaren Substanzen eignet sich die HPLC. Die Anwendungen der HPLC sind so vielfältig, daß hier nur einige genannt werden können. Sie findet z. B. in der Pharmazie [SZEPESI], Medizin [PADADOYANNIS], Biochemie [HENSCHEN ET AL.], Lebensmittelchemie [MACRAE], Polymerchemie [GLÖCKNER] und der analytischen Chemie [AHUJA] große Einsatzgebiete. Als Detektor, für im UV-VIS-absorbierende Substanzen, wird wegen der einfachen Handhabbarkeit überwiegend der UV-VIS-Detektor eingesetzt (mit feststehender oder variabler Wellenlänge, Diodenarray). Je nach der Problemstellung werden auch andere Detektoren [KRAUß UND KRAUß] wie der Brechungsindexdetektor für die Zuckeranalytik, der Leitfähigkeitsdetektor für Ionen, der Fluoreszenzdetektor für fluoreszierende Substanzen, der elektrochemische Detektor [SEIDEL ET AL. 1993] und Radioaktivitätsdetektoren verwendet. In neuester Zeit wird die HPLC mit FTIR-Geräten, Massenspektrometern und NMR-Apparaturen gekoppelt [PATONAY].

Trotz der vielen Möglichkeiten der Detektion ist man auf der Suche nach neuen Detektionsmethoden für die HPLC und CE. Man sucht vor allem nach einer Detektionsmethode mit den gleichen Einsatzmöglichkeiten wie ein UV-VIS-Detektor, jedoch mit einer höheren

Nachweisempfindlichkeit. Als solche Detektionsmethoden bieten sich die photothermischen Verfahren an, die als laserspektroskopische Detektionsverfahren eine hohe Nachweisempfindlichkeit besitzen.

Die photothermischen Verfahren beruhen auf der Umwandlung elektromagnetischer Strahlung in Wärme. Kommt es bei der Einwirkung von Licht auf eine Probe zur Absorption der Strahlung, dann wird von den Molekülen Energie aufgenommen, die auf verschiedenen Wegen wieder abgegeben werden kann. Entscheidend für das Auftreten der photothermischen Effekte ist die Stoßrelaxation. Die absorbierte Energie wird dabei strahlungslos in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Die Unterscheidung der photothermischen Verfahren erfolgt nach den unterschiedlichen Methoden, mit denen dieser Effekt detektiert wird.

Die photopyroelektrische Detektion (PPE) stellt die direkte Erfassung photothermisch erzeugter Wärme dar. Hierbei wird mit Hilfe von pyroelektrischen Detektoren oder Thermoelementen, die sich in direktem Kontakt mit der bestrahlten Probe befinden, kleinste Temperaturänderungen gemessen [TAM].

Die photoakustische Spektroskopie (PA) beruht auf der Detektion von Schallwellen, die durch die photothermisch hervorgerufene Ausdehnung des Mediums entstehen. Diese Schallwellen können entweder mit einem Mikrophon oder mit einem piezoelektrischen Druckaufnehmer aufgezeichnet werden. Erfolgt die Anregung mit einem Laser, so spricht man von der laserinduzierten Photoakustischen Spektroskopie (LIPAS) [HESS].

Die nachfolgend beschriebenen Detektionsmethoden beruhen auf der Brechungsindexänderung, welche durch die Temperaturänderung in der Probe hervorgerufen wird.

Bei der photothermischen Interferometrie (PI) wird der Brechungsindexeffekt interferometrisch detektiert. Hierzu wird die Probe in einen Arm eines Zwei-Strahl-Interferometers gebracht und bestrahlt. Die Brechungsindexänderung verursacht einen Gangunterschied im Meßarm des Interferometers, welcher nach Überlagerung mit dem Referenzarm zu einer Intensitätsänderung des Interferenzbildes führt [DAVIS UND PETUCHOWSKI, MONSON ET AL.].

Bei der photothermischen Ablenkungsspektroskopie (PDS) wird der Detektionslaserstrahl durch das Maximum des Brechungsindexgradienten geführt. In dieser Position erfährt er die größtmögliche Ablenkung, die mit Hilfe eines positionsempfindlichen Detektors gemessen werden kann [GUPTA].

Mit der Thermischen Linse (TL) wird nicht wie bei der PDS die Ablenkung, sondern die Aufweitung des Laserstrahls gemessen. Hierzu wird die Leistungsänderung des Detektionslaserstrahls hinter einer Lochblende definierten Durchmessers mit einem Photodetektor gemessen [GUPTA].

Diese verschiedenen photothermischen Methoden wurden am Institut für Instrumentelle Analytik aufgebaut, weiterentwickelt und miteinander verglichen. Sie werden dort für die unterschiedlichsten analytischen Aufgabenstellungen eingesetzt.

Mit der PAS und der PDS wurden zerstörungsfreie Untersuchungen von Feststoffoberflächen durchgeführt [SALNICK ET AL., DÜBEL ET AL.]. Weitere Arbeitsschwerpunkte lagen in der Untersuchung von Schadstoffen im Spurenbereich in wäßrigen Lösungen. Die Untersuchungen von Schadstoffen in wäßrigen Lösungen wurden mit der LIPAS [ADELHELM, STAHR], der PDS [BOHNERT], der PI [SEIDEL 1995] und der TL [SCHULZ] durchgeführt. Das Problem möglicher auftretender kolloider Bestandteile ist von Khuen mit der PDS untersucht worden [KHUEN]. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Methoden zeigt sich, daß die Thermische Linse in wäßrigen Systemen die empfindlichste Methode ist [FAUBEL ET AL.]. Der Aufbau der Thermischen Linse wurde im Hinblick auf den Einsatz als Detektor für die HPLC von Schulz als Nahfeld-Thermische Linse realisiert. Hierdurch konnte der Detektorkopf drastisch verkleinert werden, ohne daß die Nachweisempfindlichkeit erheblich beeinträchtigt wurde. Die Miniaturisierung bei der Nahfeld Thermischen Linse beruht darauf, daß der Abstand zwischen der Küvette und der Lochblende bzw. der Photodiode auf 0,5 cm reduziert werden konnte. Bei klassischen Aufbauten der Thermischen Linse, die als Detektor für die HPLC eingesetzt wurden, wurden Abstände zwischen 20 cm und 5 m verwendet [BUFFET UND MORRIS 1982, BUFFET UND MORRIS 1983, DELORME, DOVICH ET AL. 1988, LEACH UND HARRIS, NOLAN ET AL. 1987, PANG UND MORRIS, SEPANIAK ET AL., YANG ET AL. 1986, YANG UND HO 1987, XU UND TRAN].

In dieser Arbeitsgruppe wurde die Nahfeld-Thermische Linse erstmals für die HPLC eingesetzt. Schulz [SCHULZ] hat in vorläufigen Experimenten den möglichen Einsatz der Nahfeld-Thermischen Linse als Detektor für die HPLC geprüft. Daher ist es wichtig die anfänglichen Ergebnisse zu vertiefen und die Eignung der Thermischen Linse erstmals für die in der HPLC überaus wichtigen Gradiententrennungen zu testen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Nahfeld-Thermische Linse für die Eignung als Detektor für die HPLC zu testen. Dabei sollten die Untersuchungen mit verschiedenen Durchflußküvetten und unterschiedlichen Strömungsrichtungen durchgeführt werden. Diese Untersuchungen wurden sowohl mit einem kollinearen als auch mit einem transversalen Aufbau und mit cw-modulierter und gepulster Anregung durchgeführt. Eine wichtige Trennmethode in der HPLC ist die Trennung von Substanzgemischen mit Lösungsmittelgradienten. Daher sollte die Eignung der Thermischen Linse auch im Hinblick auf Gradiententrennungen untersucht werden.

Ebenso sollte die Nahfeld-Thermische Linse erstmals als Detektor für die CE aufgebaut und optimiert werden. Hierzu mußte eine Kapillarhalterung konstruiert werden, die es ermöglicht, die Kapillare schwingungsfrei zu halten.

Um die Leistungsfähigkeit der Thermischen Linse als Detektor für die HPLC und CE zu testen, sollte ein Vergleich mit einem kommerziellen UV-VIS-Detektoren durchgeführt werden. Hierzu war es nötig, sowohl für die HPLC als auch für die CE geeignete Trennungen auszuarbeiten.

Im einzelnen lauteten die Aufgaben wie folgt:

HPLC

- Optimierung der Nahfeld Thermischen Linse als Detektionssystem für die HPLC (Miniaturisierung).
- Verwendung verschiedener Küvettengeometrien und Durchflußrichtungen.
- Einsatz von kollinearer und transversaler Thermischen Linse.
- cw-modulierte und gepulste Anregung.
- Ausarbeitung und Anwendung von Gradiententrennungen.
- Vergleich der Leistungsfähigkeit der Thermischen Linse als Detektor für die HPLC mit der konventionellen UV-VIS-Detektion.

CE

- Aufbau der Nahfeld Thermischen Linse als Detektorsystem für die CE.
- Konstruktion einer geeigneten Halterung für die Kapillare
- Ausarbeitung und Anwendung geeigneter Trennungen.
- Vergleich der Leistungsfähigkeit der Thermischen Linse als Detektor für die CE mit der konventionellen UV-VIS-Detektion.

2 Grundlagen der Detektion

2.1 UV-VIS-Detektor

Der UV-VIS-Detektor ist ein Photometer. Gemessen wird die Absorption von Licht im UV-VIS-Bereich. Die Lichtabsorption in diesem Bereich wird durch Elektronenübergänge zwischen verschiedenen Zuständen im Molekül hervorgerufen.

Beim Durchtritt elektromagnetischer Strahlung (Lichtstrahl) durch eine Lösung wird deren Intensität durch Absorption verringert. Die Schwächung des Lichtstrahls wird im Lambert-Beer-Gesetz (siehe Gleichung 2.1) beschrieben.

$$\log \frac{I_0}{I} = A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 2.1}$$

I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes

I : Intensität des geschwächten Lichtes

A : Absorbance

λ : Wellenlänge

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

c : Konzentration

d : Schichtdicke

Die Absorption ist proportional zur Konzentration der zu messenden Substanz und erlaubt so eine schnelle optische Konzentrationsbestimmung. Die eigentliche Meßgröße ist allerdings nicht die Absorption A , sondern die Extinktion E . Unter der Extinktion $E = \log(I_0/I)$ versteht man die gesamte Lichtschwächung durch eine Probe, die sowohl durch die wahre Absorption (Gleichung 2.1) als auch zusätzlich durch Streuung und Reflexion verursacht wird [SCHMIDT].

2.2 Thermische Linse

Die Ausbildung der Thermischen Linse wird durch den photothermischen Effekt, die Umwandlung von Licht in Wärme, verursacht. Bei der Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung auf eine gasförmige, flüssige oder feste Probe kann es zur Absorption eines Teils der Strahlung kommen. Die aufgenommene Energie kann durch unterschiedliche Mechanismen wieder abgegeben werden. Erfolgt die Relaxation ohne Abgabe von Licht, wird die absorbierte Lichtenergie in Form von Wärme an die Lösung abgegeben. Die Desaktivierung der angeregten Zustände kann auch über lichtemittierende Prozesse wie Fluoreszenz und Phosphoreszenz, die mit der strahlungslosen Form der Energieabgabe kon-

kurrieren, erfolgen. Die energetischen Abläufe der Desaktivierung unter der Berücksichtigung der elektronischen Niveaus und der überlagerten Schwingungszustände werden in Jablonski-Diagrammen veranschaulicht [KLESSINGER UND MICHL]. Weiterhin mögliche physikalische oder chemische Vorgänge, wie Phasenübergänge und photochemische Reaktionen müssen ebenfalls betrachtet werden.

Für die Detektion bedeutet dies, daß im Gegensatz zu einem UV-VIS-Detektor, bei dem die gesamte Absorption der Strahlung erfaßt wird, bei der Thermischen Linse nur der Teil der absorbierten Strahlung gemessen wird, welcher in Form von Wärme an das Lösungsmittel abgegeben wird.

Durch die Anregung mit einem Laser wird in der Probe eine räumliche und zeitliche Temperaturverteilung erzeugt. Diese Temperaturverteilung kann unter bestimmten Bedingungen berechnet werden. Die Berechnung der Temperaturverteilung wird in Anhang A beschrieben, dabei wird ein Modell benutzt, das auf den Vorstellungen von Vyas und Gupta [VYAS UND GUPTA, GUPTA] beruht.

Die Aufweitung des Detektionslaserstrahls bei der Thermischen Linse ist abhängig vom radialen Brechungsindexprofil, das durch die Erwärmung der Probe durch den Anregungslaser verursacht wird. Unter Gleichgewichtsbedingungen wird die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Temperatur bei konstantem Druck durch Gleichung 2.2 beschrieben¹.

$$\left(\frac{\partial n}{\partial T}\right)_p = \left(\frac{\partial n}{\partial T}\right)_\rho + \left(\frac{\partial n}{\partial \rho}\right)_T \cdot \left(\frac{\partial \rho}{\partial T}\right)_p \quad \text{Gl. 2.2}$$

Die Änderung des Brechungsindex mit der Temperatur bei konstanter Dichte ist so klein, daß der Term $(\partial n/\partial T)_\rho$ in Gleichung 2.2 vernachlässigt werden kann. Für kleine Änderungen der Temperatur ΔT kann der Temperaturkoeffizient des Brechungsindex als konstant angesehen werden. Für die Brechungsindexänderung Δn kann dann geschrieben werden (Gleichung 2.3):

$$\Delta n = \left(\frac{dn}{dT}\right) \cdot \Delta T \quad \text{Gl. 2.3}$$

Durch Berücksichtigung der durch die Lasereinstrahlung verursachten Temperaturverteilung (Anhang A, Gleichung 6.1) erhält man die örtliche und zeitliche Änderung des Brechungsindex.

Die meisten Flüssigkeiten dehnen sich bei Erwärmung aus, d. h. die Dichte wird geringer und damit der Brechungsindex kleiner. Daraus folgt, daß der Temperaturkoeffizient des

¹Genaugenommen hängt der Brechungsindex auch von der Lichtwellenlänge ab (Dispersion).

Brechungsindex (dn/dT) für die meisten Flüssigkeiten negative Werte annimmt [FANG UND SWAFFORD].

2.2.1 Signaldetektion bei der Thermischen Linse

Eine typische Konfiguration für die Detektion der Thermischen Linse ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Durch den Anregungslaserstrahl, der in die Probe fokussiert wird, wird eine Thermische Linse erzeugt. Die Probe ist im Abstand von z_1 hinter der Detektionslaserstrahltaile positioniert. Eine Lochblende mit einem definierten Radius b wird im Abstand von z_2 hinter der Thermischen Linse angebracht. Der Detektionslaser hat in der Strahltaile einen Radius von w_0 , in der Probe beträgt er w_1 und auf der Lochblende w_2 . Die Intensität des Detektionslaserstrahls wird mit einer Photodiode hinter der Lochblende gemessen.

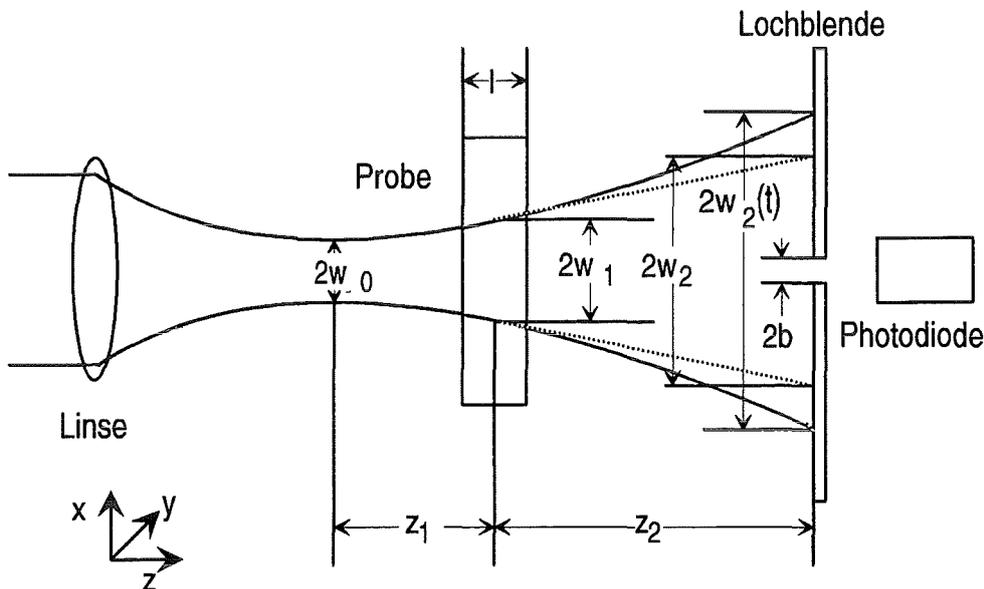


Abb. 2.1: Optisches System für die Detektion der Thermischen Linse. w_0 : Radius der Laserstrahltaile des Detektionslasers, w_1 : Detektionslaserstrahlradius in der Probe, w_2 : Detektionslaserstrahlradius auf der Lochblende (ohne Thermische Linse), $w_2(t)$: Detektionslaserstrahlradius auf der Lochblende zur Zeit t (mit der Thermischen Linse), l : Schichtdicke der Probe, b : Radius der Lochblende, z_1 : Abstand zwischen Laserstrahltaile und dem Probenmittelpunkt, z_2 : Abstand zwischen Probenmittelpunkt und der Lochblende, (.....) Probenlaserstrahl ohne Thermische Linse, (—) Probenlaserstrahl mit der Thermischen Linse

Bei Abwesenheit der Thermischen Linse wird die wahrgenommene Leistung des Probenlasers mit $P_{det}(0)$ bezeichnet. Durch das Anschalten des Anregungslasers wird eine Thermische Linse ausgebildet, der Detektionslaser wird dadurch aufgeweitet und hat nun den Radius $w_2(t)$. Die nun hinter der Lochblende gemessene Leistung, ist $P_{det}(t)$. Als TL-

Signal $S(t)$ wird die relative Intensitätsänderung (die Differenz der Probenlaserleistungen mit und ohne Thermische Linse, normiert mit $P_{det}(0)$) gemessen (Gleichung 2.4):

$$S(t) = \frac{P_{det}(t) - P_{det}(0)}{P_{det}(0)} \quad \text{Gl. 2.4}$$

Es ist möglich, die Brennweite f der Thermischen Linse zu bestimmen und dadurch $S(t)$ in Abhängigkeit von der Temperaturverteilung für die Thermische Linse anzugeben (siehe Anhang B).

3 Kapillarelektrophorese

3.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Trennmethode, die auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten elektrisch geladener Teilchen in einer Elektrolytlösung unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes beruhen, werden unter dem Begriff Elektrophorese zusammengefaßt [SCHWEDT 1995]. Bei der Kapillarelektrophorese (CE) wird die Trennung der Probe in Quarzkapillaren (fused silica) durchgeführt. Diese haben in der Regel einen Innendurchmesser von 25 µm - 100 µm, einen Außendurchmesser von 300 µm - 400 µm, eine Länge von 20 cm - 100 cm und werden mit Puffer gefüllt [JANDIK UND BONN]. Die Kapillarenden tauchen in Puffergefäße, über die eine Spannung angelegt wird, ein. Die durch den fließenden Strom entstehende Joulesche Wärme wird wegen der auf das Probenvolumen bezogenen großen Oberfläche der Kapillare schnell an die Umgebung abgegeben. Dadurch können Trennungen mit Spannungen bis zu 30 kV durchgeführt werden, was sehr kurze Analysenzeiten ermöglicht. Mit der Kapillarelektrophorese können sowohl kationische, anionische und durch spezielle Trenntechniken auch neutrale Teilchen voneinander getrennt werden. Die Probenaufgabe kann durch einen Höhenunterschied zwischen Puffergefäß und Probengefäß (hydrostatische Injektion), einen Druckunterschied zwischen Probengefäß und Kapillarende (hydrodynamische Injektion) oder durch elektrophoretische Wanderung der Probe in die Kapillare (elektrokinetische Injektion) erfolgen. Eine reproduzierbare Probenaufgabe ist für die quantitative Analyse unerlässlich.

Eine Einführung in die CE findet man bei Engelhardt [ENGELHARDT ET AL.] und Jandik und Bonn [JANDIK UND BONN], auf deren Ausführungen sich Teile des folgenden Kapitels beziehen.

3.1.1 Elektrophoretische Wanderung

Die elektrophoretische Trennung [BOCKRIS AND REDDY] basiert auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten u_i von Ionen i im elektrischen Feld (Gleichung 3.1).

$$u_i = \mu_i \cdot E = \mu_i \frac{U}{L_{ges}} \quad \text{Gl. 3.1}$$

Diese ist proportional zur Feldstärke E [V/cm]. Die Feldstärke ist wiederum der Quotient aus der angelegten Spannung U [V] und der Gesamtlänge L_{ges} [cm] der Kapillare. Die Proportionalitätskonstante μ_i [cm² V⁻¹ s⁻¹] wird als Mobilität des Ions i bezeichnet und ist für sphärische Ionen durch Gleichung 3.2 gegeben:

$$\mu_i = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{Gl. 3.2}$$

Hierbei ist z die Ladungszahl, e die Elementarladung, η die dynamische Viskosität und r der Stokessche Radius des Ions. Nur Ionen mit unterschiedlicher Mobilität können durch Elektrophorese getrennt werden.

3.1.2 Elektroosmotischer Fluß

Die Elektroosmose verursacht einen Fluß der Pufferlösung im elektrischen Feld, wobei dieser sogenannte elektroosmotische Fluß, im folgenden mit EOF abgekürzt, die elektrophoretische Wanderung der Ionen in der Lösung überlagert. Durch die pH-Wert-abhängige Dissoziation der Silanolgruppen ist die innere Oberfläche der Quarzkapillare negativ geladen. Dadurch bildet sich an der Grenzfläche Kapillarwand/Puffer eine elektrische Doppelschicht aus. Das sich in der diffusen Doppelschicht aufbauende Potential (Zetapotential) ist eine Voraussetzung für die Elektroosmose [KORTUM]. Durch das Anlegen einer Spannung an die Puffergefäße wandern die Ionen. Im Falle der Quarzkapillaren mit einer Anreicherung von Kationen in der Grenzschicht wird ein EOF in Richtung der Kathode induziert. Dabei bildet sich ein flaches (stempelförmiges) Strömungsprofil aus. Bei einem EOF in Richtung zur Kathode findet die Detektion in der Nähe des Kathodenraums statt. Die Wanderungsgeschwindigkeit u_{eof} des EOF läßt sich vereinfacht mit der Helmholtz-Gleichung beschreiben:

$$u_{eof} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot E \quad \text{Gl. 3.3}$$

Der EOF ist proportional zur Dielektrizitätskonstanten ϵ des Puffers, zum Zetapotential ζ , zur angelegten Feldstärke E und umgekehrt proportional zur dynamischen Viskosität η der Pufferlösung.

Durch den Zusatz von langkettigen kationischen Detergenzien, die an den Silanolgruppen adsorbiert werden können, kann der EOF umgekehrt werden. Es bildet sich eine Doppelschicht des Detergenz mit zum Elektrolyten gerichteten positiven Ladungen aus. Der EOF ist somit zur Anode hin gerichtet, wodurch eine Detektion auf der Anodenseite möglich ist.

3.1.3 Elektrophoretische Trennung

Die Wanderungsgeschwindigkeit u_{ges} (Gleichung 3.4) des Analyten setzt sich additiv aus der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit u_i und der elektroosmotischen Wanderungsgeschwindigkeit u_{eof} zusammen [HEIGER 1992].

$$u_{ges} = u_i + u_{eof} = \frac{L_{ef}}{t_m} \quad \text{Gl. 3.4}$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit u_{ges} läßt sich berechnen, indem man die zurückgelegte Weglänge (Kapillarlänge L_{ef} vom Einlaß bis zum Detektor) durch die Migrationszeit t_m der Probensubstanz teilt.

3.2 Experimenteller Teil

3.2.1 Aufbau der Kapillarelektrophorese

Für die Ausarbeitung der Trennungen und für einen Vergleich der Detektoren wurde eine Kapillarelektrophorese (CE) aufgebaut. Diese ermöglicht sowohl die Detektion von Substanzen mit einem kommerziellen UV-VIS-Detektor als auch mit der Thermischen Linse. Im Gegensatz dazu sind käufliche CE-Geräte meistens Kompaktgeräte, bei denen die Verwendung eines externen Detektors so gut wie nicht möglich ist.

Der schematische Aufbau der CE ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die CE besteht aus einem Netzgerät (Hewlett Packard, Modell 6267B), das einen Hochspannungsgenerator mit einer Maximalspannung von 30 kV (Bertan, Modell 2326-1) mit einer Speisespannung von 24 V versorgt. Über ein Potentiometer in der Steuereinheit können die entsprechenden Spannungen eingestellt werden. Des weiteren ist es möglich, durch zwei Digitalmultimeter (Abb. 3.1 V, A) sowohl die angelegte Spannung als auch den bei einer Trennung fließenden Strom zu messen. Mit Hilfe eines Hochspannungstastkopfes (Tektronix) wurde die Einstellung des Potentiometers bezüglich der an den Elektroden anliegenden Spannung kalibriert [BÜHLER ET AL.]. Als Elektrode wurde ein Platindraht (Goodfellow) mit einer Länge von 1,5 cm und einem Durchmesser von 0,25 mm verwendet. Die Halterung der Elektrode, der Kapillare und des Puffergefäßes ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

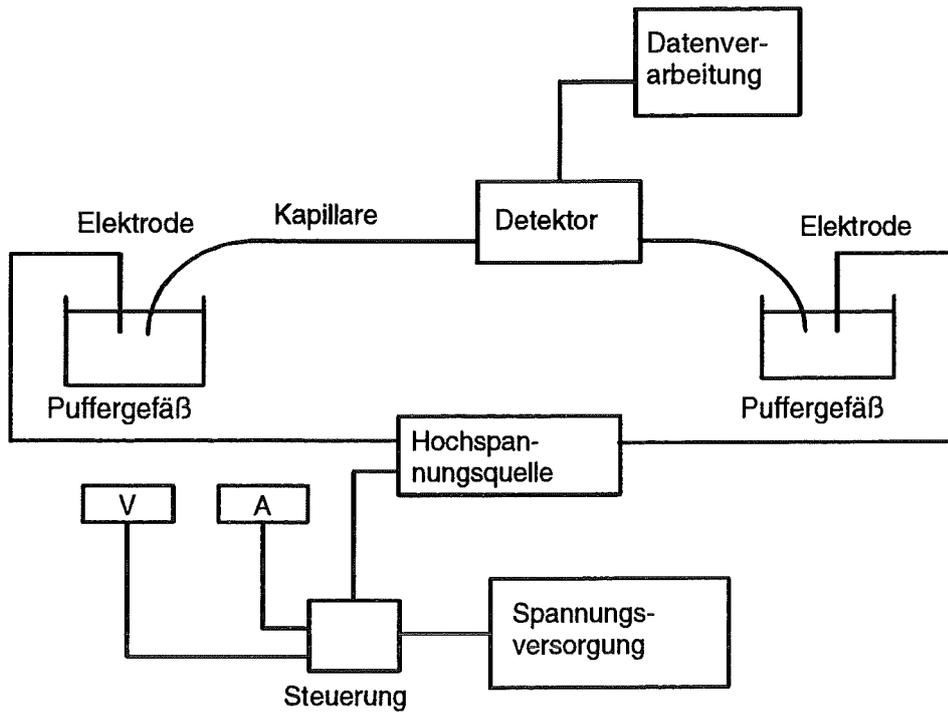


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau der Kapillarelektrophorese

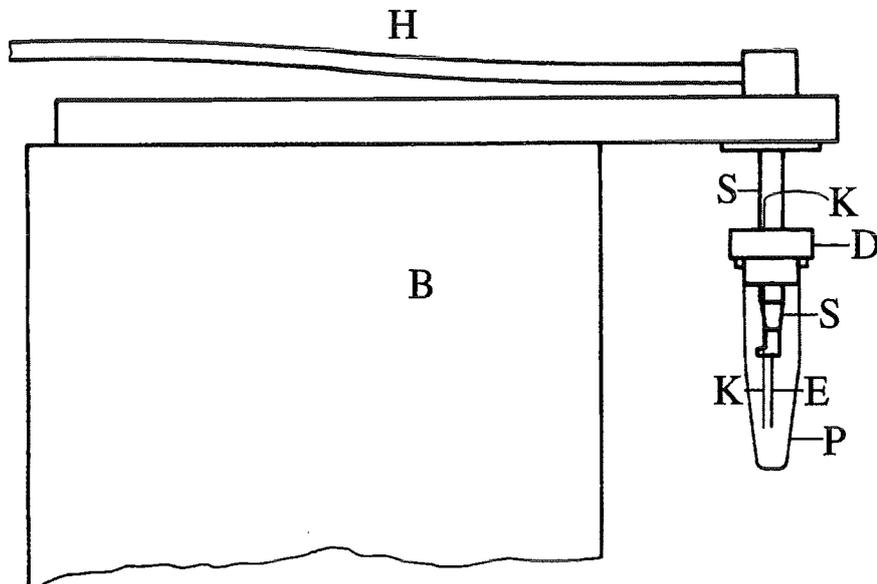


Abb. 3.2: Aufbau der CE-Halterung. B: PVC-Block, H: Hochspannungskabel, S: Klemmspitze, K: Kapillare, E: Platinelektrode, P: Puffergefäß, D: Deckel

Der Platindraht (E) wird durch eine Klemmspitze (S) gehalten. Ein an der Klemmspitze befestigter Deckel (D) aus PVC mit einer 500 μm Bohrung zur Führung der Kapillare (K) ermöglicht die Befestigung eines Puffergefäßes (P). Als Puffergefäße dienten Eppendorf Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 1,5 ml. Zum Spülen und Konditionieren der Kapillare wurde eine Spritzenpumpe (Orion Research Incorporated, Modell 355) mit einem entsprechenden Adapter benutzt.

Mit diesem Aufbau der CE ist nur eine elektrokinetische Aufgabe der Probe möglich. Bei diesem Injektionsverfahren wird ein Puffergefäß durch das Probengefäß ersetzt und für eine kurze Zeit eine bestimmte Spannung angelegt. Die Zeitmessung erfolgte mit einer Stoppuhr. Die aufgegebene Probenmenge Q berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$Q = (\mu_i + \mu_{eof}) \cdot E \cdot A \cdot t_i \cdot c \quad \text{Gl. 3.5}$$

- Q : Aufgegebene Probenmenge
 μ_i : Mobilität der Probenkomponente i
 μ_{eof} : Mobilität des Puffers
 A : Fläche
 E : Feldstärke (U/L_{ges})
 t_i : Injektionszeit
 c : Konzentration der Probe in der Lösung

Eine externe Kühlung der Kapillare zur Abführung der während einer Trennung entstehenden Jouleschen Wärme ist mit diesem Aufbau nicht möglich.

Zur Konditionierung wurde die Kapillare nacheinander jeweils 5 min mit 1 M NaOH, 0,1 M NaOH, H_2O und 15 min mit der Pufferlösung behandelt. Zwischen den einzelnen Trennungen wurde die Kapillare 5 min mit der Pufferlösung gespült. Zum Ansetzen der Stamm- und Pufferlösungen wurde Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (Millipore) eingesetzt. Die fertigen Lösungen wurden durch ein 0,2 μm (Sartorius) Filter gefiltert.

Die Kapillaren sind zum Schutz vor Bruch mit einer lichtundurchlässigen Polyimidschicht umgeben. Diese Schicht wurde an der Detektionsstelle mit einem Kapillarbrenner (Bischoff) entfernt. Anschließend wurde das Fenster mit Methanol gereinigt.

Zur Detektion kann entweder ein UV-VIS-Detektor oder die Thermische Linse eingesetzt werden.

Zum Ausarbeiten der Trennungen und für Reproduzierbarkeitsmessungen der Probenaufgabe der CE wurde ein UV-VIS-Detektor (Linear, Modell UVIS 200) mit einer variablen Einstellung der Wellenlänge im Bereich von 190 nm - 800 nm eingesetzt. Dieser Detektor verfügt über eine spezielle Kapillarhalterung. Die Aufzeichnung und Auswertung der Elek-

tropherogramme erfolgte mit der Chromatographiesoftware Gynkosoftware der Firma Gynkotech.

Bedingt durch Mobilitätsdifferenzen bzw. Leitfähigkeitsunterschiede zwischen dem Trennpuffer und den Analyten, werden in der CE häufig asymmetrische Peaks erhalten. 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 daher erforderlich, die Peakfläche auszuwerten [ENGELHARDT ET AL.].

3.2.2 Aufbau der Thermischen Linse

Den Aufbau der Thermischen Linse (TL) als Detektor für die Kapillarelektrophorese zeigt Abbildung 3.3. Als Anregungslaser diente ein Argonionenlaser (Argon) (Coherent, Innova 200) bei einer Wellenlänge von 364 nm mit einer maximalen Laserleistung von 800 mW am Laserausgang. Die Modulation des Anregungslaserstrahls erfolgte durch einen mechanischen Chopper (CH) (Scitec Instruments, Modell 300) mit Chopperfrequenzen zwischen 30 Hz und 100 Hz. Als Probenlaser kam ein 1 mW HeNe-Laser (HeNe) (Uniphase 1101P) zum Einsatz. Der Anregungslaserstrahl wurde durch eine 12,5 mm bzw. 16 mm¹ Plankonvex-Linse (L) in die Kapillare fokussiert. Die Fokussierung des HeNe-Laserstrahls in die Kapillare erfolgte durch ein 10X Mikroskopobjektiv (M) (Newport) mit einer Brennweite von 14,8 mm. Die beiden Laserstrahlen wurden in einem Winkel von 90° in die Kapillare eingestrahlt. Das Mikroskopobjektiv und die Linse wurden auf Verschiebeeinheiten (Spindler & Hoyer) angebracht, was eine optimale Justage der Laserstrahlen in die Kapillare ermöglichte. Im Abstand von 1 cm hinter der Kapillare befand sich die Lochblende (P) mit einem Durchmesser von 200 µm. Über eine Photodiode (PD) (UDT, Modell 260) mit einem spektralen Empfindlichkeitsbereich von 360 nm bis 1100 nm und einer Detektoroberfläche von 25 mm² wurde das Signal erfaßt. Für den gesamten Aufbau wurden Komponenten der Spindler & Hoyer Mikrobank benutzt.

¹Die Brennweite der Linse wurde je nach Kapillardurchmesser gewählt. Bei einem Kapillardurchmesser von 150 µm bzw. 100 µm wurde mit der 16 mm Linse, bei 75 µm mit der 12,5 mm gemessen.

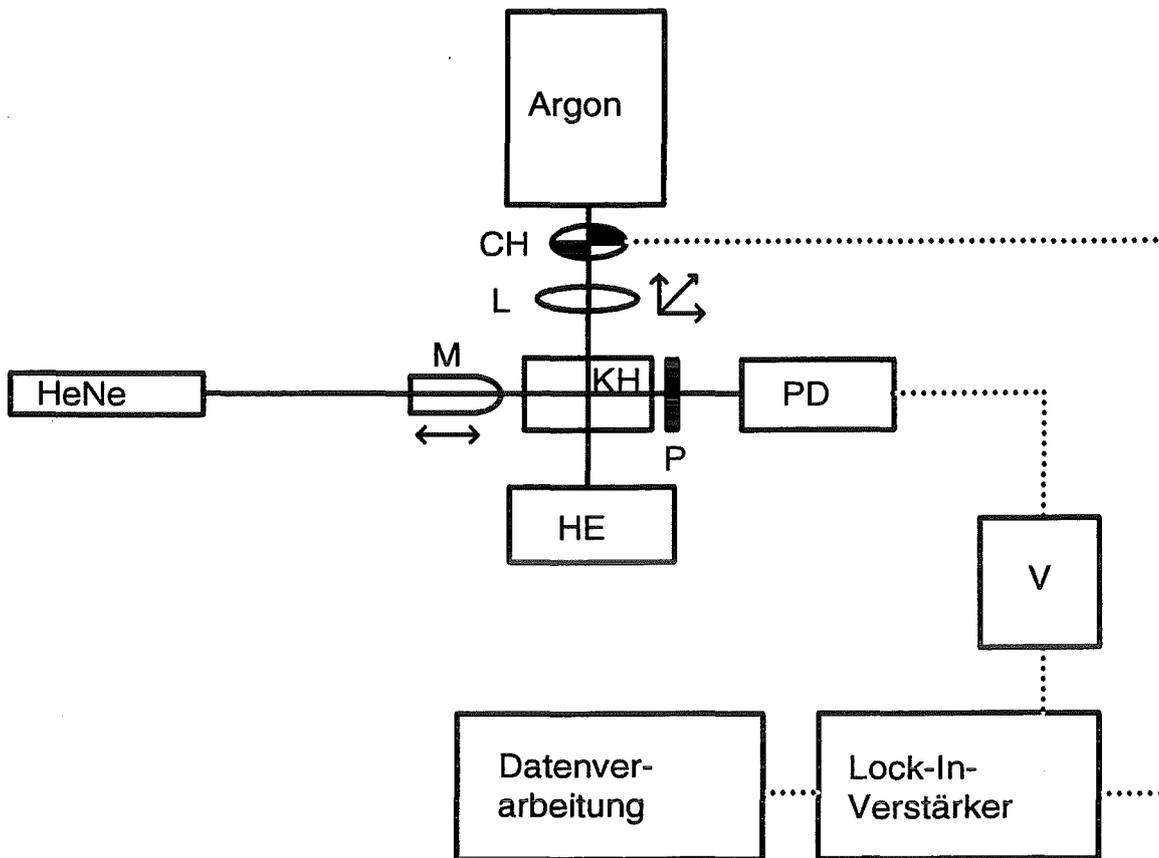


Abb. 3.3: Aufbau der Thermischen Linse für die Kapillarelektrophorese. Argon: Argonionenlaser, CH: Chopper, L: Linse, M: Mikroskopobjektiv, HeNe: HeNe-Laser, KH: Kapillarhalterung, HE: Hochspannungseinrichtung, P: Lochblende, PD: Photodiode, V: Vorverstärker, Lock-In: Lock-In-Verstärker

Um die Kapillare schwingungsfrei zu befestigen, wurde eine spezielle Kapillarhalterung konstruiert. Diese Halterung ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Die Kapillare (K) wird in die Fassung (F) mit Zweikomponentenkleber eingeklebt. Diese wird in das Mantelrohr (R) eingeführt und mit dem Stelling (S) befestigt. Auf der anderen Seite wird die Kapillare mit einer Buchse (Z), die mit einer 400 μm Bohrung versehen ist, zentriert. Das Mantelrohr wird mit einer Mutter (L) mit dem Meßtisch (ME) (Spindler & Hoyer, Modell T 10) verbunden. Durch einen Montagewinkel (W), der am Meßtisch angebracht ist, kann die Kapillarhalterung in die Mikrobank eingebaut werden. Die Justage des Detektionslaserstrahls in die Kapillare erfolgte mit der Mikrometerschraube (M).

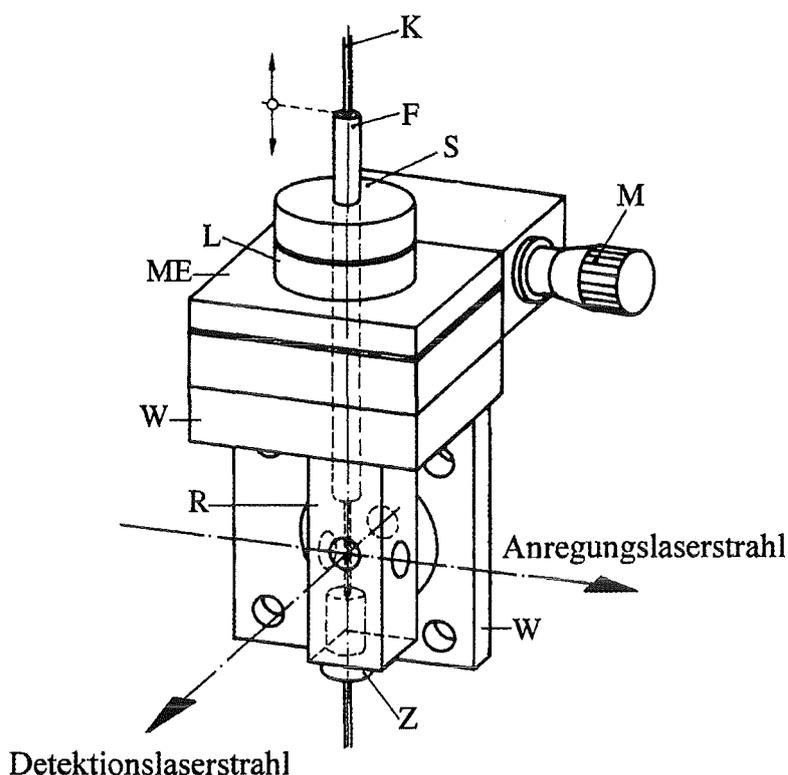


Abb. 3.4: Halterung der Kapillare. K: Kapillare, F: Fassung, S: Stellring, L: Mutter, M: Mikrometerschraube, ME: Meßtisch, W: Montagewinkel, R: Rohrmantel, Z: Zentrierbuchse

3.2.2.1 Elektronische Meßwerterfassung

Das von der Photodiode erfaßte Signal wird von einem Vorverstärker (HMS Elektronik, Modell 564) mit integriertem Strom-Spannungs-Wandler aufgenommen. Zur Rauschunterdrückung wurde ein Tiefpaßfilter (Ithaco, Modell 4302) mit einer Sperrfrequenz von 1 kHz zwischen Vorverstärker und Lock-In-Verstärker (EG&G, Modell 5206) geschaltet. Als Referenzsignal für den Lock-In-Verstärker wurde die Chopperfrequenz verwendet. Der Lock-In-Verstärker wurde mit einer Zeitkonstante betrieben, die etwa dem zehnfachen Wert der Chopperfrequenz entspricht [MEADE, ISRAEL]. Mit einem Speicheroszilloskop (Hameg, HM205-3) konnte das TL-Signal dargestellt werden. Sowohl das Speicheroszilloskop als auch der Lock-In-Verstärker können über eine GPIB-Schnittstelle mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe entwickelten Computerprogramms [SCHULZ] angesprochen und ausgelesen werden. Mit diesem Programm können maximal 1024 Datenpunkte mit unterschiedlich hohen Ausleseraten ausgelesen werden. Die maximale Ausleserate beträgt 10 Hz. Bei dieser Ausleserate verkürzt sich jedoch die Maximalzeit zur Erfassung der Datenpunkte auf 1,7 min.

3.2.3 Messungen mit der Thermischen Linse

Um den Einfluß verschiedener Parameter auf die Thermische Linse, wie z. B. die Abhängigkeit von der Chopperfrequenz und der Laserleistung, zu untersuchen, wurden statische Messungen durchgeführt. Bei diesen Messungen wurde die Kapillare vollständig mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt, und es wurde keine Spannung über die Puffergefäße angelegt. Als Meßlösung wurde Erbiumperchlorat in 0,05 molarer Perchlorsäure verwendet. Aufgrund der Stabilität und der Unabhängigkeit der Absorptionsbanden vom pH-Wert und Lösungsmiteleinflüssen eignet sich Erbiumperchlorat besonders gut als Modellsubstanz für die Laserspektroskopie. Des weiteren zeigt Erbium eine Absorptionsbande bei der verwendeten Laserwellenlänge von 364 nm. Das Absorptionsspektrum ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Es weist schmalbandige Absorptionspeaks im UV-VIS-Bereich auf, die durch paritätsverbotene innere f-f-Elektronenübergänge verursacht werden.

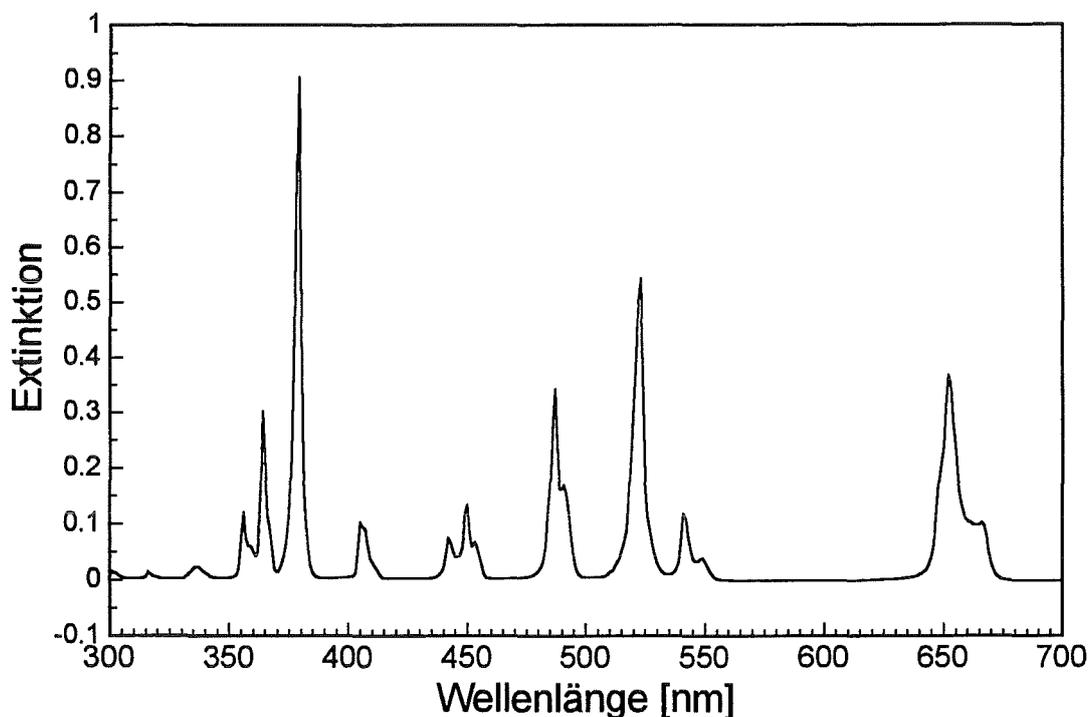


Abb. 3.5: Absorptionsspektrum von Erbium in 0,05 molarer Perchlorsäure

Die Stammlösung wurde aus Erbiumperchlorat ($\text{Er}(\text{ClO}_4)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Johnson-Matthey) und Perchlorsäure (Merck-Schuchardt) hergestellt.

3.2.4 Indirekte Detektion

Zum Testen der CE wurde eine Standardtrennung aus der Literatur [ROMANO UND KROL 1993, ROMANO ET AL. 1991, NAIR UND IZZO, HARROLD ET AL.] durchgeführt. Da die meisten Anionen im UV-Bereich nur sehr geringe oder gar keine Absorption zeigen, wird bei dieser Trennung eine indirekte Detektion durchgeführt. D. h. der Pufferlösung wird ein UV-absorbierender Hintergrundelektrolyt zugesetzt. Erfolgt eine Verdrängung des Hintergrundelektrolyten durch Probenmoleküle, so resultiert daraus eine geringere Absorption des Puffers und man erhält einen negativen Peak (siehe Gleichung 3.6) [HEIGER UND WEINBERGER 1994].

$$\Delta E = (\epsilon_{Puffer} - \epsilon_{Probe}) \cdot c_{Probe} \cdot d \quad \text{Gl. 3.6}$$

ΔE : Extinktionsänderung

ϵ_{Puffer} : molarer Extinktionskoeffizient der Pufferlösung

ϵ_{Probe} : molarer Extinktionskoeffizient der Probe

d : Schichtdicke der Kapillare

Als Hintergrundelektrolyt wird Natriumchromat eingesetzt, das ein Absorptionsmaximum bei 274 nm und 372 nm hat. Abbildung 3.6 zeigt das Absorptionsspektrum einer 0,5 mM Chromatlösung bei einem pH-Wert von 8,0.

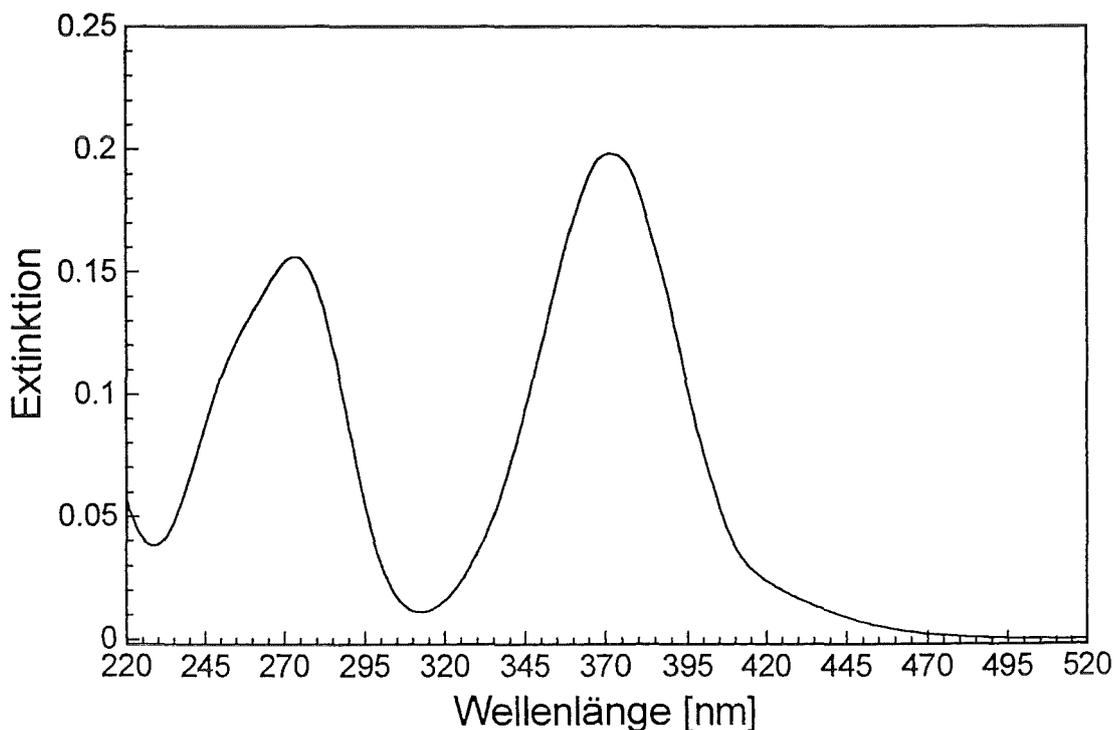


Abb .3.6: Absorptionsspektrum von Chromat

Diese Trennung wurde vor allem deshalb ausgewählt, weil die Absorption des Chromats eine Detektion mit der Thermischen Linse bei der Wellenlänge der Laserlinie des Argonionenlasers bei 364 nm ermöglicht.

Die Parameter und die Pufferzusammensetzung für die Trennung sind im nachfolgenden aufgeführt:

Die Pufferlösung bestand aus 5 mM Chromat (Merck), dem 0,5 mM OFM-Anion-BT² (Waters) zugesetzt wurden. OFM-Anion-BT, ein kationisches Tensid, wurde zur Umkehr des EOF (siehe Kapitel 3.1.2) eingesetzt. Durch den Zusatz wurde eine schnelle Analyse der Anionen auf der Anodenseite der CE möglich. Mit 10 mM Schwefelsäure wurde der Puffer auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit einem pH-Meter (Metrohm, Modell 654).

Die verwendete Kapillare hatte einen Innendurchmesser von 75 μm und eine Gesamtlänge (L_{ges}) von 71 cm, die Länge bis zum Detektor (L_{ef}) betrug 47,5 cm. Die Probenaufgabe erfolgte mit einer Spannung von 1 kV über eine Zeit von 15 s. Die Feldstärke betrug (siehe Kapitel 3.1.1) 282 V cm^{-1} . Die Detektion erfolgte auf der Anodenseite. Als Probe wurde ein Anionentestgemisch bestehend aus Natriumbromid (Merck), Natriumsulfat (Merck) und Natriumnitrat (Merck) verwendet.

3.2.5 Direkte Detektion

Für die direkte Detektion wurden die Substanzen 2,4-Dinitro-6-methylphenol (DNOC) (Riedel de Haën) und 2,4-Dinitrophenol (DNP) (Merck) ausgewählt. DNOC gehört zu der Gruppe der Dinitrophenolpestizide, und ist wegen der starken Toxizität gegenüber Mensch und Tier in Deutschland [THIER UND FREHSE] verboten. Die Struktur von DNP und DNOC ist in Abbildung 4.8 (Kapitel 4.2.3) dargestellt.

Die Dinitrophenole sind schwache Säuren (Phenol-Phenolat-Gleichgewicht) [ROBINSON, CESSNA UND GROVER] mit einer pH-abhängigen Absorption. In saurer Lösung besitzt DNOC ein Absorptionsmaximum bei 272 nm, in alkalischer Lösung bei 372 nm. Um die hohen Extinktionskoeffizienten bei der Wellenlänge des Anregungslasers (364 nm) zu gewährleisten, wurden die Trennungen im neutralen bzw. alkalischen pH-Bereich durchgeführt. Das Absorptionsspektrum von DNOC bei pH-Werten von 1 und 6 ist in Abbildung 3.7 zu sehen.

²OFM-Anion BT ist von der Firma Waters patentrechtlich geschützt. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt.

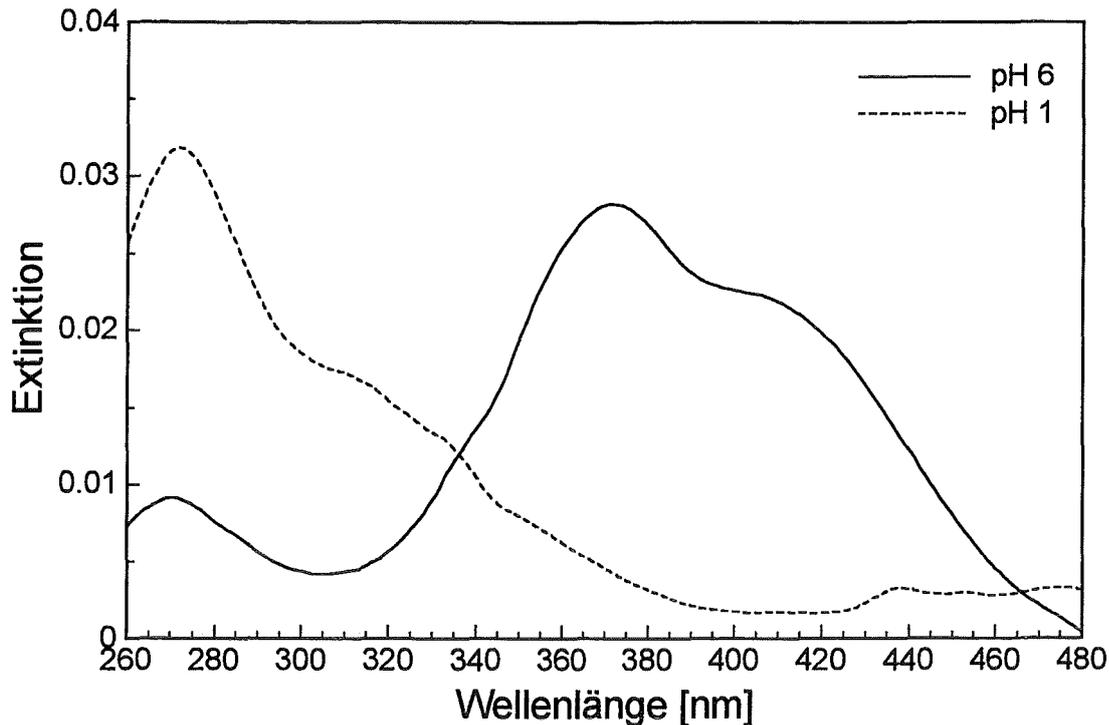


Abb. 3.7: Absorptionsspektrum von DNOC bei pH-Werten von 1 und 6

Eine Trennung der Dinitrophenole mit der CE ist mit der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) [ONG ET AL., BURTON UND SEPANIAC, OTSUKA ET AL., TERABE ET AL.] möglich. Dieses Verfahren wird zur Trennung ungeladener Substanzen eingesetzt, die alle im elektrischen Feld mit derselben Geschwindigkeit wandern. Durch den Zusatz von Detergentien zum Puffer bilden sich nach der Überschreitung der sogenannten kritischen micellaren Konzentration Micellen aus. Diese Micellen besitzen im Inneren hydrophoben Charakter und sind nach außen hin geladen, wodurch im elektrischen Feld eine elektrophoretische Mobilität erzeugt wird. Je nach der Ladung der Detergentien ist diese Mobilität zur Anode oder Kathode hin gerichtet. Die Trennung beruht auf der Verteilung der Probe zwischen der Pufferlösung (wässrige mobile Phase) und dem Inneren der Micellen (pseudo-stationäre Phase) [VINDEVOGEL UND SANDRA].

Für die Trennung wurden sowohl Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimid) (Merck) als kationisches Tensid als auch Natriumdodecylsulfat (SDS) (Aldrich) als anionisches Tensid eingesetzt. Als Puffer wurden Phosphat-Borat-Puffer unterschiedlicher Zusammensetzung benutzt.

Mit Cetrimid als Detergenz konnte keine Auftrennung von DNOC und DNP erreicht werden, weshalb nur noch mit SDS als Detergenz gearbeitet wurde.

Die beste Trennung von DNOC und DNP wurde bei folgenden Parameter erzielt:

Die Kapillare hatte einen Innendurchmesser von 75 μm und eine Gesamtlänge (L_{ges}) von 91 cm, die Länge bis um Detektor (L_{ef}) betrug 46,6 cm. Die elektrische Feldstärke betrug

164,8 V cm⁻¹. Der Puffer bestand aus 50 mM SDS, 100 mM Borsäure (Fluka) und 50 mM Natriumphosphat (Merck) und hatte einen pH-Wert von 7,0.

Die Probenaufgabe erfolgte mit einer Spannung von 2,5 kV über einen Zeitraum von 20 s.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Die apparativen Einflußparameter

Bei dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Aufbau der Thermischen Linse wurde der von SCHULZ verwirklichte Aufbau der Nahfeld Thermischen-Linse erstmals auch für die Detektion in Kapillaren eingesetzt. Dieser Aufbau beruht auf den theoretischen Berechnungen von POWER 1990.

Daher wurden die Abhängigkeiten des Thermischen Linsen Signals von Betriebsparametern wie Chopperfrequenz, Anregungsenergie und der Größe des elektroosmotischen Flusses (EOF) ermittelt.

Die eingezeichneten Linien in den nachfolgend gezeigten Abbildungen 3.8 bis 3.12 sollen keine theoretischen Berechnungen darstellen, sie dienen nur zur Orientierung für das Auge. Wichtigstes Ziel war es, die Leistungsfähigkeit der Thermischen Linse vor allem im Hinblick auf eine hohe Nachweisempfindlichkeit zu testen.

Bei den Messungen der Abhängigkeit des Signals von der Chopperfrequenz und der Anregungsenergie und bei der Bestimmung der Nachweisgrenze wurde die Kapillare mit Hilfe der Spritzenpumpe (siehe Kapitel 3.2.1) vollständig mit der Erbiumperchloratlösung gefüllt. An die Puffergefäße wurde bei der Durchführung dieser Messungen keine Spannung angelegt, eine CE-Trennung wurde nicht durchgeführt ($u_{ges} = 0$).

3.3.1.1 Abhängigkeit des TL-Signals von der Laserleistung

Aus den Betrachtungen der Thermischen Linse in Anhang A und Anhang B wird ein linearer Zusammenhang zwischen dem Signal der Thermischen Linse und der eingestrahnten Laserenergie erwartet. Die Messungen wurden mit einer 12 mM Erbiumperchloratlösung bei unterschiedlichen Chopperfrequenzen durchgeführt. Abbildung 3.8 zeigt die Messungen in einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von 150 µm und bei Chopperfrequenzen von 60 Hz und 100 Hz.

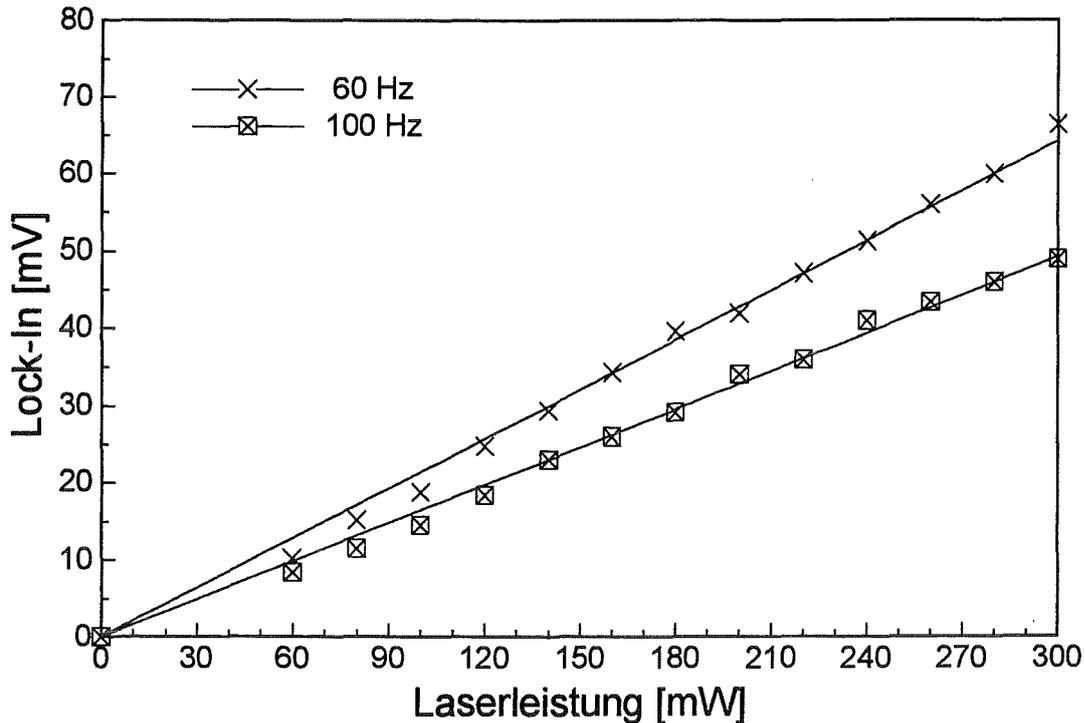


Abb. 3.8: Abhängigkeit des Thermischen Linsen-Signal von der Laserleistung. Analyt: 12 mM Erbiumperchloratlösung, Durchmesser der Kapillare: 150 μm

Derselbe Verlauf wird auch bei niedrigeren Erbiumkonzentrationen und in Kapillaren mit einem Durchmesser von 100 μm und 75 μm erhalten.

3.3.1.2 Abhängigkeit des TL-Signals von der Chopperfrequenz

Durch die Chopperfrequenz wird die Dauer der Anregungs- und Abkühlphase festgelegt. In Abbildung 3.9 ist die Messung mit einer 12 mM Erbiumperchloratlösung in einer 150 μm Kapillaren bei 2 verschiedenen Laserleistungen dargestellt. Die Chopperfrequenz wurde zwischen 30 Hz und 100 Hz variiert. Kleinere Modulationsfrequenzen wurden nicht gemessen. Bei der CE treten in der Regel sehr schmale Peaks auf. Diese Peaks haben teilweise nur Breiten von 3 s (siehe Trennung mit Chromatopuffer Kapitel 3.3.2). Um eine genügend große Auflösung dieser Peaks zu erreichen (20 Meßpunkte über den Peak verteilt), muß mindestens alle 0,1 s ein Wert ausgelesen werden. Bei einer Zeitkonstante von 0,1 s am Lock-In-Verstärker, die um einen Faktor zehn höher liegt als die Chopperfrequenz, muß bei so schmalen Peaks mit einer Chopperfrequenz von 100 Hz gearbeitet werden. Daher wurde die Einstellung der Chopperfrequenz bei CE-Trennungen auf die zu erwartende Peakbreite und somit auf die benötigte Auflösung abgestimmt.

Mit steigender Chopperfrequenz und bei gleichbleibender Laserleistung nimmt die Größe des TL-Signals ab, da die Anregungsphasen kürzer werden und somit insgesamt weniger

Energie in die Kapillare eingestrahlt wird. Es zeigt sich im gemessenen Bereich eine nahezu lineare Abhängigkeit von der Chopperfrequenz.

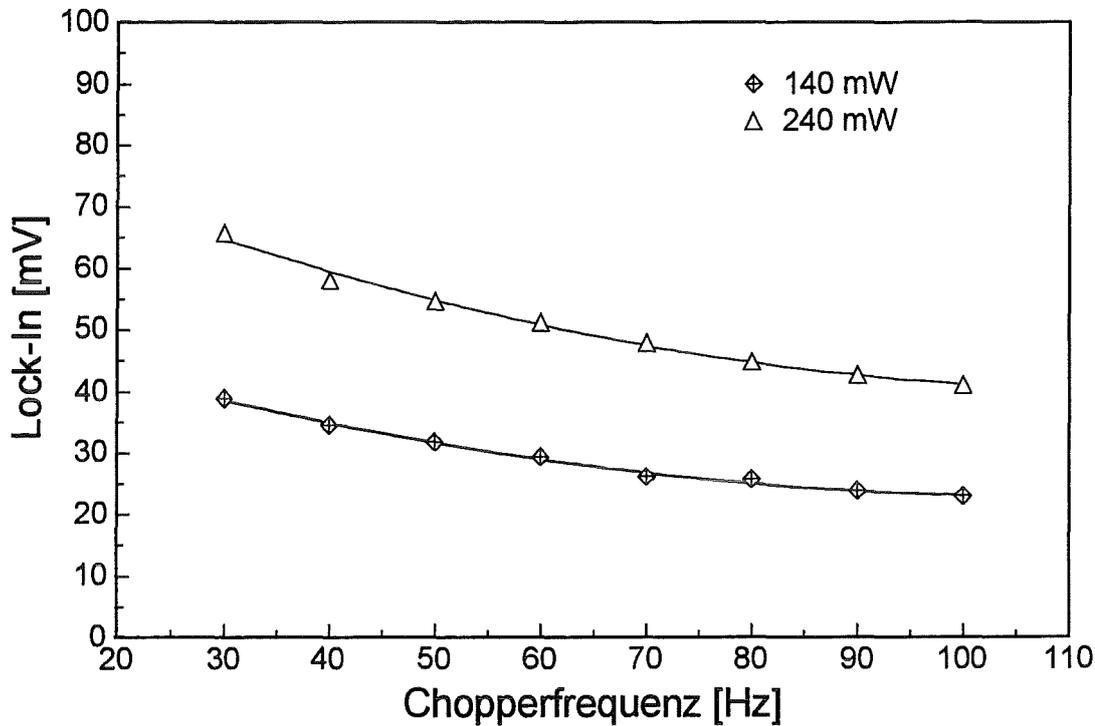


Abb. 3.9: Thermisches Linsen-Signal in Abhängigkeit von der Chopperfrequenz. Analyt: 12 mM Erbiumperchloratlösung, Durchmesser der Kapillare: 150 μm

Ein weiterer Aspekt für die Wahl der Chopperfrequenz ist das Rauschen. Um eine hohe Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, benötigt man ein möglichst hohes Signal/Rausch-Verhältnis. In Abbildung 3.10 ist das relative Rauschen (bestimmt aus der Standardabweichung) als Funktion der Chopperfrequenz aufgetragen. Bei mittleren Chopperfrequenzen erhält man ein Minimum. Der optimale Arbeitsbereich liegt damit bei diesen Chopperfrequenzen. Auffallend bei allen Messungen ist das hohe relative Rauschen bei einer Frequenz von 50 Hz. Dies ist vermutlich auf einen Einfluß der Netzfrequenz auf die elektronische Meßwerterfassung zurückzuführen.

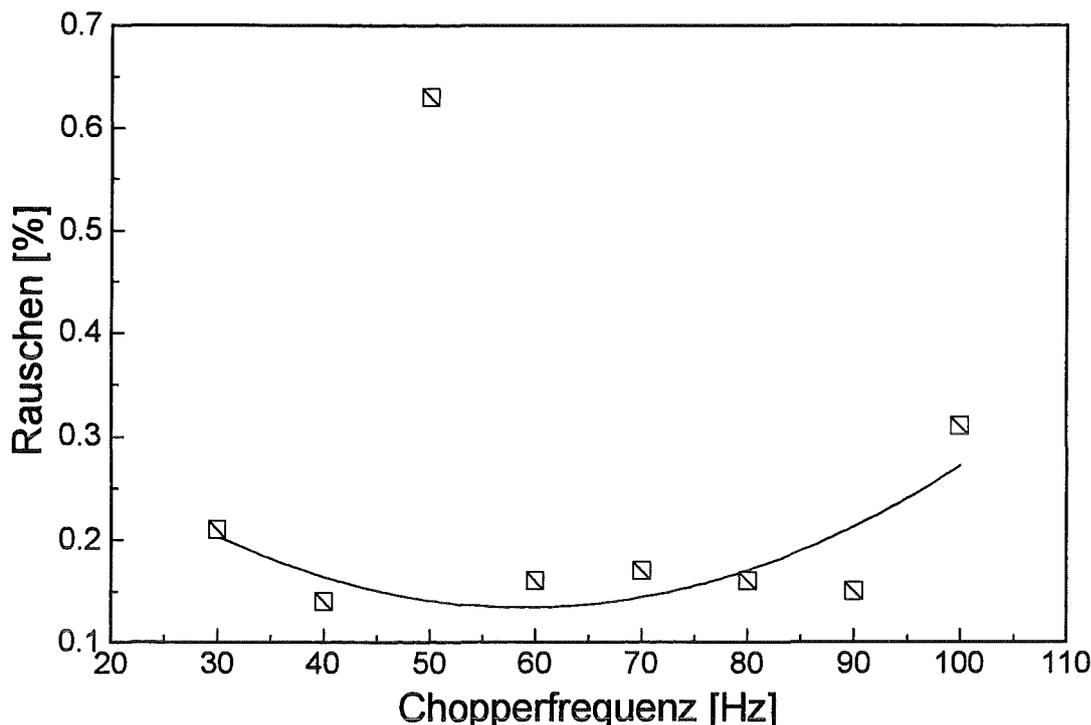


Abb. 3.10: Rauschen in Abhängigkeit von der Chopperfrequenz. Analyt: 12 mM Erbium-perchloratlösung, Durchmesser der Kapillare: 150 μm , Laserleistung: 140 mW

3.3.1.3 Abhängigkeit des TL-Signals von der Wanderungsgeschwindigkeit

Durch das Anlegen einer Spannung an die Puffergefäße wird in der Kapillare eine "Strömung" erzeugt, wobei die Teilchen mit einer bestimmten Wanderungsgeschwindigkeit (siehe Kap. 3.1.3) durch die Kapillare wandern. Durch erzwungene Konvektion (siehe Anhang A) wird die Ausbildung der Thermischen Linse beeinflusst, und es ist eine Abhängigkeit des TL-Signals von der Wanderungsgeschwindigkeit zu erwarten. Für die Durchführung dieser Messungen wurde eine 5 mM Chromatlösung (pH 8) eingesetzt. Das Chromat hat eine sehr hohe Mobilität, sie wird bei Engelhardt [ENGELHARDT ET AL.] mit ca. $0,8 \text{ cm}^2 \text{ kV}^{-1} \text{ s}^{-1}$ angegeben³, wodurch hohe Wanderungsgeschwindigkeiten erreicht werden können. Desweiteren absorbiert Chromat bei der Wellenlänge von 364 nm ausgezeichnet (siehe Abbildung 3.6).

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Chromat in Abhängigkeit vom elektrischen Feld wurde zuvor mit dem UV-VIS-Detektor bestimmt. Hierzu wurde eine Probenlösung von 28 mM Dimethylsulfoxid (DMSO) und 5 mM Chromat hergestellt. Diese Probe wurde in die mit Chromatpuffer gefüllte Kapillare injiziert. Anschließend wurde die Zeit gemessen, die das DMSO bei einer bestimmten elektrischen Feldstärke benötigt, um den Detektor zu erreichen. DMSO hat eine breite Absorptionsbande unterhalb 220 nm, weshalb bei einer

³Gemessen wurde die Mobilität bei pH 9 in 10 mM Phosphatpuffer.

Wellenlänge von 215 nm detektiert wurde. Nach Gleichung 3.4 läßt sich nun aus der Kapillarlänge L_{ef} und der Zeit t_m die Wanderungsgeschwindigkeit von DMSO berechnen. Diese entspricht der Wanderungsgeschwindigkeit (EOF) von Chromat, da DMSO als ungeladenes Molekül nur durch den EOF des Chromats zum Detektor transportiert wird.

Zur Messung des TL-Signals in Abhängigkeit von der Wanderungsgeschwindigkeit wurde die Kapillare mit der 5 mM Chromatlösung (ohne DMSO) gefüllt und die entsprechende Spannung über die Puffergefäße angelegt. Die Messungen mußten sehr schnell durchgeführt werden, da bei der Messung mit Chromat Probleme durch Blasenbildung in der Lösung auftraten (siehe Kapitel 3.3.2). Wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, nimmt das TL-Signal mit zunehmender Wanderungsgeschwindigkeit zu. Die Zunahme des TL-Signals wird mit steigender Wanderungsgeschwindigkeit geringer, so daß bei Wanderungsgeschwindigkeiten größer 0,28 cm/s das TL-Signal praktisch einen konstanten Wert annimmt.

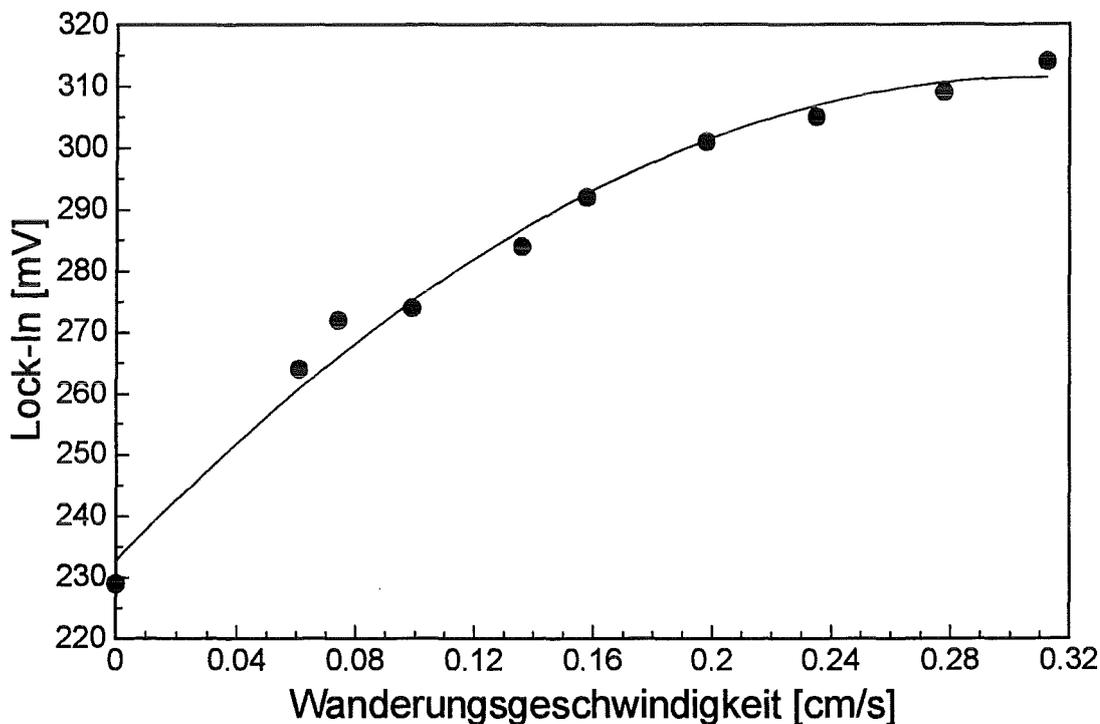


Abb. 3.11: TL-Signal in Abhängigkeit von der Wanderungsgeschwindigkeit. Analyt: 5 mM Chromatlösung, Kapillardurchmesser: 75 μ m, Laserleistung: 60 mW, Chopperfrequenz: 100 Hz

Es wäre interessant, bei höheren Wanderungsgeschwindigkeiten zu messen, um den weiteren Verlauf der Kurve zu sehen. Eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit ließe sich durch eine höhere angelegte Spannung und durch Kürzung der Kapillaren erzielen. Aus technischen Gründen konnte beim hier vorliegenden Meßaufbau weder die Spannung (maximal 30 kV) erhöht noch die Kapillare gekürzt werden. Eine Detektion mit der

Thermischen Linse bei der Kapillarelektrophorese ist also auch bei für die CE hohen Wanderungsgeschwindigkeiten möglich.

3.3.1.4 Nachweisgrenze als Beurteilungskriterium

Wesentliches Kriterium für die Eignung der Thermischen Linse als Detektionssystem für die CE ist deren Nachweisgrenze. Die Definition der Nachweisgrenze ist in Kapitel 3.3.1.5 erläutert. Um die Nachweisgrenze des verwendeten Aufbaus (siehe Kapitel. 3.2.2) zu bestimmen, wurde diese bei verschiedenen Kapillardurchmessern bestimmt. Es wurden Konzentrationsreihen mit Er^{3+} in 0,05 M Perchlorsäure aufgenommen. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 364 nm, einer Chopperfrequenz von 40 Hz und einer Laserleistung von 200 mW durchgeführt. Während der Messung wurde keine Spannung an die Puffergefäße angelegt, d. h. sie wurde statisch durchgeführt. Mit Hilfe der Spritzenpumpe wurde die Kapillare vollständig mit der Erbiumlösung gefüllt. Nach der Messung wurde die Kapillare zuerst mit 0,05 M Perchlorsäure und anschließend so lange mit Wasser gespült, bis das Spülwasser einen neutralen pH-Wert anzeigte. So wurde gewährleistet, daß keine Konzentrationsverfälschungen durch Restsubstanzen der vorhergehenden Messung auftraten. Abbildung 3.12 zeigt die Konzentrationsreihe, die in einer 75 μm Kapillare aufgenommen wurde.

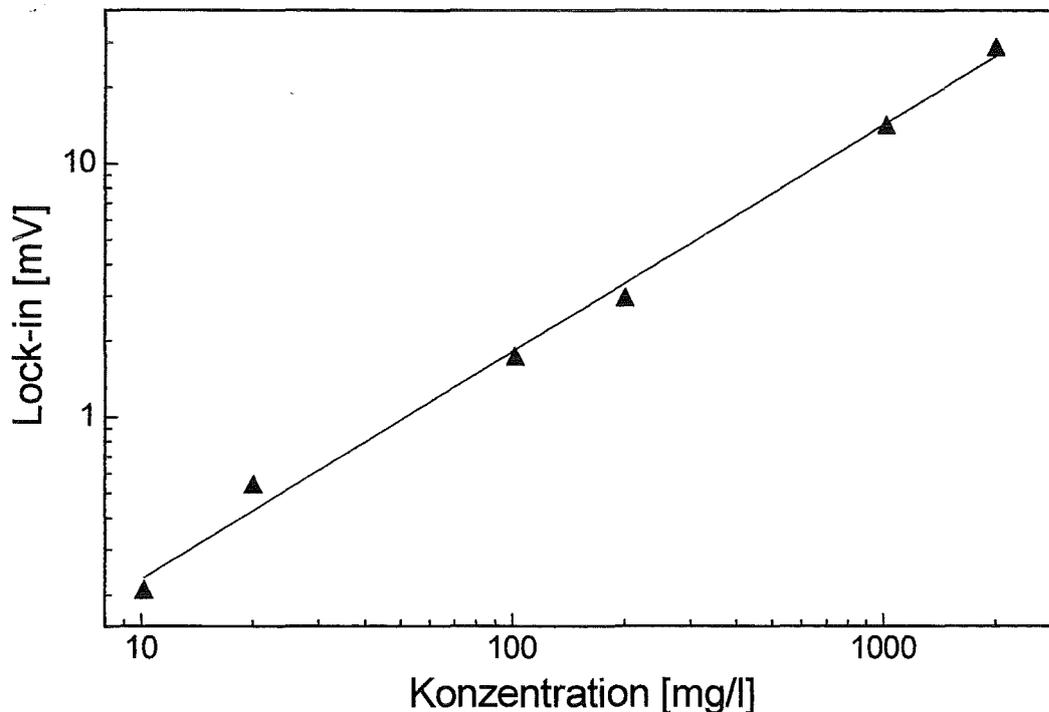


Abb. 3.12: Kalibrierkurve von Erbiumperchlorat für statische Messungen mit der Thermischen Linse in der Kapillare. Durchmesser der Kapillare: 75 μm , Laserleistung: 200 mW, Chopperfrequenz: 40 Hz

Die Kalibrierkurve verläuft über drei Größenordnungen, was für den Einsatz als Detektor von großer Wichtigkeit ist. Die Nachweisgrenzen für verschiedene Kapillardurchmesser sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

Durchmesser der Kapillare [μm]	Nachweisgrenze [mg/l]
150	4
100	4
75	10

Tab. 3.1: Nachweisgrenzen für Erbiumperchlorat in Kapillaren mit unterschiedlichem Durchmesser (statische Messungen)

Für die Kapillare mit einem Durchmesser von $75 \mu\text{m}$ wurde eine schlechtere Nachweisgrenze erhalten als für die mit dem größeren Durchmesser. Dies liegt daran, daß es schwieriger war, den Anregungslaserstrahl in die Kapillare mit dem $75 \mu\text{m}$ Durchmesser zu fokussieren als in die Kapillaren mit dem größeren Durchmesser. Daher wurde für diese Kapillare ($75 \mu\text{m}$ Durchmesser) eine Linse mit einer kleineren Brennweite verwendet. SCHULZ erreichte mit Erbium bei der 364 nm Laserlinie mit einem kollinearen Aufbau und einer Küvettenlänge (Wechselwirkungsstrecke) von 1 cm eine um den Faktor zehn bessere Nachweisgrenze. In Anbetracht der kleineren Wechselwirkungsstrecke der beiden Laserstrahlen in der Kapillare, ist das hier erzielte Ergebnis trotzdem als gut zu bezeichnen. Es muß allerdings noch berücksichtigt werden, daß durch eine größere Wechselwirkungsstrecke der Signaluntergrund größer wird.

3.3.1.5 Definition der Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze wird der kleinste Konzentrationswert bezeichnet, der sich mit einer definierten Sicherheit detektieren läßt. Einen Meßwert Y_N an der Nachweisgrenze erhält man aus dem Blindwertmittelwert \bar{Y}_B des Signals und der Standardabweichung σ_B und der Konstanten k gemäß Gleichung 3.7 [DOERFFEL, TAYLOR]:

$$Y \geq \bar{Y}_B + k \cdot \sigma_B \quad \text{Gl. 3.7}$$

In der vorliegenden Arbeit wird $k = 3$ angenommen, dadurch erhält man die Sicherheit, bei einer gaußförmigen Verteilung der Streuung der Meßwerte, daß sich der Meßwert an der Nachweisgrenze mit 99,7%iger Sicherheit vom Störpegel unterscheidet. Zur Angabe des Resultats muß der Meßwert Y_N in den Analysenwert X_N umgerechnet werden. Hierzu wird eine Kalibriergerade aufgestellt mit der Funktion (Gleichung 3.8)

$$Y = Y_B + bX \quad \text{Gl. 3.8}$$

wobei die Steigung b der Empfindlichkeit des Verfahrens entspricht.

Aus Gleichung 3.7 und Gleichung 3.8 erhält man für die Nachweisgrenze X_N Gleichung 3.9:

$$X_N = \frac{3\sigma_B}{b} \quad \text{Gl. 3.9}$$

Die Steigung b der Geraden erhält man durch eine lineare Regression, wobei die Qualität der Geraden durch den Korrelationskoeffizienten bestimmt wird.

3.3.2 Indirekte Detektion

Um die Tauglichkeit der selbst aufgebauten Kapillarelektrophorese (siehe Kapitel 3.2.1) und des UV-VIS-Detektors zu testen, wurde eine Standardtrennung (Anionentrennung) aus der Literatur (siehe Kapitel 3.2.4) mit diesem Aufbau durchgeführt. Die damit bestimmten Nachweisgrenzen wurden dann mit Werten aus der Literatur verglichen.

Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis der Trennung der Anionen Bromid, Sulfat und Nitrat. Die Detektion wurde mit dem UV-VIS-Detektor bei einer Wellenlänge von 364 nm durchgeführt.

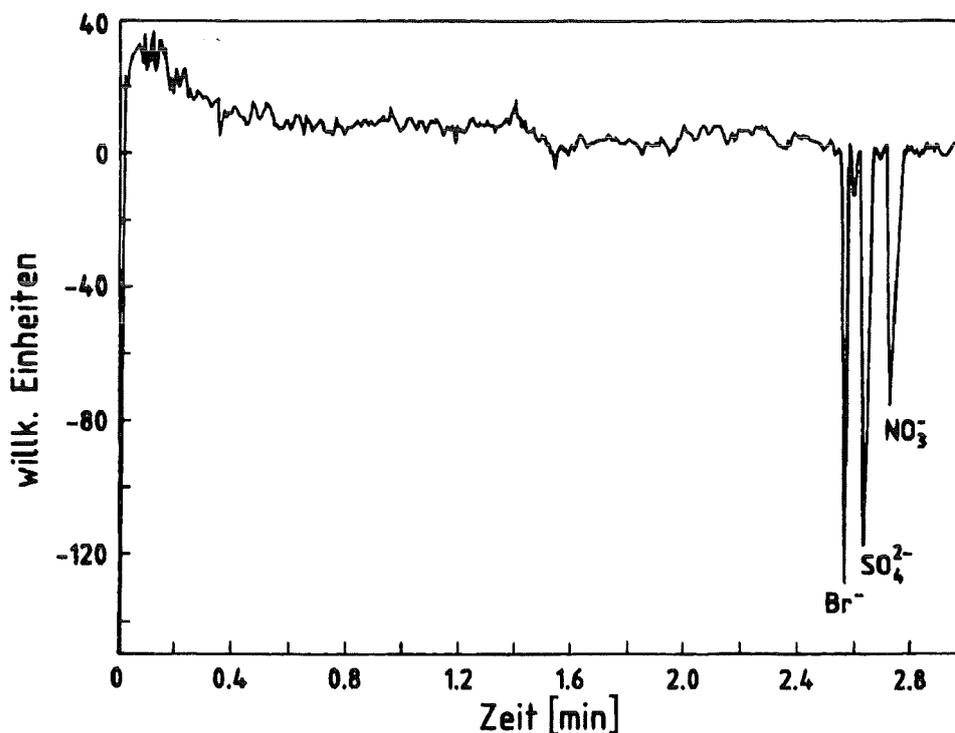


Abb. 3.13: Elektropherogramm der Anionentrennung von Bromid, Sulfat, Nitrat, Detektion mit dem UV-VIS-Detektor. Durchmesser der Kapillare: 75 μm , Wellenlänge: 364 nm, Puffer: 5 mM Chromat mit 0,5 mM OFM-Anion-BT, pH-Wert: 8,0, Feldstärke: 282 V cm^{-1} , Aufgabespannung: 1 kV, Aufgabezeit: 15 s

Die gemessenen Retentionszeiten für die Anionen sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Substanz	Bromid	Sulfat	Nitrat
Retentionszeit [min]	2,56	2,63	2,72

Tab. 3.2: Retentionszeiten der Anionentrennung.

Die Nachweisgrenzen, die bei dieser Trennung mit dem UV-VIS-Detektor erhalten werden, sind nur qualitativ zu werten, da die Reproduzierbarkeit der Flächeneinheiten für die einzelnen Anionen schlecht ist (siehe auch Kapitel 3.3.3). Sie geben nur den Konzentrationsbereich wieder, bis zu dem gemessen werden kann. Dennoch wurde eine Gegenüberstellung mit Nachweisgrenzen vorgenommen, die die Firma Waters [WATERS] mit ihrem CE-Gerät für diese Trennung bestimmt hat. Diese sind in Tabelle 3.3 wiedergegeben.

Substanz	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]		
	Bromid	Sulfat	Nitrat
Waters	200	80	100
Eigenaufbau	270	56	70

Tab. 3.3: Nachweisgrenzen der Anionen (UV-VIS-Detektor). Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Waters.

Die Nachweisgrenzen für beide Geräte liegen im gleichen Konzentrationsbereich. Es muß berücksichtigt werden, daß Waters bei einer Wellenlänge von 254 nm (vorliegende Arbeit 364 nm) mißt und die Probenaufgabe hydrostatisch (vorliegende Arbeit elektrokinetisch) erfolgt.

Für die Detektion mit der Thermischen Linse wurden die gleichen Bedingungen für die Trennung der Anionen eingehalten wie bei der Detektion mit dem UV-VIS-Detektor. Die Anregungslaserleistung betrug 60 mW und die Chopperfrequenz 100 Hz.

Bei der Durchführung der Messungen fingen nach kurzer Zeit die beiden Laserstrahlen an zu streuen, so daß keine weiteren Messungen mehr möglich waren. Das Streuen der Laserstrahlen wurde jedesmal durch eine Blase verursacht, die sich in der Kapillare im Detektionsvolumen gebildet hatte. Interessanterweise konnten die Blasen weder durch Spülen der Kapillare mit Puffer noch mit Natronlauge entfernt werden. Dies ist ein Zeichen dafür, daß die Kapillare an der Detektionsstelle nicht mehr benetzt wird und somit keine Detektion mehr möglich ist.

3.3.3 Direkte Detektion

Da eine indirekte Detektion mit der Thermischen Linse aufgrund der Blasenbildung (siehe oben) nicht möglich war, wurde, um beide Detektionsmethoden vergleichen zu können, eine direkte Detektion (Kapitel 3.2.5) durchgeführt.

In Abbildung 3.14 ist ein Elektropherogramm der DNOC/DNP-Trennung mit der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) zu sehen. Detektiert wurde mit dem UV-VIS-Detektor bei einer Wellenlänge von 364 nm. Man sieht, daß die beiden Peaks basisliniengetreunt sind. Nach einer Zeit von 8 min tritt immer ein Systempeak auf.

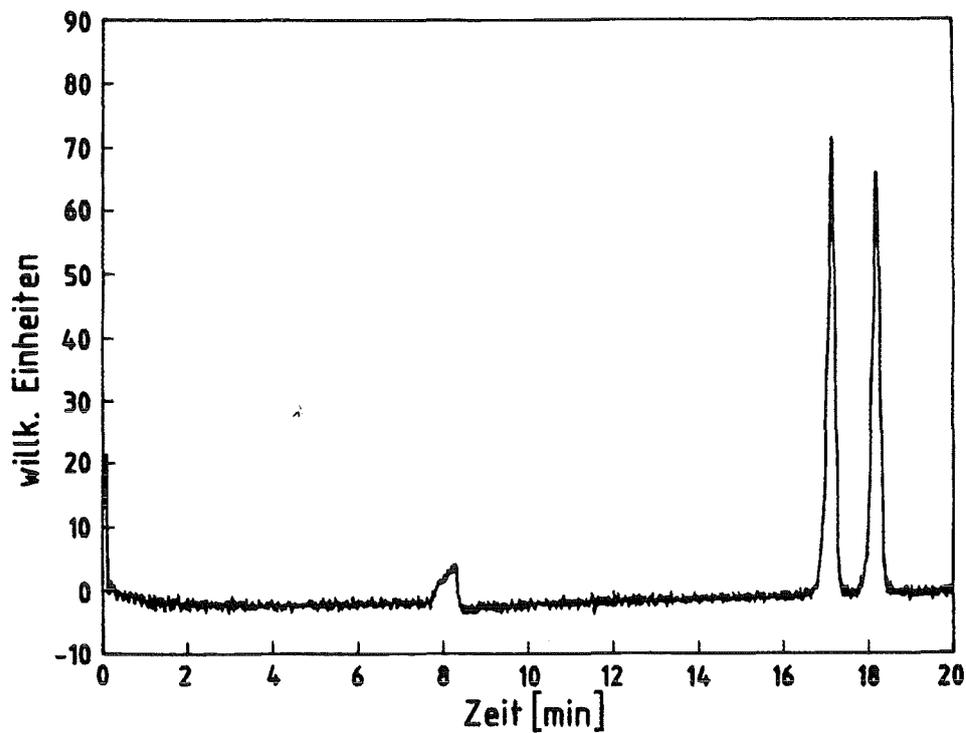


Abb. 3.14: Elektropherogramm der DNOC/DNP-Trennung. Detektion mit dem UV-VIS-Detektor. Konzentration: DNOC 19 mg/l, DNP: 18 mg/l, Durchmesser der Kapillare: 75 μm , Wellenlänge: 364 nm, Puffer: 50 mM SDS, 100 mM Borsäure und 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert: 7,0, Feldstärke: 164,8 V cm^{-1} , Aufgabespannung: 2,5 kV, Aufgabzeit: 20 s

Die Retentionszeiten für DNOC und DNP werden in der folgenden Tabelle angegeben.

Substanz	DNOC	DNP
Retentionszeit [min]	17,1	18,1

Tab. 3.4: Retentionszeiten der DNOC/DNP-Trennung

Die Reproduzierbarkeit der Trennung wurde aus der Standardabweichung der Peakflächen aus zehn gleichen Trennungen (Detektion mit dem UV-VIS-Detektor) bestimmt. In Tabelle 3.5 sind die Reproduzierbarkeiten der DNOC/DNP Trennung dargestellt.

Wie man sieht, ist die Reproduzierbarkeit nicht ausreichend, um quantitative Bestimmungen durchzuführen. Grund für die geringe Reproduzierbarkeit ist die Probenaufgabe. Mit dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Aufbau der CE ist nur eine elektrokinetische Aufgabe der Probe möglich, wobei die Spannung mit einem Potentiometer eingestellt wird und die Zeitmessung mit einer Stoppuhr erfolgt, d. h. die Probenaufgabe ist nicht automatisiert. Sowohl durch sehr kleine Ungenauigkeiten in der Zeitmessung als auch durch ungleiches Einstellen des Potentiometers ändert sich die Probenaufgabemenge, da diese von der Aufgabezeit und der Aufgabespannung abhängig ist (siehe Gleichung 3.5).

Die Verbesserung der Probenaufgabe kann nur durch eine Automatisierung erreicht werden. Daher wurden alle weiteren Messungen mit einem vollautomatisierten Probenaufgabesystem (Thermo-Separation-Products (TSP), Modell 100) durchgeführt. Die Probenaufgabe erfolgt mit dem neuen System hydrodynamisch (Vakuum).

Für die oben beschriebene Trennung erhält man nun, bei einer Probenaufgabezeit von einer Sekunde, folgende Reproduzierbarkeiten (Tabelle 3.5).

Substanz	DNOC	DNP
Reproduzierbarkeit [%] Eigenaufbau	16	20
Reproduzierbarkeit [%] Thermo-Separation-Products	4	3

Tab. 3.5: Reproduzierbarkeiten der DNOC/DNP-Trennung. Vergleich zwischen der Eigenbau Probenaufgabe (elektrokinetisch) und der automatisierten Probenaufgabe (hydrodynamisch) von Thermo-Separation-Products.

Für diese Trennung wurde auch ein Vergleich der Thermischen Linse mit dem UV-VIS-Detektor durchgeführt. Beide Detektionsarten wurden bei einer Wellenlänge von 364 nm durchgeführt. Bei der TL-Detektion wurde mit einer Laserleistung von 200 mW und einer Chopperfrequenz von 40 Hz gearbeitet. Die Abbildungen 3.15 und 3.16 zeigen die Tren-

nung von DNOC/DNP, die bei denselben Trennparametern aufgenommen wurden, bei einer Konzentration von ca. 1 mg/l. In Abbildung 3.15 wurde mit dem UV-VIS-Detektor und in Abbildung 3.16 mit der Thermischen Linse detektiert.

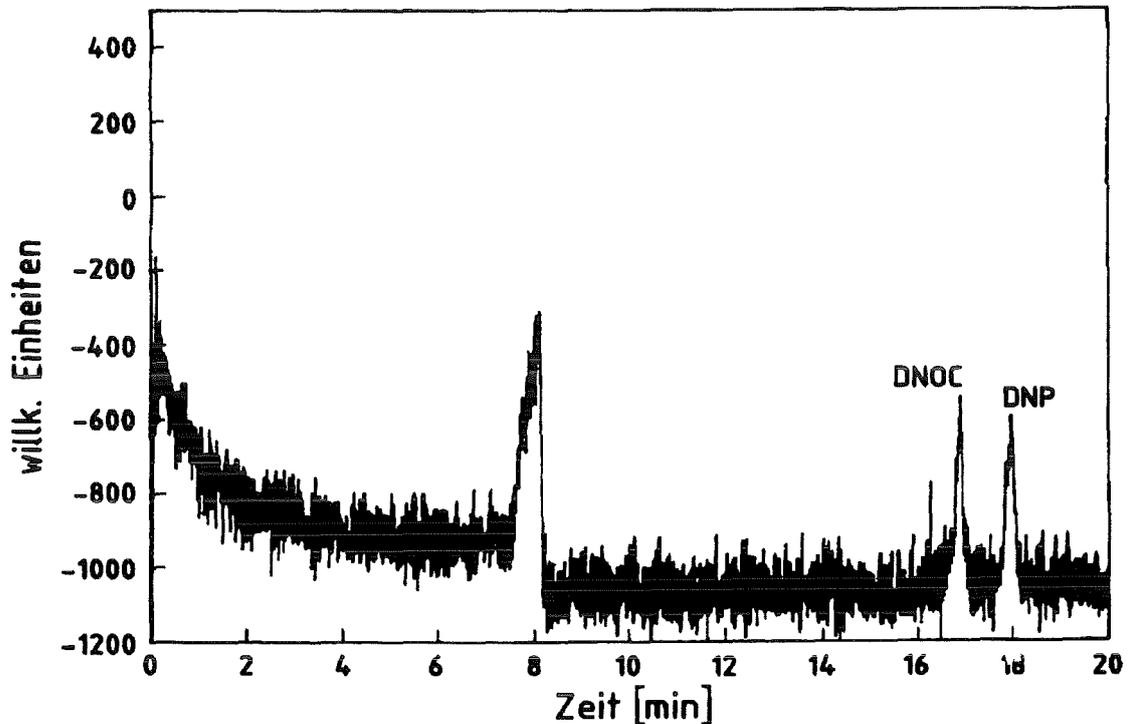


Abb. 3.15: Trennung von DNOC/DNP, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Konzentration: DNOC 0,95 mg/l, DNP: 0,92 mg/l, Durchmesser der Kapillare: 75 μm , Wellenlänge: 364 nm, Puffer: 50 mM SDS, 100 mM Borsäure und 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert: 7,0, Feldstärke: 164,8 V cm^{-1} , Aufgabezeit: 1 s (hydrodynamisch)

Man sieht, daß bei der Detektion mit dem UV-VIS-Detektor (Abbildung 3.15) die Peaks unterhalb der Nachweisgrenze liegen und im Rauschen der Basislinie verschwinden, während mit der Thermischen Linse (Abbildung 3.16) noch sehr gut detektiert werden kann. Das Auslesen der Daten bei der Detektion mit der Thermischen Linse (siehe Kapitel 3.2.2.1) wurde erst 13 min nach dem Start der Trennung begonnen.

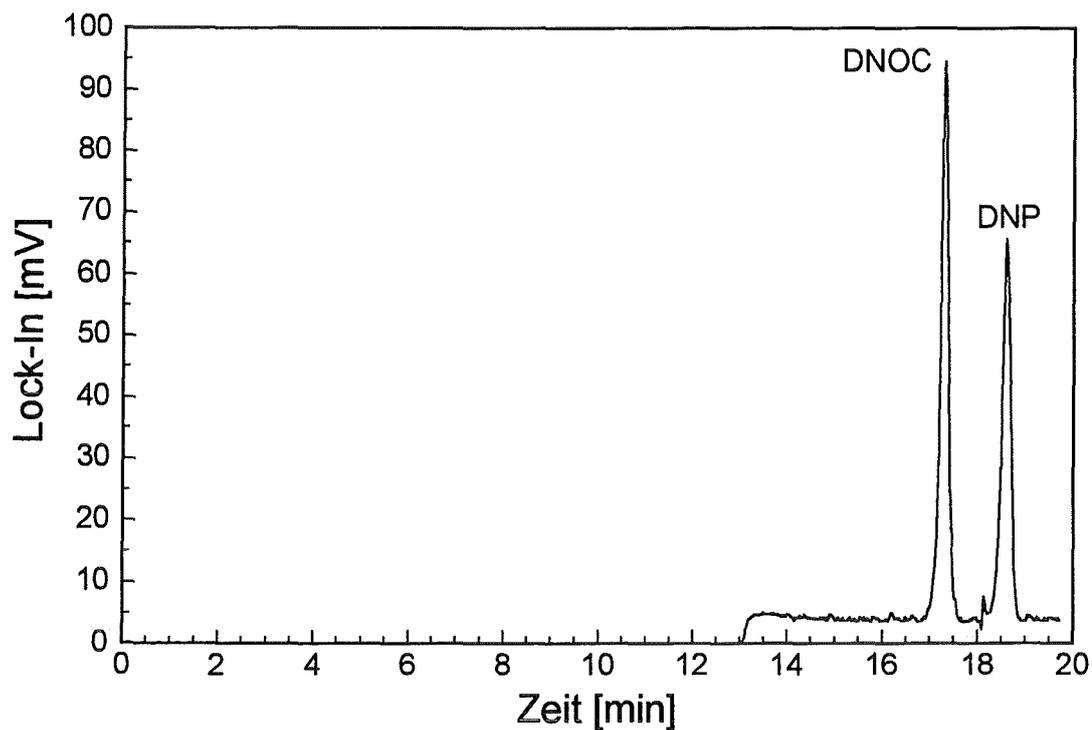


Abb. 3.16: Trennung von DNOC/DNP, detektiert mit der Thermischen Linse. Konzentration: DNOC 0,95 mg/l, DNP: 0,92 mg/l, Laserleistung: 200 mW, Wellenlänge: 364 nm, Chopperfrequenz: 40 Hz, Durchmesser der Kapillare: 75 μm , Puffer: 50 mM SDS, 100 mM Borsäure und 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert: 7,0, Feldstärke: 164,8 V cm^{-1} , Aufgabzeit: 1 s (hydrodynamisch)

Zur Aufstellung der Kalibrierkurven für die beiden Detektionsarten (Abbildungen 3.17 bis 3.20) wurde die Peakfläche (siehe Kapitel 3.2.1) ausgewertet.

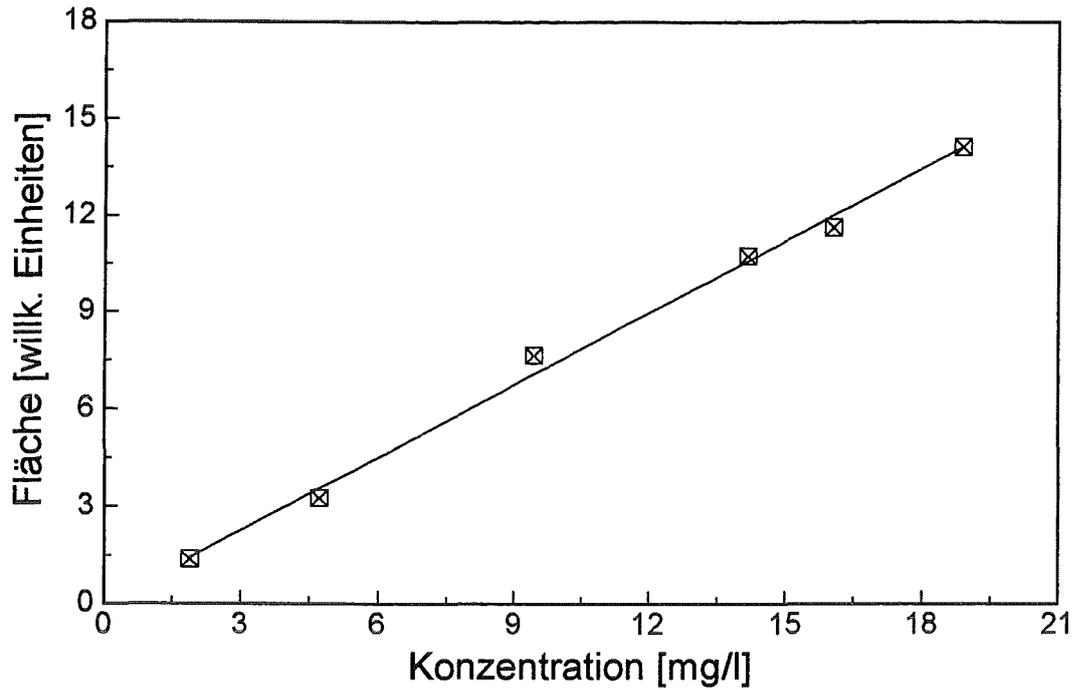


Abb. 3.17: Kalibrierkurve der DNOC/DNP-Trennung für DNOC. Detektion mit UV-VIS-Detektor, Wellenlänge: 364 nm, Durchmesser der Kapillare: 75 μm , Puffer: 50 mM SDS, 100 mM Borsäure und 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert: 7,0, Feldstärke: 164,8 V cm^{-1} , Aufgabezeit: 1 s (hydrodynamisch)

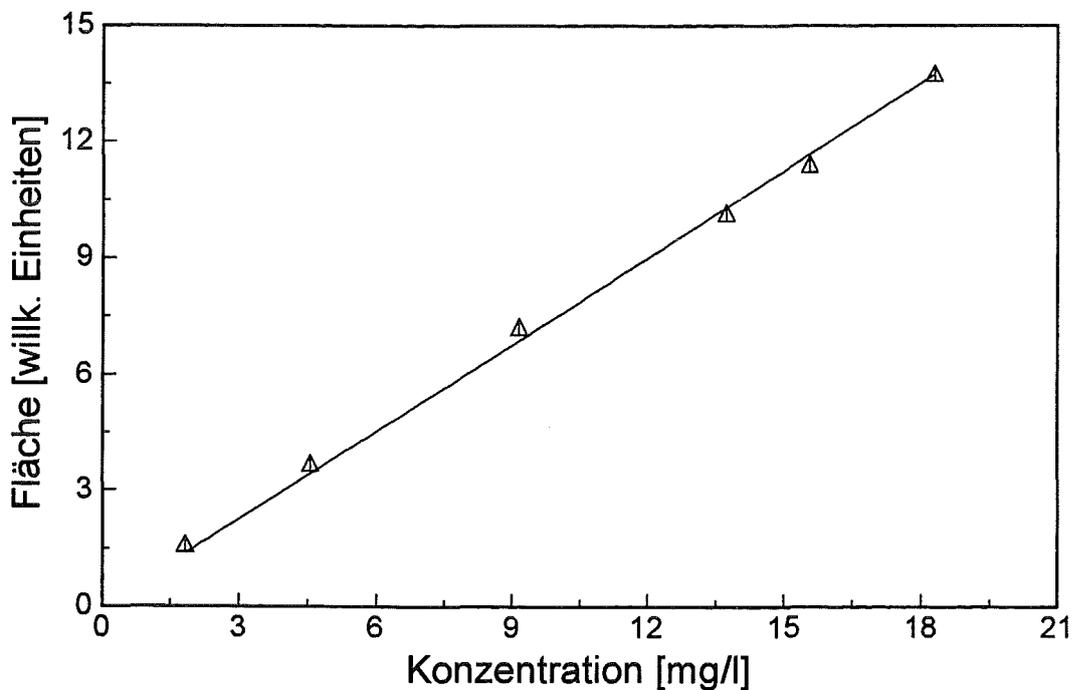


Abb.: 3.18: Kalibrierkurve der DNOC/DNP-Trennung für DNP. Detektion mit UV-VIS-Detektor, Wellenlänge: 364 nm, Durchmesser der Kapillare: 75 μm , Puffer: 50 mM SDS, 100 mM Borsäure und 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert: 7,0, Feldstärke: 164,8 V cm^{-1} , Aufgabezeit: 1 s (hydrodynamisch)

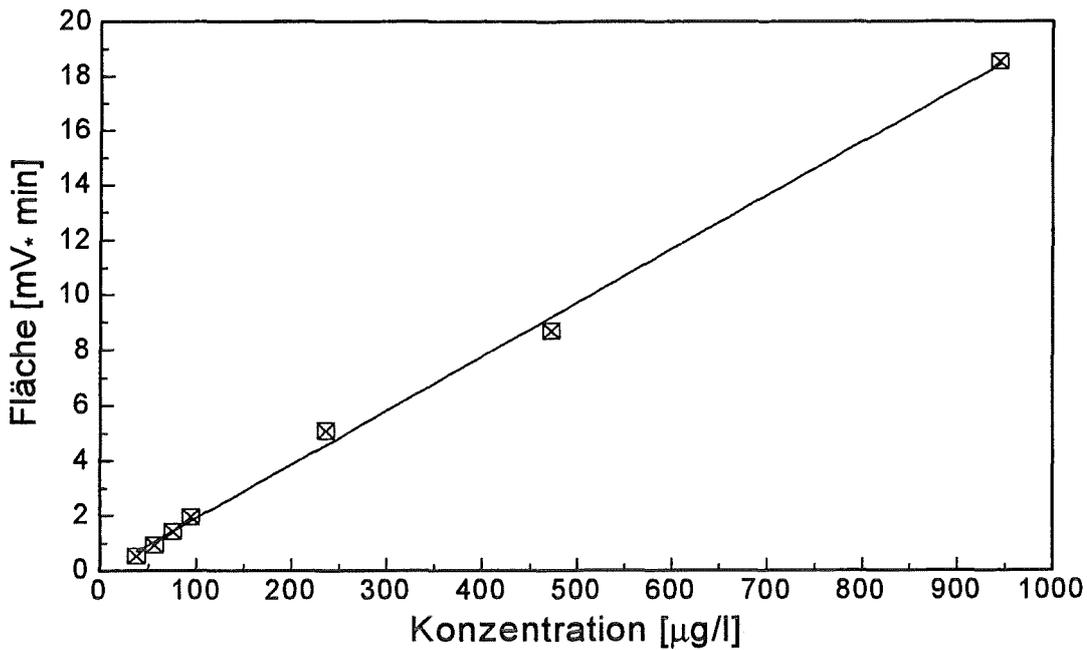


Abb. 3.19: Kalibrierkurve für die DNOC/DNP-Trennung für DNOC. Detektion mit der Thermischen Linse. Laserleistung: 200 mW, Wellenlänge: 364 nm, Chopperfrequenz: 40 Hz, Durchmesser der Kapillare: 75 µm, Puffer: 50 mM SDS, 100 mM Borsäure und 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert: 7,0, Feldstärke: 164,8 V cm⁻¹, Aufgabzeit: 1 s

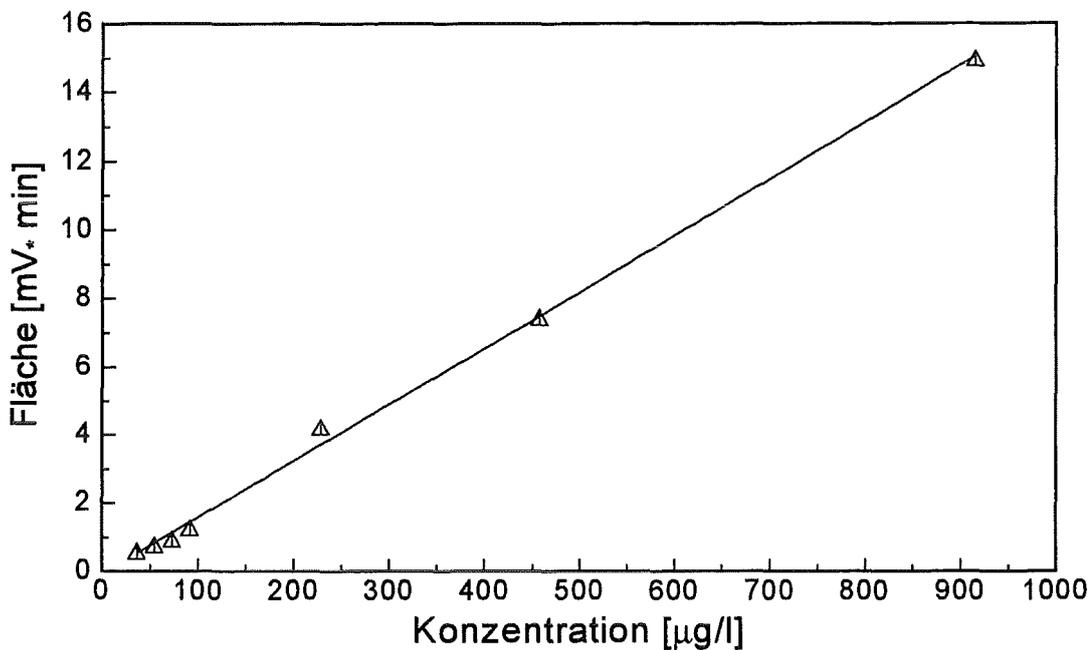


Abb. 3.20: Kalibrierkurve für die DNOC/DNP-Trennung für DNP. Detektion mit der Thermischen Linse. Laserleistung: 200 mW, Wellenlänge: 364 nm, Chopperfrequenz: 40 Hz, Durchmesser der Kapillare: 75 µm, Puffer: 50 mM SDS, 100 mM Borsäure und 50 mM Natriumphosphat, pH-Wert: 7,0, Feldstärke: 164,8 V cm⁻¹, Aufgabzeit: 1 s

Die Nachweisgrenzen für beide Detektionsarten sind in Tabelle 3.6 dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben den Korrelationskoeffizienten an.

Detektor ↓ / Substanz →	Nachweisgrenze [mg/l]	
	DNOC	DNP
UV-VIS	1,9 (0,997)	1,8 (0,999)
Thermische Linse	0,038 (0,997)	0,037 (0,999)

Tab. 3.6: Nachweisgrenzen für die DNOC/DNP-Trennung. UV-VIS-Detektor und Thermische Linse im Vergleich

Mit der Nahfeld-Thermischen Linse wurden für die Trennung von DNOC/DNP bei einer Wellenlänge von 364 nm Nachweisgrenzen erhalten, die um einen Faktor 50 besser sind als mit einem konventionellen UV-VIS-Detektor. WALDRON UND DOVICH I geben bei ihren Messungen mit der Thermischen Linse eine um ein bis zwei Größenordnungen bessere Nachweisgrenze als mit einem Absorptionsdetektor an. Ihre Messungen wurden jedoch mit einem klassischen Aufbau der Thermischen Linse durchgeführt, bei dem der Abstand zwischen Kapillare und Lochblende bzw. Photodiode 30 cm betrug. Durch den kleinen Abstand (1 cm) zwischen Kapillare und Photodiode, der bei der Nahfeld-Thermischen Linse realisiert wurde, konnte die die Gerätedimension bestimmende Aufweitungsstrecke gegenüber einem herkömmlichen Aufbau der Thermischen Linse stark reduziert werden, wodurch eine wichtige Voraussetzung zum Bau eines kommerziellen Detektors geschaffen wurde. Den erst durch einen miniaturisierten Thermischen Linse Detektor läßt sich ein handliches und robustes Detektorsystem realisieren.

Durch diese Messungen zeigt sich, daß die Thermische Linse für die Detektion in kleinen Volumina [NOLAN ET AL. 1984, CARTER UND HARRIS] prädestiniert ist. Die schlechten Nachweisgrenzen bei der Detektion mit dem UV-VIS-Detektor werden durch die geringe Schichtdicke (siehe Kapitel 2.1) der Kapillare verursacht.

Wichtigstes Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ist somit der Nachweis der hervorragenden Eignung der Nahfeld Thermischen Linse als Detektionssystem für die Kapillarelektrophorese.

4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

4.1 Einführung in die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Chromatographie ist eine physikalisch-chemische Trennmethode, bei der die Stofftrennung auf unterschiedlichen Verteilungen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase beruht. Stehen stationäre und mobile Phase in innigem Kontakt miteinander, so stellt sich ein Verteilungsgleichgewicht einer Substanz X ein, das durch den Verteilungskoeffizienten K_X wiedergegeben ist [BARROW].

$$K_X = \frac{c_{stat}}{c_{mob}} \quad \text{Gl. 4.1}$$

c_{stat} : Konzentration der Substanz X in der stationären Phase

c_{mob} : Konzentration der Substanz X in der mobilen Phase

Um ein Stoffsystem trennen zu können, müssen die Komponenten unterschiedliche Verteilungskoeffizienten besitzen.

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography, HPLC) besteht die stationäre Phase aus Teilchen kleiner $10 \mu\text{m}$, um eine große spezifische Oberfläche zu erhalten. Dementsprechend müssen hohe Drücke (bis 400 bar) zum Durchpressen der mobilen Phase angewandt werden (der schematische Aufbau der HPLC ist in Abbildung 4.2).

Eine Einführung in die HPLC wird von MEYER und GOTTWALD gegeben, an die sich die folgenden Ausführungen anlehnen.

Aus den bei der HPLC erhaltenen Chromatogrammen können neben der qualitativen und der quantitativen Bestimmung von Substanzen Angaben über die Güte einer Trennung gemacht werden. Die wichtigsten Kenngrößen werden im folgenden erläutert (siehe auch Abbildung 4.1).

Die *Retentionszeit* t_R ist die Zeit, welche von der Injektion eines Stoffes bis zur Registrierung seines Peakmaximums verstreicht. Ihr Wert ist für gleiche Trennbedingungen für eine Substanz spezifisch und wird zur qualitativen Bestimmung benutzt.

Als *Totzeit* t_0 bezeichnet man die Zeit, die die mobile Phase von der Injektion aus benötigt, um durch die Trennsäule bis zum Detektor zu wandern.

Anstelle der Retentionszeit wird häufig für die Charakterisierung einer Substanz der dimensionslose *Kapazitätsfaktor* k' eingeführt. Er ist definiert als Quotient aus der Differenz von

Retentionszeit und Totzeit und der Totzeit (Gleichung 4.2). Der Kapazitätsfaktor ist unabhängig von der Säulenlänge und der Fließgeschwindigkeit des Eluenten.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Gl. 4.2}$$

Kleine Kapazitätsfaktoren entsprechen kurzen Analysenzeiten.

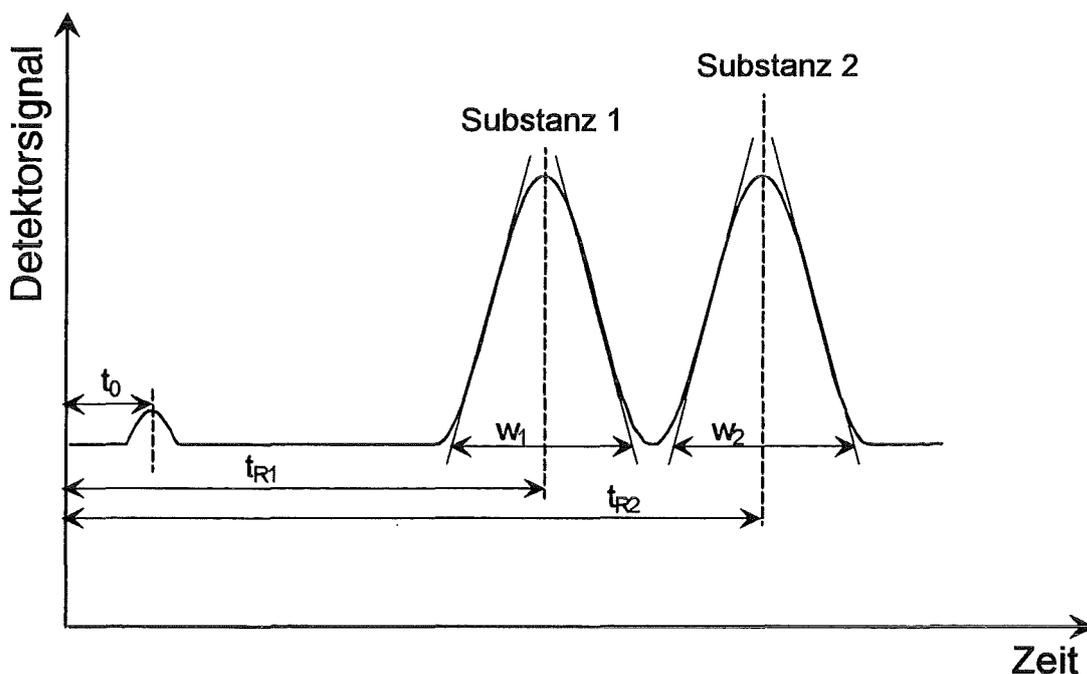


Abb. 4.1: Darstellung der Parameter zur Charakterisierung eines Chromatogrammes

Für die Beurteilung der Trenngüte zweier Komponenten ist die *Auflösung* R der Peaks in Einzelpeaks wichtig. Sie ist definiert durch den Quotienten aus der Differenz der Retentionszeiten der Peaks und der halben Summe der Peakbreiten w_i (Gleichung 4.3).

$$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \quad \text{Gl. 4.3}$$

Bei einer Auflösung von 1 sind die Peaks noch nicht vollständig voneinander getrennt, erst bei einer Auflösung von 1,4 sind die Peaks bis zur Basislinie getrennt. Für die quantitative Bestimmung reicht eine Auflösung von 1,25 aus [GOTTWALD].

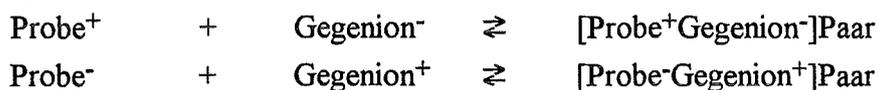
4.1.1 Reversed-Phase-Chromatographie

Die Reversed-Phase-Chromatographie (RP) (Phasenumkehrchromatographie) wird hauptsächlich zur Trennung unpolarer Substanzen eingesetzt. Bei der Reversed-Phase-Chromatographie ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Die am häufigsten ver-

wendete stationäre Phase ist chemisch gebundenes Octadecylsilan, ein n-Alkan mit 18 C-Atomen (RP-18). Die Probensubstanzen werden von der Oberfläche des unpolaren RP-Materials in der Säule um so stärker zurückgehalten, je unpolarer sie sind, d. h. um so weniger sie in Wasser löslich sind. Wasser kann die unpolaren Alkylgruppen nicht benetzen und nicht in Wechselwirkungen mit ihnen treten. Es ist daher die schwächste aller mobilen Phasen und eluiert die Probe am langsamsten. Daher kann man mit dem Wassergehalt des Eluenten die Elutionszeiten stark verändern.

4.1.2 Ionenpaarchromatographie

Ionische Substanzen können mit der Reversed-Phase-Chromatographie nur bedingt getrennt werden. Deshalb wird für die Trennung von ionischen Substanzen die Ionenpaarchromatographie eingesetzt. Bei der Ionenpaarchromatographie wird der mobilen Phase ein organischer ionischer Stoff zugesetzt, welcher mit der entgegengesetzt geladenen Probenkomponente ein Ionenpaar bildet. Dieses ist eigentlich ein Salz, aber nach außen (d. h. in seinem chromatographischen Verhalten) ein nicht-ionisches organisches Molekül [MEYER].



Dieses Ionenpaar läßt sich mit der Reversed-Phase-Chromatographie trennen.

4.1.3 Durchführung der chromatographischen Trennungen

Bei *isokratischen Trennungen* wird während der Durchführung der Trennung die Zusammensetzung des Eluenten nicht geändert. Im Gegensatz dazu stehen die *Gradiententrennungen*, bei denen während der chromatographischen Trennung die Zusammensetzung der mobilen Phase geändert wird. Dabei wird der Lösungsmittelgradient so gewählt, daß die Elutionskraft der mobilen Phase während der Trennung zunimmt. Bei der Reversed-Phase-Chromatographie wird z. B. der Wassergehalt der mobilen Phase im Verlauf der Trennung verringert.

Man unterscheidet zwischen *linearen Lösungsmittelgradienten*, bei denen die Lösungsmittelzusammensetzung kontinuierlich geändert wird und zwischen *Stufengradienten*, bei denen die Lösungsmittelzusammensetzung stufenweise geändert wird.

Gradiententrennungen werden eingesetzt, da sie es ermöglichen, auch komplexe Substanzgemische aufzutrennen. Würde ein solches Gemisch isokratisch getrennt, so würden die zuerst erhaltenen Peaks schlecht aufgelöst sein und manche Substanzen könnten überhaupt nur sehr schwer eluiert werden. Durch Lösungsmittelgradienten ist es möglich, die zuerst erhaltenen Substanzpeaks besser aufzutrennen (durch die anfangs schwächere Elutionskraft der mobilen Phase) und die schwer zu eluierenden Substanzen in einer kürzeren zu Zeit eluieren (durch die später stärkere Elutionskraft der mobilen Phase).

4.2 Experimenteller Teil zur cw-modulierten Thermischen Linse

4.2.1 HPLC-Anlage

Für die Ausarbeitung der Trennungen und für einen Vergleich der Detektoren (Thermische Linse und Absorptionsdetektor) wurde ein HPLC-System der Firma Hewlett Packard (Serie 1050) verwendet. Dieses System besteht aus Einzelkomponenten, die zusammengestellt werden können, und damit auch einen Anschluß der Thermischen Linse an die HPLC-Anlage vereinfachen. Des weiteren bestand die Möglichkeit, für Kontrollzwecke zusätzlich noch einen Absorptionsdetektor nach dem Thermischen-Linsen-Detektor einzusetzen. Der schematische Aufbau der HPLC-Anlage ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

Die HPLC-Anlage besteht aus einer Niederdruckgradientenpumpe (Hewlett Packard, Serie 1050) mit maximal vier Kanälen. Die Probenaufgabe erfolgt über ein Six-Port-Ventil (Rheodyne, Modell 7125) mit einer Probenschleife von 50 µl. Das Lösungsmittel wurde vor dem Gebrauch mit einem 0,45 µm Cellulose Acetat Filter (Sartorius) gereinigt und mit Hilfe der Heliumentgasungsanlage (Hewlett Packard, Serie 1050) entgast. Zur Detektion wurde ein variabler Wellenlängendetektor (Hewlett Packard, Serie 1050) im Bereich von 190 nm - 600 nm eingesetzt. Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Chromatographiesoftware Gynkosoft der Firma Gynkotek. Bei den erhaltenen Chromatogrammen wurde die Peakhöhe ausgewertet.

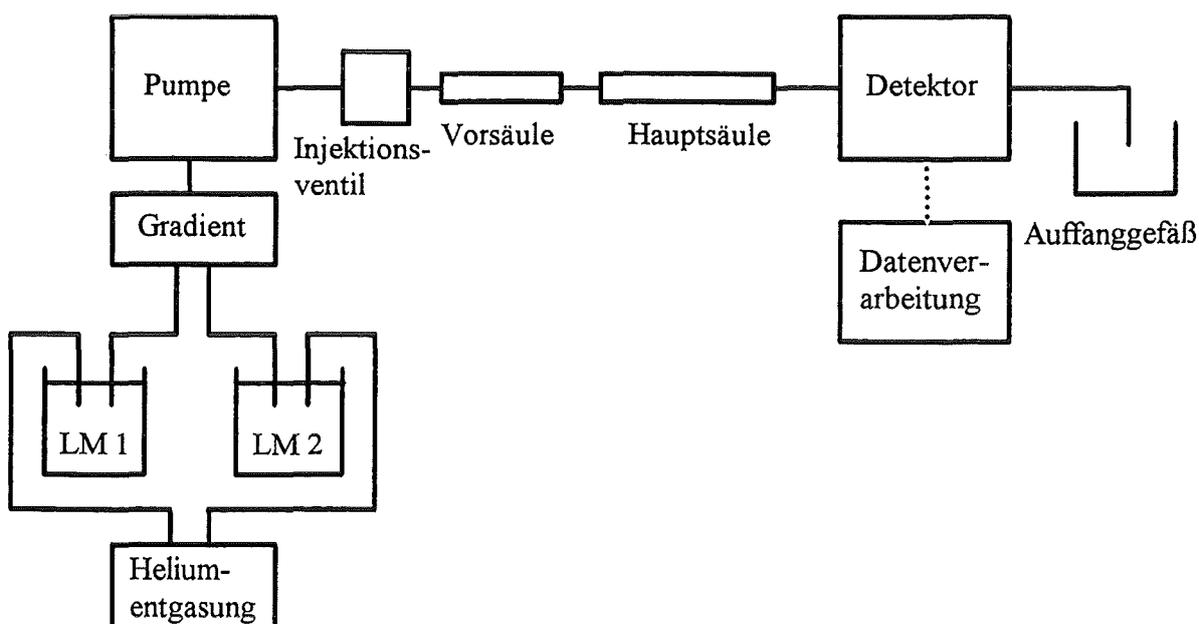


Abb. 4.2: Schematischer Aufbau der HPLC. LM 1, LM 2: Lösungsmittelvorratsgefäße

4.2.2 Aufbau der cw-modulierten Thermischen Linse

Für die Detektion mit der Thermischen Linse wurde diese sowohl kollinear als auch transversal aufgebaut. Der kollineare Aufbau der Thermischen Linse ist in der Arbeit von SCHULZ beschrieben. Er geht auch ausführlich auf die theoretischen Berechnungen von Power [POWER 1990, POWER UND SALIN 1988] ein, die zu dem Aufbau der sogenannten Nahfeld-Thermischen Linse führten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Thermische Linse zusätzlich noch in transversaler Anordnung realisiert. Beide Arten des Aufbaus werden nachfolgend kurz beschrieben.

4.2.2.1 Kollinearer Aufbau der cw-modulierten Thermischen Linse

Den Aufbau der kollinearen Thermischen Linse als Detektorsystem für die HPLC zeigt Abbildung 4.3. Als Anregungslaser (Argon) diente ein Dauerstrich (continuous wave - cw) Argonionenlaser (Coherent, Innova 200) bei einer Wellenlänge von 364 nm mit einer Laserleistung von maximal 800 mW am Laserausgang. Die Modulation des Anregungslaserstrahls erfolgte durch einen mechanischen Chopper (CH) (Scitec Instruments, Modell 300) mit einer Frequenz zwischen 5 Hz und 40 Hz. Als Probenlaser diente ein 1 mW HeNe-Laser (HeNe) (Uniphase 1101P). Der HeNe-Laserstrahl wurde durch eine -20 mm Bikonkav-Linse (L2), die 12,5 cm vor der Küvette angebracht wurde, aufgeweitet. Die Fokussierung des Anregungslaserstrahls in die Küvette erfolgte durch eine 200 mm Plankonvex-Linse (L1). Die beiden Laserstrahlen wurden über einen Langpaßkantenfilter (ST) (Laseroptik) mit einer maximalen Transmission bei 633 nm und einer maximalen Reflexion bei 364 nm kollinear eingekoppelt. Im Abstand von 2 cm hinter der Küvette befand sich eine Lochblende (P) mit einem Durchmesser von 1 mm. Der Durchmesser der Lochblende wurde so gewählt, daß der Anregungslaserstrahl diese ungehindert passieren konnte. Im Anschluß an die Lochblende befand sich die Detektionsoptik. Durch diese wurde die optimale Ausleuchtung der photoempfindlichen Fläche gewährleistet und der Anregungslaser durch Interferenzfilter ($\lambda_T = 633$ nm) ausgeblendet. Über eine Photodiode (PD1) (UDT, Modell 260) mit einem spektralen Empfindlichkeitsbereich von 300 nm bis 1100 nm und einer Detektoroberfläche von 25 mm² wurde die Thermische Linse aufgenommen. Die kollineare Justage der beiden Laserstrahlen erfolgte mit Hilfe der Irisblende (IB) und der Lochblende (P). Bei den Messungen war die Irisblende geöffnet. Mit einem Leistungsmeßgerät (Laser Instrumentation, Modell 7100) ist die Leistung des Anregungslasers mit dem Photodetektor (PD) kontrolliert worden. Für den gesamten Aufbau wurden Komponenten der Spindler & Hoyer Mikrobank verwendet. Die elektronische Meßwerterfassung ist in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben.

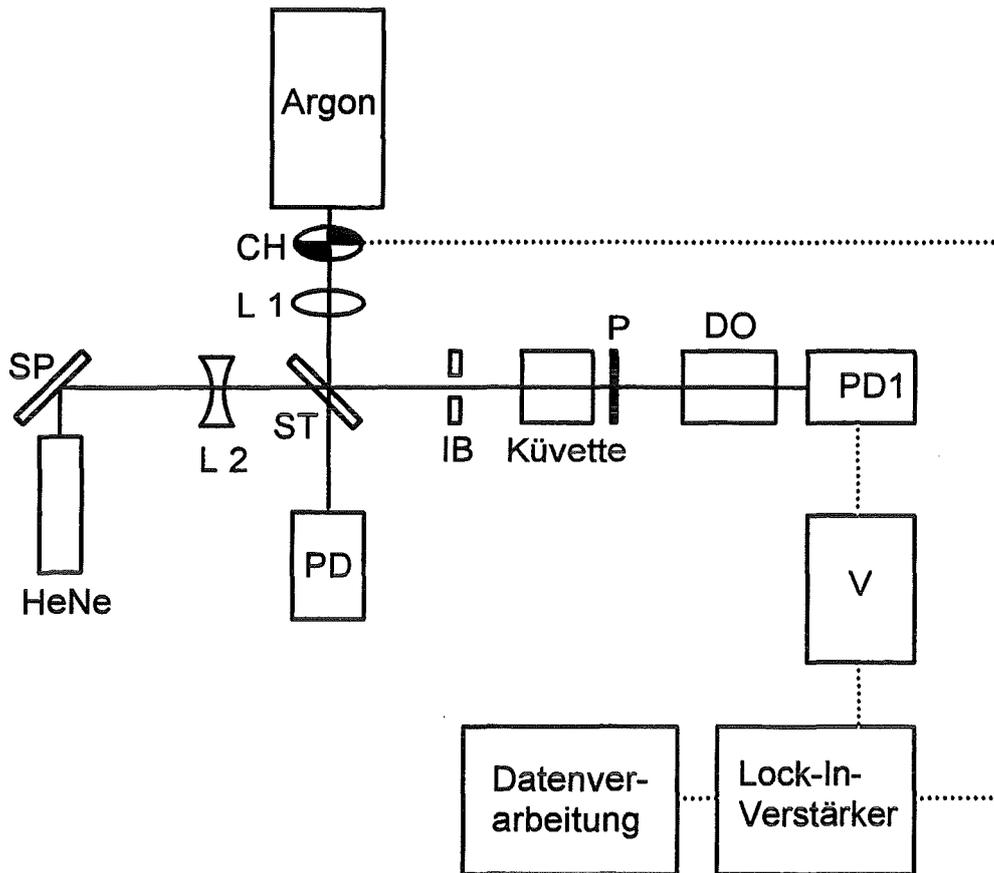


Abb. 4.3: Aufbau der kollinearen Thermischen Linse. Argon: Argonionenlaser, CH: Chopper, L 1: Sammellinse, HeNe: HeNe-Laser, SP: Spiegel, L 2: Aufweitungslinse, ST: Strahlteiler, IB: Irisblende, P: Lochblende, DO: Detektionsoptik, PD: Photodetektor, PD1: Photodiode, V: Vorverstärker, Lock-In: Lock-In-Verstärker

Küvetten

Bei der kollinearen Thermischen Linse kamen verschiedene Küvettentypen zum Einsatz. Statische Messungen wurden mit einer Küvette aus Quarzglas (Hellma, Modell 111-QS) mit einer Schichtdicke von 10 mm durchgeführt.

Für Durchfluß- und HPLC-Messungen wurden zwei unterschiedliche Typen von Durchflußküvetten verwendet. Die Küvetten (Hellma, Modell 178) vom Typ 1 sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Sie hatten eine Schichtdicke von 10 mm und zylindrische Probenräume. Durch unterschiedliche Probenraumdurchmesser ergaben sich unterschiedliche Probenvolumina (siehe Tabelle 4.1).

Die Küvetten waren mit Edelstahl-Röhrchen mit 1,6 mm Außendurchmesser zur Zu- und Abführung der Analyten versehen. Die Innendurchmesser der Röhrchen waren abhängig vom Volumen der Probenkammer (siehe Tabelle 4.1). Durch diese Röhrchen konnten die Küvetten mit Swagelok-Verbindungen an die HPLC-Pumpe angeschlossen werden. Die Durchflußrichtung des Analyten verläuft in Richtung der Strahlachse der beiden Laserstrahlen.

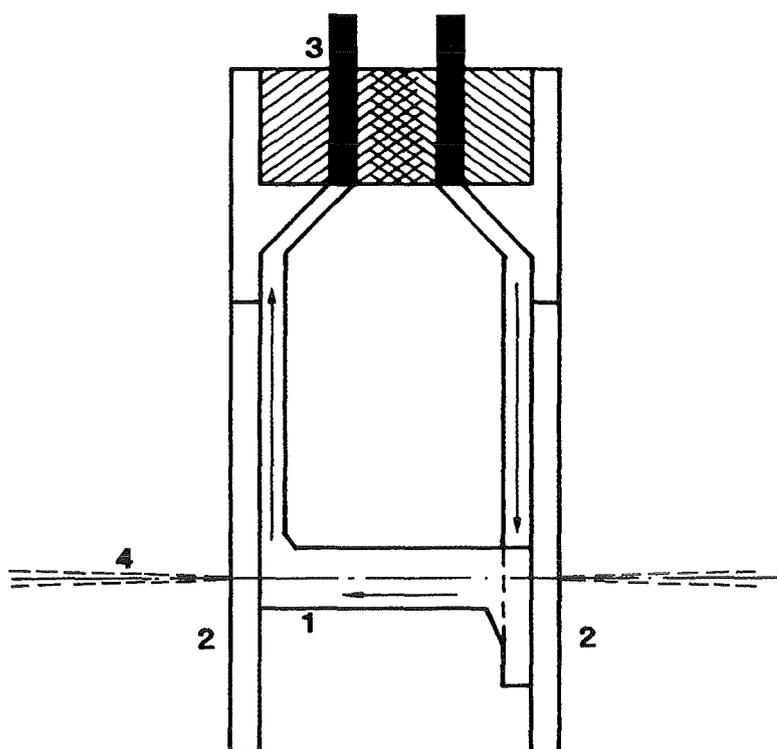


Abb. 4.4: Durchflußküvette mit einer Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. 1: Probenkammer, 2: Fenster, 3: Edelstahlröhrchen, 4: Laserstrahlen

Den zweiten Küvettentyp zeigt Abbildung 4.5. Diese Durchflußküvette (Hellma, Modell 176.352-QS) ist eine Fluoreszenzküvette mit drei Fenstern (das dritte Fenster liegt senkrecht zur Strahlachse und ist in der Abbildung 4.5 nicht mit eingezeichnet). Die Schichtdicke der Küvette beträgt 1,5 mm. Die Zu- und Abführung (siehe Tabelle 4.1) der Analytlösung erfolgt ebenfalls über Edelstahlröhrchen (in der Abbildung nicht zu sehen). Im Gegensatz zu der vorhergehenden Küvette (Typ 1) verläuft die Durchflußrichtung der Analytlösung senkrecht zu den beiden Laserstrahlen.

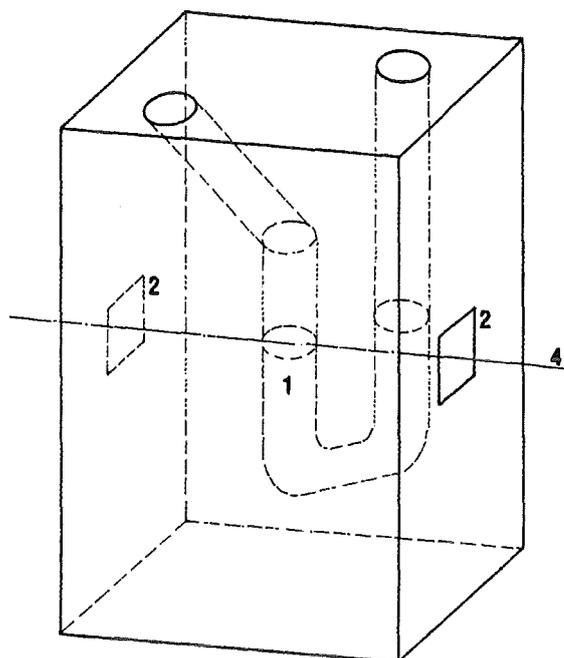


Abb. 4.5: Durchflußküvette mit einer Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. 1: Probenkammer, 2: Fenster, 4: Laserstrahlen (Anregungs- und Detektionslaser sind kollinear angeordnet)

Küvette	Apertur	Volumen	Röhrchen Einlauf	Röhrchen Ablauf
Typ 1	Ø [mm]	[µl]	Ø [mm]	Ø [mm]
A	1	8	0,25	0,5
B	1,5	18	0,25	0,5
C	2	30	0,5	1,1
D	3	80	1,1	1,1
Typ 2	-	25	1,1	1,1

Tab. 4.1: Parameter der verwendeten Durchflußküvetten

4.2.2.2 Aufbau der cw-modulierten transversalen Thermischen Linse

Der Aufbau der transversalen Thermischen Linse ist in Abbildung 4.6 abgebildet. Er ist einfacher als der kollineare Aufbau. Die beiden Laserstrahlen werden in einem 90°-Winkel über die Linsen L1 und L2 in die Küvette fokussiert. Für den Anregungslaserstrahl (Argon) wird eine 140 mm Plankonvex-Linse (L1) und für den Detektionslaserstrahl (HeNe) eine -20 mm

Bikonkav-Linse (L2) verwendet. Beim transversalen Aufbau entfallen die aufwendige kollineare Justage der beiden Laserstrahlen und die Interferenzfilter in der Detektionsoptik zum Ausblenden des Anregungslaserstrahls. Die verwendete Lochblende hatte einen Durchmesser von 600 μm und wurde 2 cm hinter der Küvette angebracht. Die Aufzeichnung des Thermischen Linsen-Signals erfolgte wie bei der kollinearen Meßanordnung.

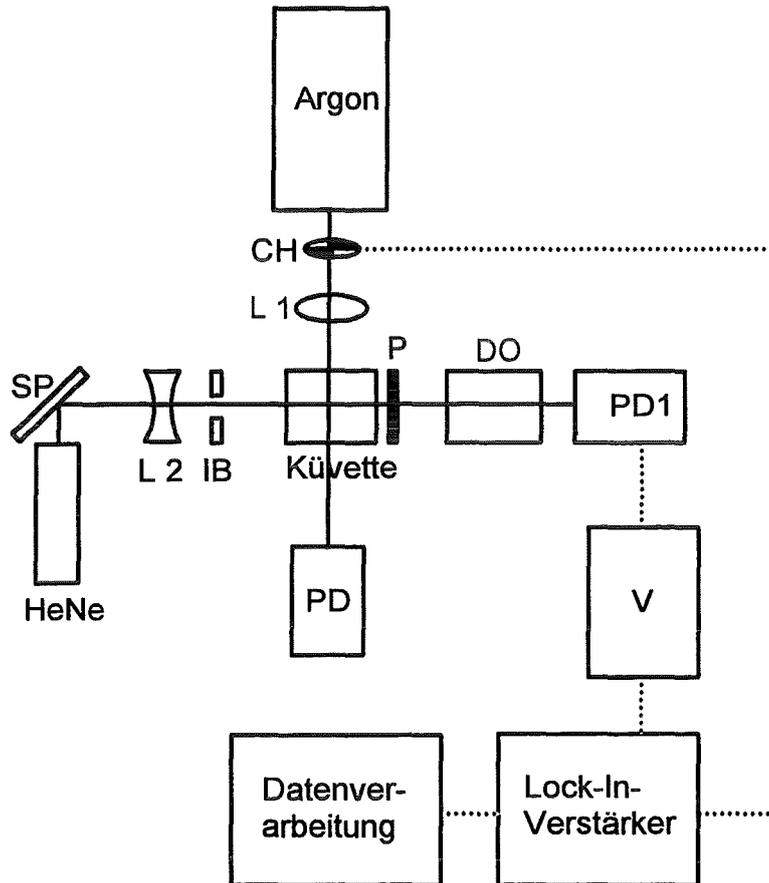


Abb. 4.6: Transversaler Aufbau der Thermischen Linse. Argon: Argonionenlaser, CH: Chopper, L 1: Sammellinse, HeNe: HeNe-Laser, SP: Spiegel, L 2: Aufweitungslinse, ST: Strahlteiler, IB: Irisblende, P: Lochblende, DO: Detektionsoptik, PD: Photodetektor, PD1: Photodiode, V: Vorverstärker, Lock-In: Lock-In-Verstärker

Küvetten

Für statische Messungen wurde wie beim kollinearen Aufbau eine Quarzküvette (Hellma, Modell 111-QS) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Für Durchflußmessungen und für die HPLC-Detektion wurde die in Abbildung 4.7 dargestellte Küvette benutzt. Die Küvette ist gleich aufgebaut wie die, die für die kollinearen Messungen mit der Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen verwendet wurde (siehe Kapitel 4.2.2.1). Um transversale Messungen zu ermöglichen, wurde diese Küvette mit einem vierten Fenster ausgestattet (Spezialanfertigung von Hellma). Die Küvette hatte eine Schicht-

dicke von 1,5 mm und Edelstahlröhrchen für den Anschluß an die HPLC-Pumpe. Die Durchflußrichtung des Analyten verlief senkrecht zu den Laserstrahlen.

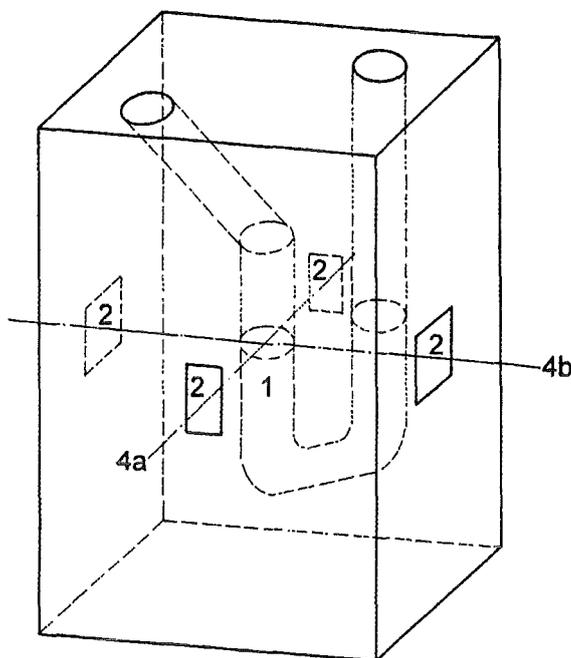


Abb. 4.7: Durchflußküvette für die transversale Thermische Linse. 1: Probenkammer, 2: Fenster, 4a: Anregungslaserstrahl, 4b: Detektionslaserstrahl

4.2.3 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Die chromatographische Trennung wurde mit den in Methanol gelösten Dinitrophenolverbindungen 2,4-Dinitrophenol (DNP) (Merck), 2,4-Dinitro-6-methylphenol (DNOC) (Riedel de Haën), Dinoseb (DS) (Riedel de Haën) und Dinoterb (Riedel de Haën) durchgeführt. Die Struktur der vier Substanzen ist in Abbildung 4.8 abgebildet. Im alkalischen Bereich liegen sie als Phenolat-Ionen mit einer Absorptionsbande bei 364 nm vor. (Das Absorptionsspektrum von DNOC für zwei verschiedene pH-Werte ist in Kapitel 3.2.5 abgebildet). Durch ihre ionische Struktur können sie durch Ionenpaarchromatographie getrennt werden. Als Ionenpaarreagenz wird Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimid) (Merck) verwendet. Der pH-Wert wird mit Phosphatpuffer (Merck) eingestellt. Als Eluent für die Trennung werden Mischungen aus Methanol (LiChrosolv, gradient grade, Merck) und Wasser (deionisiert, bidestilliert) verwendet. Die Substanzen eignen sich sowohl für isokratische als auch für Trennungen mit einem Lösungsmittelgradienten. Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen und für Durchflußexperimente wurden ausschließlich DNOC-Lösungen bei einem pH-Wert von 7 verwendet.

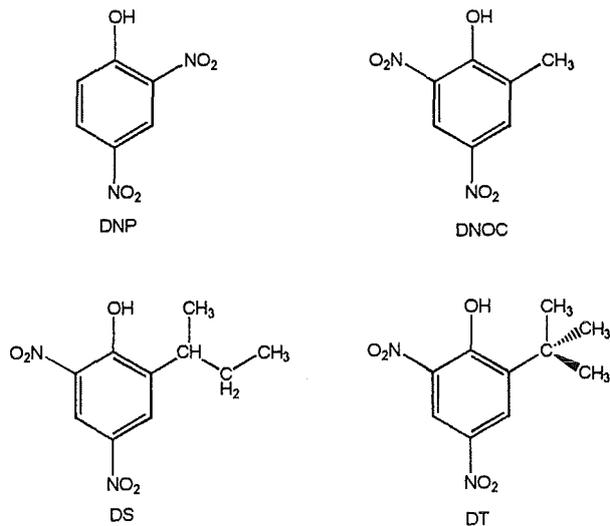


Abb. 4.8: Struktur der Dinitrophenolverbindungen

4.3 Ergebnisse und Diskussion der cw-modulierten Thermischen Linse

Ziel der Arbeit war unter anderem die Anpassung der Thermischen Linse als Detektorsystem an die HPLC. Dabei sollte vor allem die Eignung der Thermischen Linse bei Gradiententrennungen untersucht werden. Deshalb liegt der Schwerpunkt folgender Erläuterungen auf dem Einfluß eines Lösungsmittelgradienten auf die HPLC-Detektion mit der Thermischen Linse. Wichtigstes Ziel war, die Leistungsfähigkeit der Thermischen Linse vor allem im Hinblick auf eine hohe Nachweisgrenze zu untersuchen. Parameter wie Chopperfrequenz und Laserleistung, die das Thermische Linsen-Signal beeinflussen, wurden schon bei Schulz [SCHULZ], Bohnert [BOHNERT] und Khuen [KHUEN] untersucht, daher wird auf diese nicht mehr eingegangen. Die Abhängigkeit des Thermischen Linsen-Signals von der Strömungsgeschwindigkeit spielt für die Anwendung als Detektor eine Rolle, weshalb die durchgeführten Durchflußexperimente nachfolgend beschrieben werden.

4.3.1 Die Abhängigkeit des TL-Signals von der Durchflußgeschwindigkeit

Der Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf das Thermische Linsen-Signal wird in der Literatur von verschiedenen Autoren behandelt [VYAS UND GUPTA, DOVICH I UND HARRIS 1981, WEIMAR UND DOVICH I A, B, C, NICKOLAISEN UND BIALKOWSKI, SONTAG UND TAM, ROSE ET AL., VYAS ET AL.]. In der instationären Wärmeleitungsgleichung (siehe Anhang A), die von GUPTA auf die Thermische Linse angewendet wurde, wird neben dem Wärmequellterm und der Temperaturleitfähigkeit auch die Konvektion berücksichtigt.

SCHULZ hat in seiner Arbeit den Einfluß der Durchflußgeschwindigkeit auf das Thermische Linsen-Signal diskutiert, wobei er Küvetten mit kubischem ($450 \mu\text{l}$) und zylindrischem Probenvolumen (siehe Kapitel 4.2.2.1 Typ 1, $80 \mu\text{l}$ und $8 \mu\text{l}$) mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen verwendet hat. Daher werden in dieser Arbeit hauptsächlich Durchflußexperimente mit der Küvette Typ 2 (siehe Kapitel 4.2.2.1) mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen beschrieben.

Die eingezeichneten Linien in den nachfolgend gezeigten Abbildungen 4.9 bis 4.12 sollen keine theoretischen Berechnungen darstellen, sie dienen nur zur Orientierung für das Auge.

Zum Vergleich wird in Abbildung 4.9 die Abhängigkeit des Thermischen Linsen-Signals von der Strömungsgeschwindigkeit und der Chopperfrequenz gezeigt. Die Messungen wurden mit dem kollinearen Aufbau der Thermischen Linse bei einer Wellenlänge von 364 nm mit Küvettentyp 1 ($8 \mu\text{l}$) durchgeführt. Als Analyt diente eine Lösung von $200 \mu\text{g/l}$ DNOC in Wasser.

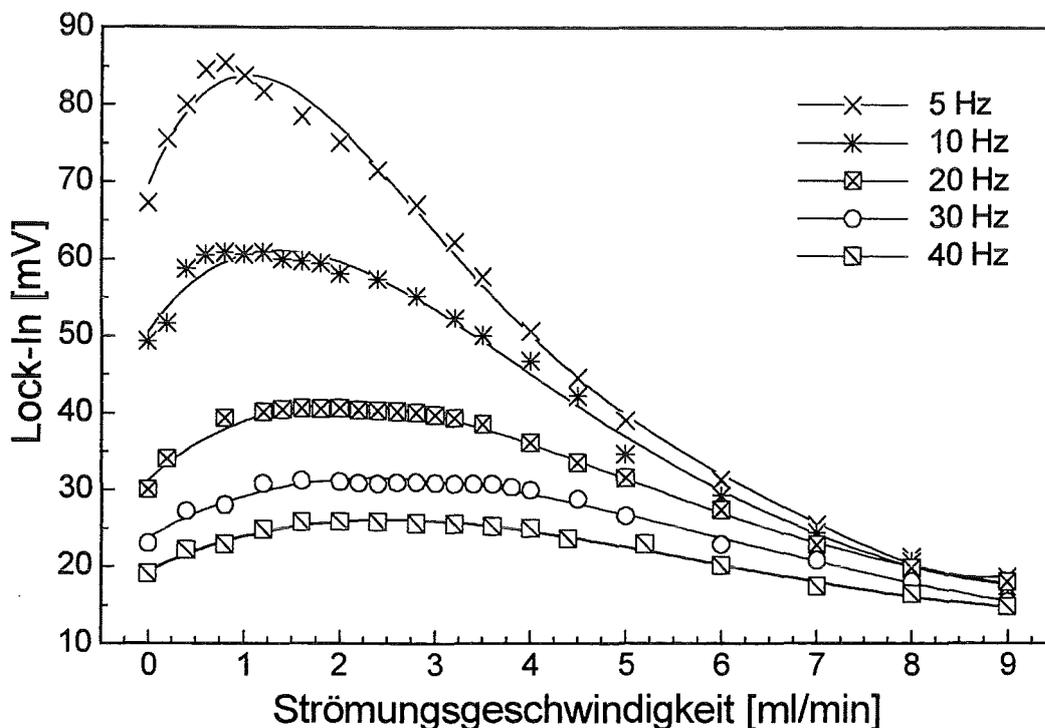


Abb. 4.9: TL-Signal in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Chopperfrequenzen. Kollinearer Aufbau der Thermischen Linse. Küvette: Typ 1, $8 \mu\text{l}$ mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen. Analyt: $200 \mu\text{g/l}$ DNOC in Wasser

Bei kleinen Chopperfrequenzen nimmt das TL-Signal zunächst mit der Strömungsgeschwindigkeit zu, durchläuft ein Maximum und nimmt dann bei höheren Geschwindigkeiten ab. Das Auftreten eines Maximums bei kleinen Strömungsgeschwindigkeiten wurde auch von DELORME gemessen. Eine schlüssige Erklärung für das Auftreten eines Maximums konnte bis heute noch nicht gefunden werden. Mit steigender Chopperfrequenz ist das Maximum immer weniger ausgeprägt und zu höheren Strömungsgeschwindigkeiten ver-

schoben. Aus diesen Messungen ist zu erkennen, daß mit steigender Chopperfrequenz der Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf das Thermische Linsen-Signal geringer wird, gleichzeitig nimmt jedoch auch die Sensitivität des Thermischen Linsen-Signals ab. Die Abnahme des Thermischen Linsen-Signals bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten ist die Folge eines erhöhten Wärmeaustrags durch erzwungene Konvektion.

Mit steigender Chopperfrequenz und gleichbleibender Laserleistung nimmt die Größe des TL-Signals ab, da die Anregungsphasen kürzer werden und somit insgesamt weniger Energie eingestrahlt wird.

Bei Messungen, die mit demselben Aufbau der Thermischen Linse (kollinear), jedoch mit der Küvette Typ 2 mit einer Strömungsrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen, durchgeführt wurden, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Das Maximum der Kurven ist zu kleineren Strömungsgeschwindigkeiten verschoben. Unabhängig von der Chopperfrequenz zeigt das Thermische Linsen-Signal ab 4 ml/min keine weitere Abnahme mehr und ab 5 ml/min konnten keine Messungen mehr durchgeführt werden, da die Thermische Linse durch die erzwungene Konvektion aus dem Detektionsbereich ausgetragen wurde. Für Durchfluß- bzw. HPLC-Messungen bedeutet dies, daß dieser Küvettentyp nur bis zu Strömungsgeschwindigkeiten von 4 ml/min eingesetzt werden kann.

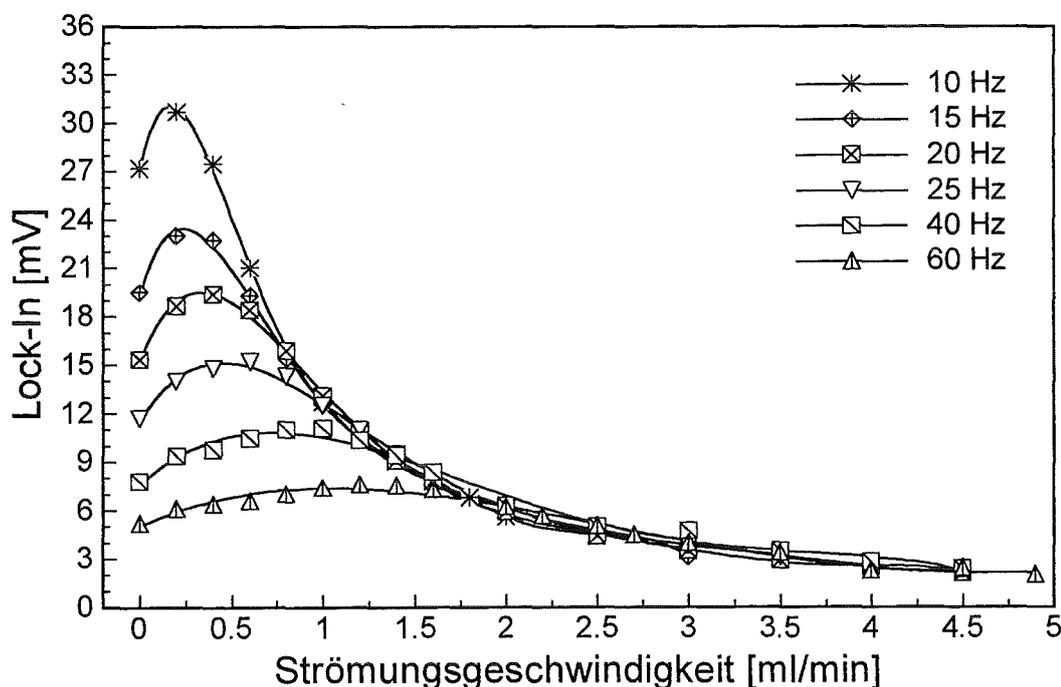


Abb. 4.10: TL-Signal in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Chopperfrequenzen. Kollinearer Aufbau der Thermischen Linse. Küvette: Typ 2, mit einer Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Analyt: 200 $\mu\text{g/l}$ DNOC in Wasser

In Abbildung 4.11 wird das prozentuale Rauschen in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit bei einer Chopperfrequenz von 20 Hz gezeigt. Das Rauschen wurde aus der Standardabweichung bestimmt. Es ist zu sehen, daß das Rauschen mit steigender Strömungsgeschwindigkeit stark zunimmt. Daher sollte bei Durchflußexperimenten bei möglichst kleinen Strömungsgeschwindigkeiten gemessen werden.

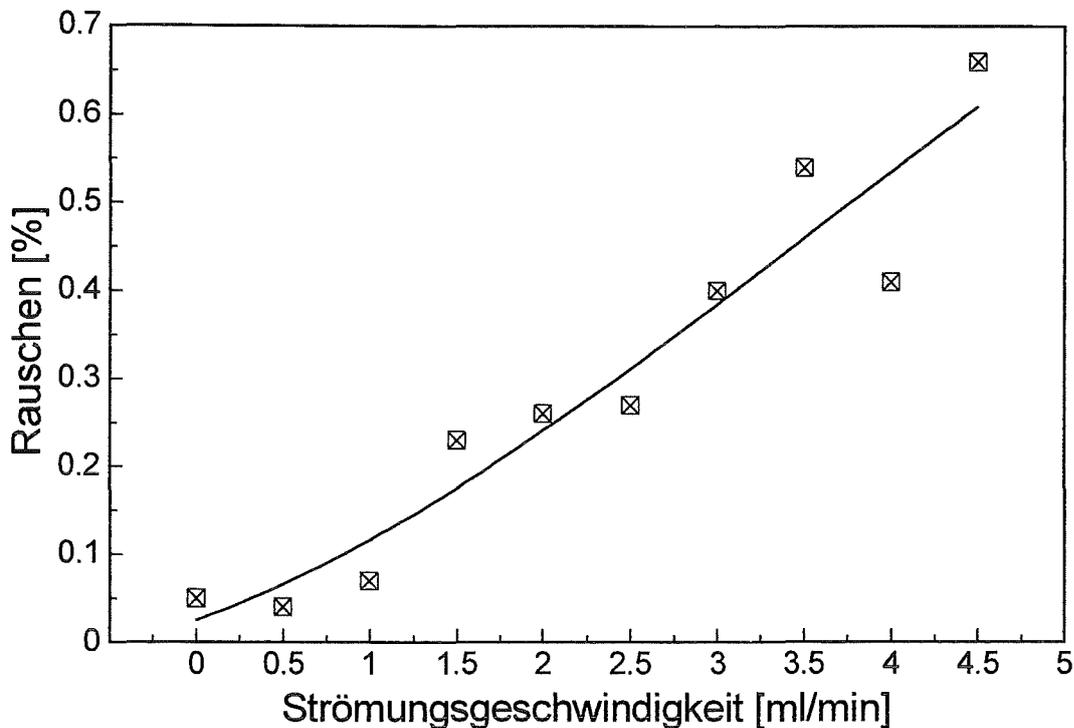


Abb. 4.11: Prozentuales Rauschen in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit bei einer Chopperfrequenz von 20 Hz. Kollinearer Aufbau, Küvette: Typ 2 mit der Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Analyt: 200 $\mu\text{g/l}$ DNOC in Wasser

Bei der Durchführung dieser Messungen mit Methanol als Lösungsmittel für DNOC (siehe Abbildung 4.12) erhält man wiederum denselben Verlauf wie bei Messungen mit Wasser als Lösungsmittel. Bei diesen Messungen ist jedoch das Maximum viel stärker ausgeprägt und der Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit auf das Thermische Linsen-Signal ist auch bei einer Chopperfrequenz von 60 Hz noch deutlich zu sehen. Dies wird durch die unterschiedlichen thermischen Eigenschaften von Methanol und Wasser verursacht, die in Kapitel 4.3.4.1 noch näher erläutert werden.

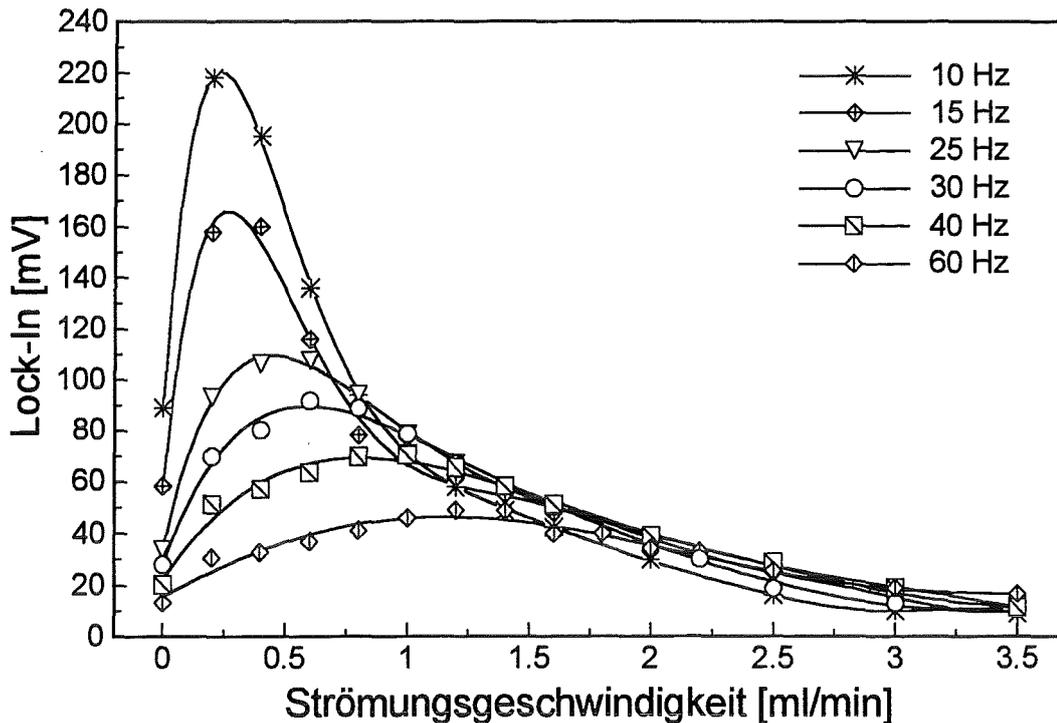


Abb. 4.12: TL-Signal in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Chopperfrequenzen. Kollinearer Aufbau der Thermischen Linse. Küvette: Typ 2, mit einer Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Analyt: 200 $\mu\text{g/l}$ DNOC in Methanol

Für den transversalen Aufbau wurde ebenfalls eine Durchflußküvette vom Typ 2 mit einer Strömungsrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen verwendet. Man erhält die gleichen Ergebnisse bezüglich der Abhängigkeit des Thermischen Linsen-Signals von der Chopperfrequenz und der Durchflußgeschwindigkeit wie für den kollinearen Aufbau mit der Durchflußküvette vom Typ 2, lediglich die absolute Größe des jeweiligen Thermischen Linsen-Signals (verursacht durch die kleinere Wechselwirkungsstrecke) ist geringer.

4.3.2 Kollinearer und transversaler Aufbau im Vergleich

Für die Eignung als Detektorsystem wurde sowohl der kollineare als auch der transversale Aufbau getestet. Jede Art des Aufbaus hat dabei Vor- und Nachteile. So zeichnet sich der transversale Aufbau durch seine Einfachheit aus, da weniger Komponenten (Spiegel, Filter) benötigt werden, und die aufwendige kollineare Justage nicht erforderlich ist. Der störende Untergrund, der beim kollinearen Aufbau durch den Anregungslaser trotz Ausblenden durch Filter entsteht, fällt beim transversalen Aufbau ebenfalls weg. Jedoch lassen sich beim kollinearen Aufbau größere Wechselwirkungsstrecken der Laserstrahlen verwirklichen als beim transversalen Aufbau, bei dem die Wechselwirkungsstrecke dem Durchmesser des Anregungslaserstrahls in der Küvette entspricht. Der transversale Aufbau ist daher durch ein kleines Probenvolumen gekennzeichnet, wie es im Kapitel 3 über die Kapillarelektrophorese gezeigt wurde.

Für den Vergleich wurde für beide Aufbauten eine Konzentrationsreihe von DNOC in wäßriger Lösung (pH 7) aufgenommen. Mit diesen Messungen wurde die Nachweisgrenze und die Empfindlichkeit der verschiedenen Detektorsysteme bestimmt (die Definition der Nachweisgrenze ist in Kapitel 3.3.1.5 erläutert). Im Falle linearer Kalibrierkurven stellt die Steigung der Kalibriergerade die Empfindlichkeit E dar [SCHWEDT 1992]. Folglich hat dann diejenige Detektionsmethode mit der größten Steigung der Kalibriergerade die höchste Empfindlichkeit. Die Messungen wurden stationär bei einer Wellenlänge von 364 nm, einer Chopperfrequenz von 6 Hz und einer Laserleistung von 150 mW durchgeführt. Die Küvette wurde, um Luftblasen zu vermeiden, sehr vorsichtig mit Hilfe einer Spritze gefüllt. Nach der Messung wurde die Küvette mit der Spritze leergesaugt, mehrmals mit Wasser und anschließend mit der neuen Meßlösung gespült. So wurde gewährleistet, daß keine Konzentrationsverfälschungen durch Restsubstanzen der vorhergehenden Messung auftraten. In Abbildung 4.13 sind die Ergebnisse für die Messungen mit dem kollinearen- und dem transversalen Aufbau gezeigt.

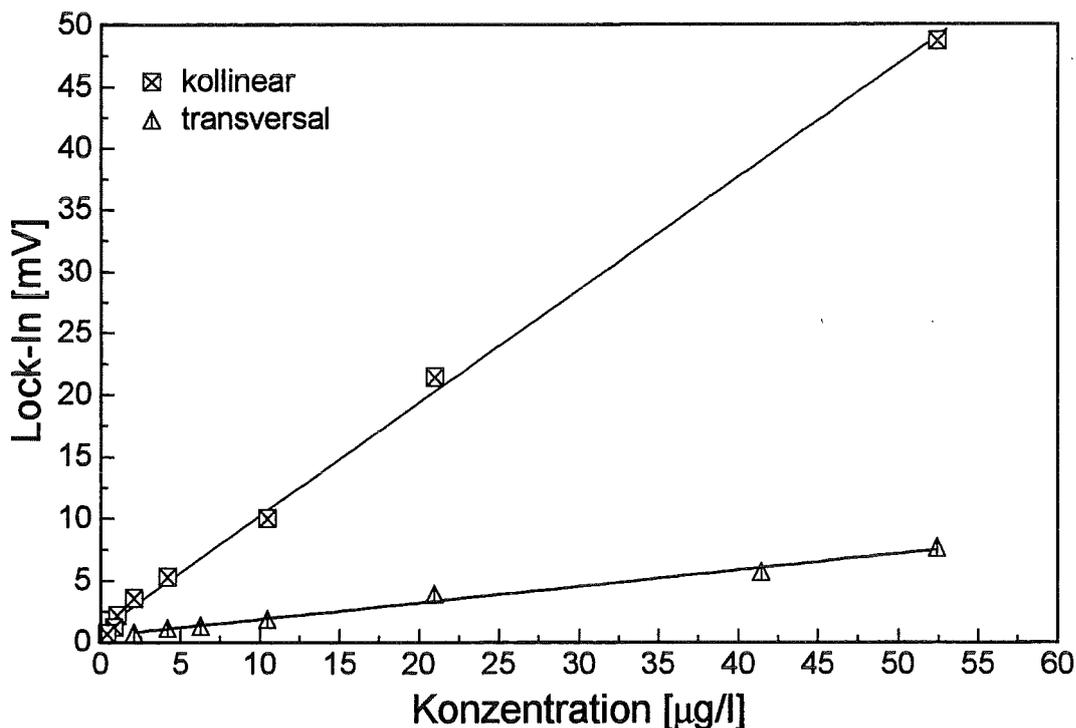


Abb. 4.13: Kalibriergeraden von DNOC in Wasser für den kollinearen- und den transversalen Aufbau der Thermischen Linse. Wellenlänge: 364 nm, Chopperfrequenz 6 Hz, Laserleistung: 150 mW, Durchflußgeschwindigkeit: 0 ml/min

Die Kalibrierkurven sind über mehrere Größenordnungen linear. Dies ist für den Einsatz als Detektor von großer Wichtigkeit. Die Nachweisgrenzen, die Steigungen als Maß für die Empfindlichkeit und die Korrelationskoeffizienten für beide Methoden sind in Tabelle 4.2 wiedergegeben.

	kollinear	transversal
Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]	0,2	2
Steigung [$\text{mV l}/\mu\text{g}$]	0,92	0,13
Korrelationskoeffizient	0,999	0,995

Tab. 4.2: Vergleich zwischen kollinearem und transversalem Aufbau

Mit dem kollinearen Aufbau wurde für statische Messungen eine um den Faktor zehn bessere Nachweisgrenze erhalten als für den transversalen Aufbau. Dies ist eine Folge der größeren Wechselwirkungsstrecke beim kollinearen Aufbau. Die Empfindlichkeit ist aus den selben Gründen für den kollinearen Aufbau um einen Faktor sieben größer.

4.3.3 Detektion bei Isokratischen Trennungen

Für einen Vergleich der Detektionsmethoden wurde die Trennung der Dinitrophenolverbindungen 2,4 Dinitrophenol (DNP), Dinitroorthokresol (DNOC), Dinoseb (DS) und Dinoterb (DT) ausgewählt (siehe Kapitel 4.2.3). Diese Substanzen eignen sich für eine Trennung mit der Reversed-Phase-Ionenpaarchromatographie (siehe Kapitel 4.1.1 und 4.1.2) und haben im neutralen bzw. alkalischen pH-Bereich eine Absorptionsbande bei der Laserwellenlänge von 364 nm. Verglichen wurde zwischen der Detektion mit einem UV-VIS-Detektor und der Thermischen Linse, wobei bei der Thermischen Linse nochmals zwischen drei verschiedenen Detektionsmethoden unterschieden wurde. Diese Methoden werden nachfolgend nochmals kurz erläutert:

- Kollinearer Aufbau der Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen (siehe Kapitel 4.2.2.1). Die Wechselwirkungsstrecke der Laserstrahlen war entsprechend der Schichtdicke der Küvette 10 mm, das Volumen der Küvette betrug 8 μl .
- Kollinearer Aufbau der Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen (siehe Kapitel 4.2.2.1). Die Wechselwirkungsstrecke der Laserstrahlen war entsprechend der Schichtdicke der Küvette 1,5 mm.
- Transversaler Aufbau der Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen (siehe Kapitel 4.2.2.2). Die Wechselwirkungsstrecke der Laserstrahlen war entsprechend dem Durchmesser des Anregungslaserstrahls in der Küvette 100 μm .

Die Trennung der Dinitrophenolverbindungen mit der Reversed-Phase-Ionenpaarchromatographie ist in der Literatur von Roseboom [ROSEBOOM ET AL. 1981 A, B] und Schikarski [SCHIKARSKI] beschrieben. Zur Einstellung des pH-Wertes wird Phosphatpuffer und als Ionenpaarreagenz Cetrimid (siehe Kapitel 4.2.3) verwendet. Als Eluent dient eine Mischung

von Methanol und Wasser. Unter den in der Literatur beschriebenen Bedingungen für die Trennung werden relativ lange Retentionszeiten benötigt, was an den Kapazitätsfaktoren k' in Tabelle 4.3 zu sehen ist. Kürzere Retentionszeiten können durch die Variation der Phosphatpuffer- und der Cetrimidkonzentration und durch das Methanol/Wasser-Verhältnis erreicht werden. Eine optimale Trennung der Dinitrophenolverbindungen wurde mit einer RP-18-Säule (Lichrosorb 5 μm , 250 mm * 4 mm), einem Volumenverhältnis von 80/20 Methanol/Wasser, einer Cetrimidkonzentration von 1,5 g/l und einer Phosphatkonzentration von 2 mM bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min erhalten.

In Abbildung 4.14 ist das Chromatogramm dieser Trennung zu sehen. Detektiert wurde mit dem UV-VIS-Detektor bei einer Wellenlänge von 364 nm.

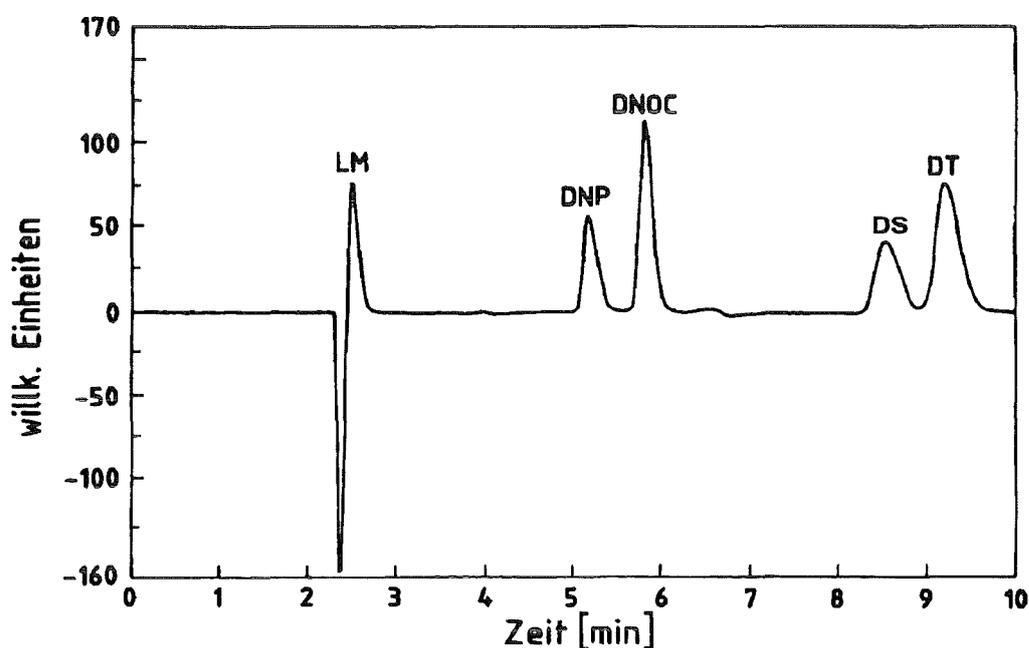


Abb. 4.14: Chromatogramm der Trennung, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Konzentration: DNP 490 $\mu\text{g/l}$, DNOC 460 $\mu\text{g/l}$, DS 500 $\mu\text{g/l}$, DT 750 $\mu\text{g/l}$

Nach 2,5 min erscheint der Lösungsmittelpeak (LM). Die Zeit vom Start der Trennung bis zu diesem Peak entspricht der Totzeit t_0 (siehe Kapitel 4.1). Man sieht, daß die Peaks gut voneinander getrennt sind. Die Auflösung (siehe Kapitel 4.1) für die DNP/DNOC-Peaks beträgt 2,04 und für die DS/DT-Peaks 1,36. Das heißt DNP und DNOC sind basisliniengetreunt und bei DS und DT reicht die Auflösung für eine quantitative Bestimmung aus.

Die Kapazitätsfaktoren k' (siehe Kapitel 4.1) dieser Trennung sind in Tabelle 4.3 aufgeführt. Durch die Variation der Parameter konnten die Kapazitätsfaktoren für DNP um den Faktor 1,5 und für DT sogar um den Faktor drei erniedrigt werden.

Substanz	Kapazitätsfaktor k'			
	DNP	DNOC	DS	DT
ROSEBOOM	1,66	3,33	6,73	8,0
Eigene Trennung	1,09	1,34	2,44	2,71

Tab. 4.3: Kapazitätsfaktoren der Trennung

Für die Trennung der Dinitrophenolverbindungen wurde mit dem UV-VIS-Detektor eine Konzentrationsreihe aufgenommen. Zur Aufstellung der Kalibrierkurven wurde die Peakhöhe ausgewertet. Die Kalibrierkurven sind in Abbildung 4.15 zu sehen. Der Übersichtlichkeit wegen werden an dieser Stelle nur die Kalibrierkurven für DNOC und DNP gezeigt, die Kalibrierkurven von DS und DT sind im Anhang D.1 in den Abbildungen D.1 und D.2 dargestellt.

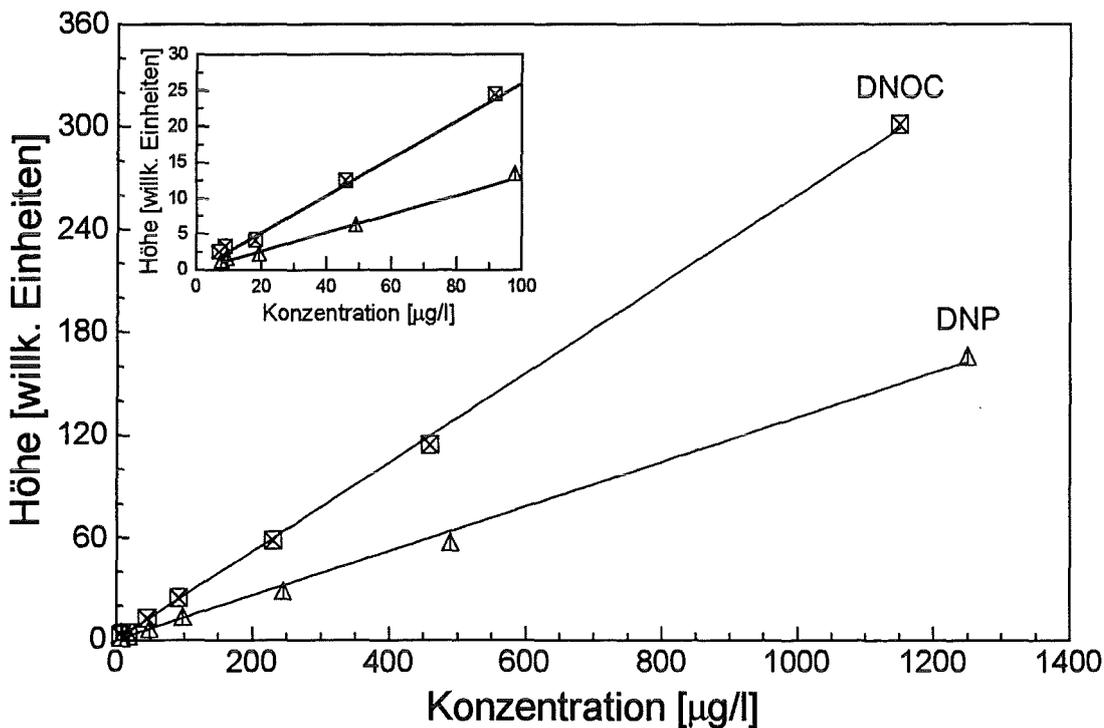


Abb. 4.15: Kalibrierkurven für DNOC und DNP, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor, der Ausschnitt zeigt den Bereich niedriger Konzentrationen. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min

Diese Trennung wurde mit genau denselben Trennparametern (s. o.) mit der Thermischen Linse detektiert, wobei alle drei oben beschriebenen Detektionsarten eingesetzt wurden. Die Detektionen wurden mit einer Chopperfrequenz von 20 Hz, einer Anregungslaserleistung von 150 mW und einer Wellenlänge von 364 nm durchgeführt. Abbildung 4.16 zeigt das Chromatogramm der Trennung, welches mit der kollinearen Thermischen Linse mit der 8 µl

Küvette mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen detektiert wurde. Auffallend ist der Lösungsmittelpeak bei 2,5 min, der im Gegensatz zur Detektion mit dem UV-VIS-Detektor ein unterschiedliches Aussehen hat. Der Lösungsmittelpeak wird durch Brechungsindexänderungen verursacht. Die Substanzen sind in Methanol gelöst, und diese Lösung wird über die Probenschleife aufgegeben. Als Eluent wurde eine 80/20 Methanol/Wasser-Mischung eingesetzt. Wenn nun das Methanol der Probenlösung am Detektor erscheint, verursacht es eine Brechungsindexänderung, welche von beiden Detektoren registriert wird. (Auf die Form des Lösungsmittelpeaks bei der Detektion mit der kollinearen Thermischen Linse wird noch genauer bei der Elution mit einem Stufengradienten (siehe Kapitel 4.3.4.2) eingegangen.) Die Konzentrationsreihen für DNOC und DNP sind in Abbildung 4.17 zu sehen. Die Kalibrierkurve verläuft linear über drei Größenordnungen. (Die Kalibrierkurven für DS und DT mit dieser Detektionsmethode sind im Anhang D.1 in den Abbildungen D.3 und D.4 dargestellt.)

Das Chromatogramm und die Konzentrationsreihen für DNP und DNOC mit der Detektion mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen sind in den Abbildungen 4.18 und 4.19 zu sehen. (Die Kalibrierkurven für DS und DT mit dieser Detektionsmethode sind im Anhang D.1 in den Abbildungen D.5 und D.6 dargestellt.)

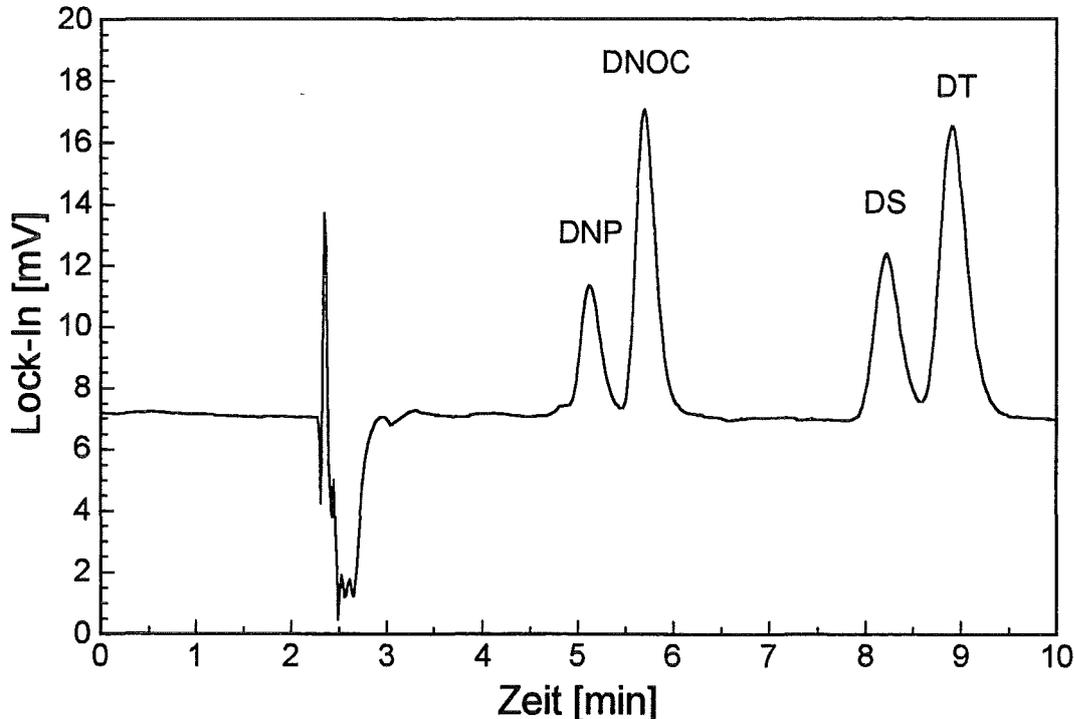


Abb. 4.16: Chromatogramm der Trennung, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min, Konzentration: DNP 19,5 µg/l, DNOC 18 µg/l, DS 20 µg/l, DT 30 µg/l

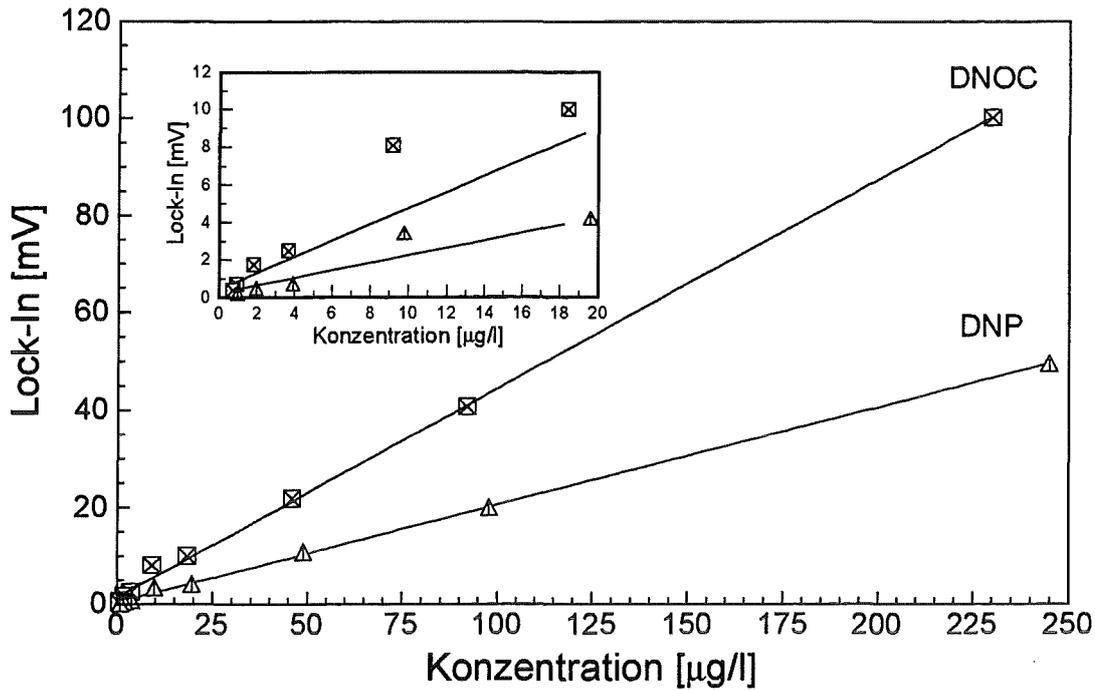


Abb. 4.17: Kalibrierkurven für DNOC und DNP, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min

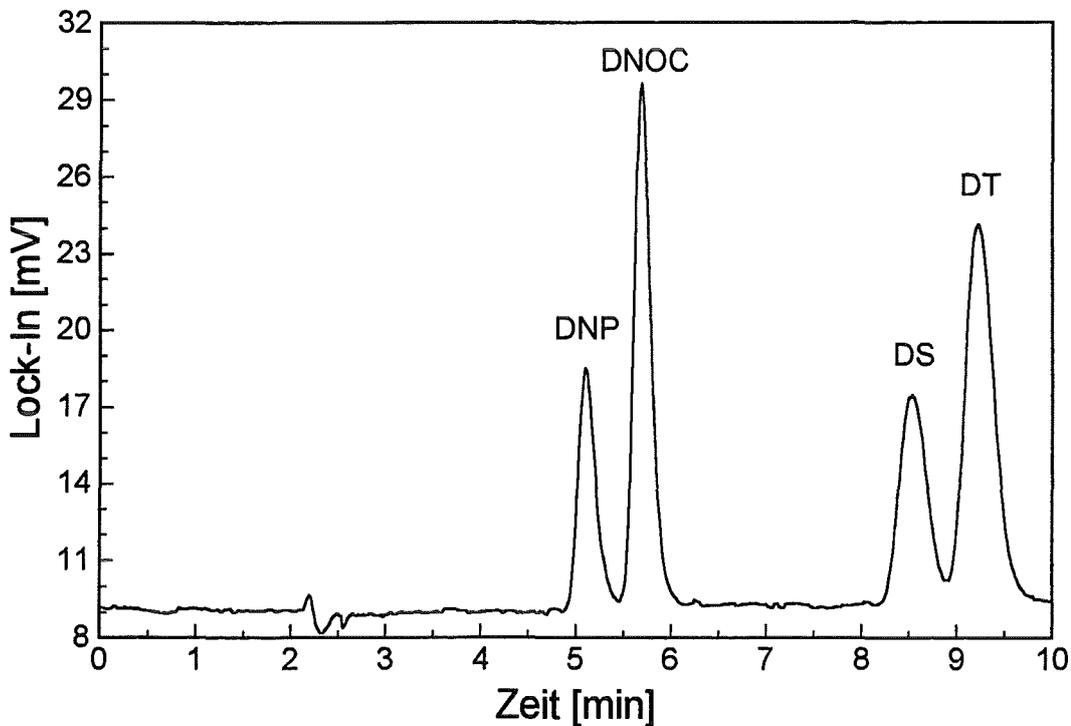


Abb. 4.18: Chromatogramm der Trennung, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min, Konzentration: DNP 98 $\mu\text{g/l}$, DNOC 92 $\mu\text{g/l}$, DS 100 $\mu\text{g/l}$, DT 150 $\mu\text{g/l}$

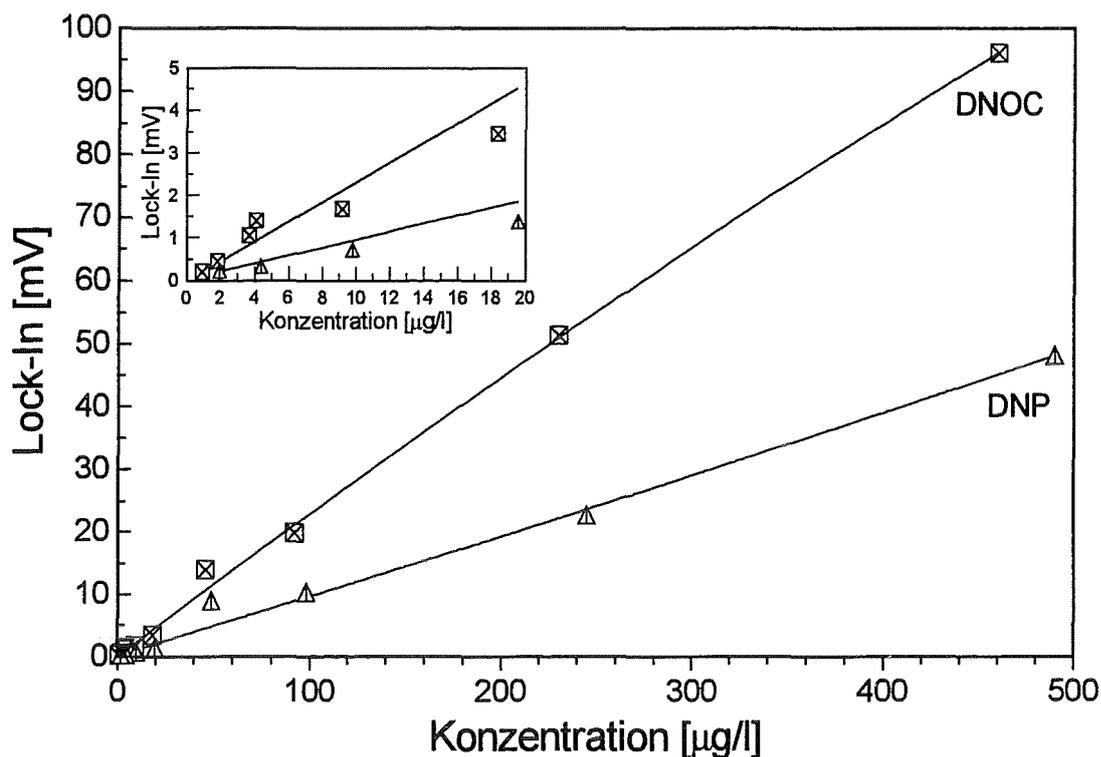


Abb. 4.19: Kalibrierkurven für DNOC und DNP, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min

Das mit der transversalen Thermischen Linse aufgenommene Chromatogramm ist in Abbildung 4.20 dargestellt, es entspricht dem Chromatogramm aufgenommen mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen; nur die absolute Größe des Thermischen Linsen-Signals ist kleiner (bedingt durch die kleinere Wechselwirkungsstrecke der Laserstrahlen). Die Kalibrierkurven für DNP und DNOC mit der transversalen Thermischen Linse Detektion sind in Abbildung 4.21 gezeigt. (Die Kalibriergeraden für DS und DT für diese Detektionsmethode sind in Anhang D.1 in den Abbildungen D.7 und D.8 dargestellt.)

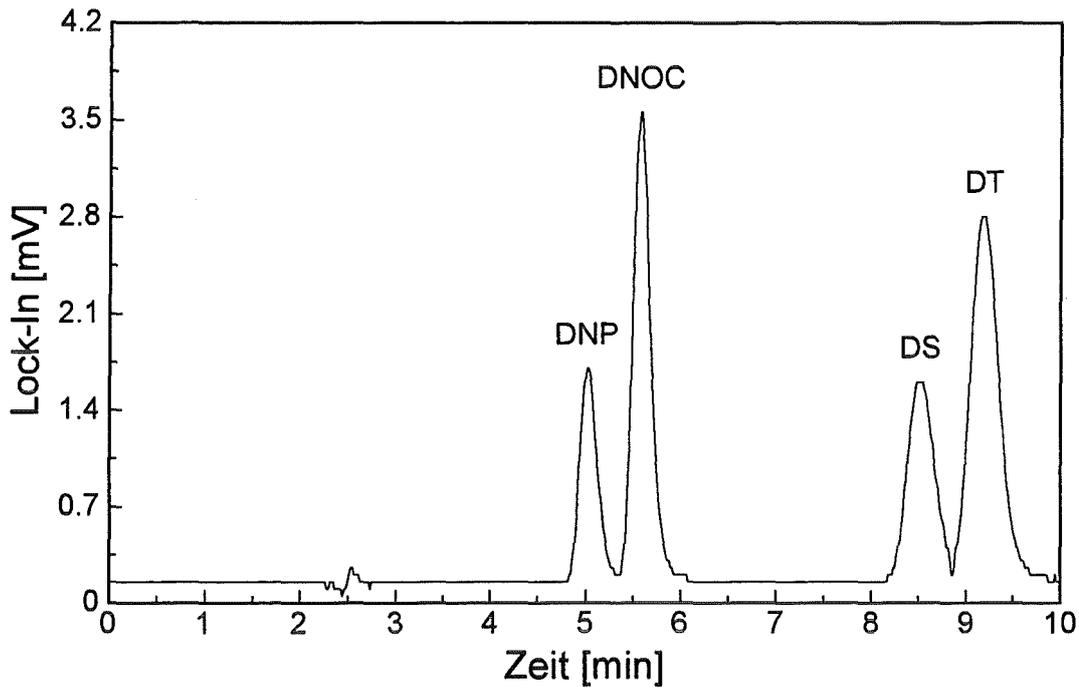


Abb. 4.20: Chromatogramm der Trennung, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen, Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min, Konzentration: DNP 245 µg/l, DNOC 230 µg/l, DS 250 µg/l, DT 380 µg/l

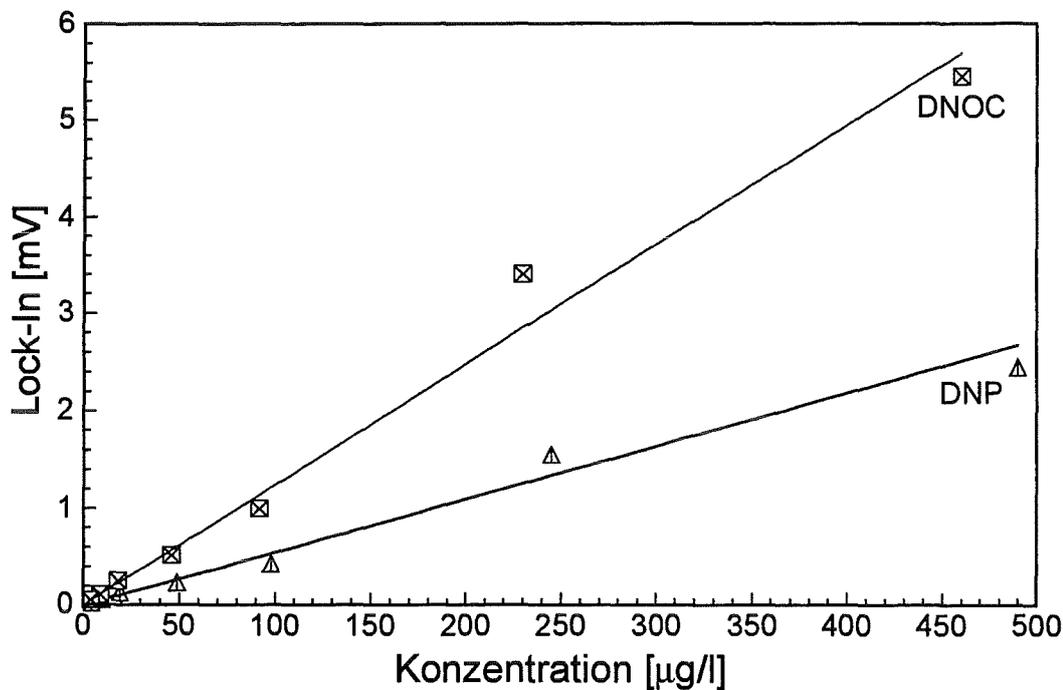


Abb. 4.21: Kalibrierkurven für DNOC und DNP, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit 1 ml/min

Die Nachweisgrenzen für die vier Detektionsmethoden sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Detektion mit der Thermischen Linse bei der Wellenlänge von 364 nm auf jeden Fall einem konventionellen UV-VIS-Detektor überlegen ist. Mit der kollineraren Thermischen Linse mit der Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen (Wechselwirkungsstrecke zwischen den Laserstrahlen 10 mm) erhält man eine um eine Größenordnung bessere Nachweisgrenze als mit dem UV-VIS-Detektor. Bedingt durch die geringere Wechselwirkungsstrecke erhält man für den transversalen Aufbau eine um den Faktor fünf schlechtere Nachweisgrenze gegenüber dem kollinearen Aufbau. Bei statischen Messungen (siehe Kapitel 4.3.2) wurde bei dem Vergleich der Nachweisgrenzen des kollinearen mit dem transversalen Aufbau ein Unterschied von einer Größenordnung erhalten. Daß bei den HPLC-Messungen der Unterschied in den Nachweisgrenzen zwischen transversalem und kollinearem Aufbau nur noch Faktor fünf beträgt im Vergleich zu statischen Messungen (siehe Kapitel 4.3.2) wo ein Faktor zehn erhalten wurde, liegt am Durchflußverhalten der Küvette, was durch die Messungen mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen bestätigt wird. Bei diesen Messungen erhält man trotz einer kürzeren Wechselwirkungsstrecke (1,5 mm) nur unwesentlich schlechtere Nachweisgrenzen als bei der Strahlführung in Durchflußrichtung (Wechselwirkungsstrecke 10 mm).

Detektor ↓ / Substanz →	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]			
	DNP	DNOC	DS	DT
UV-VIS	10 (0,999)	7 (0,999)	20 (0,996)	15 (0,997)
kollineare Thermische Linse Durchfluß in Laserstrahlrichtung	1,5 (0,999)	0,7 (0,999)	3 (0,997)	3 (0,997)
kollineare Thermische Linse Durchfluß senkrecht zur Laserstrahlrichtung	2 (0,998)	2 (0,995)	5 (0,994)	7,5 (0,995)
transversale Thermische Linse Durchfluß senkrecht zur Laserstrahlrichtung	5,5 (0,995)	4 (0,995)	10 (0,997)	15 (0,998)

Tab. 4.4: Nachweisgrenzen für die Trennung der Dinitrophenolverbindungen DNP, DNOC, DS und DT für die verschiedenen Anordnungen der Thermischen Linse im Vergleich mit einem UV-VIS-Detektor. Der Wert in den Klammern gibt den Korrelationskoeffizienten wieder.

Die in Kapitel 4.3.1 (Abhängigkeit des Thermischen Linsen Signals von der Durchflußgeschwindigkeit) und die im vorliegenden Kapitel vorgestellten Ergebnisse machen deutlich,

daß die Strömungsverhältnisse in den Meßküvetten das Thermische Linsen-Signal ganz erheblich beeinflussen können. Durch Richtungsänderungen der Strömung in Zuführungen und Meßraum, die in herkömmlichen Küvetten aus praktischen Gründen eigentlich immer vorhanden sind, bilden sich u. a. Wirbel und Querströmungen aus, die die Ausbildung der Thermischen Linse beeinflussen [DOVICH UND HARRIS 1981]. Es besteht daher ein großer Entwicklungsbedarf hinsichtlich einer optimalen Küvettengeometrie für die Thermische Linse Detektion bei der HPLC. Die Vorhersage der Strömungsverhältnisse und ihren Einfluß auf die Thermische Linse sind sehr komplex und erfordert daher umfangreiche Berechnungen z. B. auch unter Zuhilfenahme der Finite Elemente Methode (FEM). Durch eine Küvette deren Küvettengeometrie und folglich die Strömungsverhältnisse auf die Thermische Linse angepaßt sind, ist eine erhebliche Verbesserung der Nachweisgrenze der Thermischen Linse als Detektorsystem für die HPLC zu erwarten.

Einen Vergleich der Nachweisgrenzen dieser Trennung mit unterschiedlichen photothermischen Detektionsmethoden zeigt die folgende Tabelle. Die Detektion wurde mit der laserinduzierten Photoakustischen Spektroskopie (LIPAS), mit der kollinearen Thermischen Linse (TL) (Küvette Typ 1A, siehe Tabelle 4.1) und mit der photothermischen Interferometrie (PI) durchgeführt.

Detektor ↓ / Substanz →	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]	
	DNP	DNOC
TL [SCHULZ]	0,7	0,7
LIPAS [ADELHELM]	8	7
PI [SEIDEL 1995]	121	71
TL [diese Arbeit]	1,5	0,7

Tab. 4.5: Nachweisgrenzen für die HPLC-Detektion mit verschiedenen photothermischen Detektionsmethoden.

Beim Vergleich der Nachweisgrenzen, die für die Thermische Linse und für die anderen photothermischen Methoden bei der HPLC-Detektion erhalten werden, zeigt sich die Thermische Linse als am nachweisstärksten.

4.3.4 Detektion von Lösungsmittelgradienten

Bei Gradiententrennungen wird die Zusammensetzung des Lösungsmittels während der Trennung geändert (siehe Kapitel 4.1.3). Durch die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase wird nicht nur die Elutionskraft geändert, sondern auch der Brechungsindex sowie die thermischen Eigenschaften der mobilen Phase. Somit hat die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung auch Auswirkungen auf die Detektion mit der Thermischen Linse.

4.3.4.1 Abhängigkeit des Thermischen Linsen-Signals vom Lösungsmittel

Die Intensitätsänderung des Detektionslaserstrahls, die mit einer Photodiode hinter einer Lochblende gemessen wird, läßt sich durch Gleichung 4.4 ausdrücken (siehe auch Anhang B):

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{1,206 \cdot P \cdot A \cdot (dn/dT)}{\lambda \cdot k} \quad \text{Gl. 4.4}$$

A : Absorption

P : Laserleistung

(dn/dT) : Temperaturkoeffizient des Brechungsindex

λ : Wellenlänge des Lasers

k : Wärmeleitfähigkeit

Die Änderung der Intensität für einen konventionellen Absorptionsdetektor ist nach dem Lambert-Beer-Gesetz für schwach absorbierende Substanzen (siehe auch Kapitel 2.1, Gleichung 4.5):

$$\frac{\Delta I}{I} = 2,303 \cdot A \quad \text{Gl. 4.5}$$

Der Quotient aus Gleichung 4.4 und Gleichung 4.5 bezeichnet den Verstärkungsfaktor V der Thermischen Linse gegenüber der konventionellen Absorption (Gleichung 4.6) [CARTER UND HARRIS 1984 A, DOVICH I 1987]:

$$V = \frac{0,52 \cdot P \cdot (dn/dT)}{\lambda \cdot k} \quad \text{Gl. 4.6}$$

Der Verstärkungsfaktor ist demzufolge eine Funktion der Laserparameter Laserleistung und Laserwellenlänge sowie der Lösungsmittelparameter Wärmeleitfähigkeit und Temperaturkoeffizient des Brechungsindex. Die beiden Lösungsmittelparameter für Methanol und Wasser sind in Tabelle 4.6 dargestellt [DOVICH I 1987].

	k [mW cm ⁻¹ K ⁻¹]	dn/dT [K ⁻¹]	$\left \frac{(dn/dT)}{k} \right $ [cm mW ⁻¹]
Methanol	2,02	-3,94 * 10 ⁻⁴	19,5 * 10 ⁻³
Wasser	5,95	-0,81 * 10 ⁻⁴	1,36 * 10 ⁻³

Tab. 4.6: Thermische Konstanten von Methanol und Wasser

Folglich kann durch die Wahl des Lösungsmittels der Verstärkungsfaktor beeinflusst werden. Setzt man die Konstanten in Gleichung 4.6 ein, so sollte man bei Messungen mit der Thermischen Linse bei gleicher Laserleistung (P) und gleicher Wellenlänge (λ) für reines Methanol ein 14 mal größeres Signal erhalten als für reines Wasser.

Um dies zu überprüfen, wurden statische Messungen mit unterschiedlicher Zusammensetzung des Lösungsmittel durchgeführt. Die Messungen wurden mit DNOC-Lösungen durchgeführt, wobei das Methanol/Wasser-Volumenverhältnis in Zehn-Prozent-Schritten geändert wurde. Um sicherzustellen, daß alle Lösungen dieselbe Absorption besitzen und damit nur die photothermischen Lösungsmiteleigenschaften einen Einfluß auf den Verstärkungsfaktor haben, wurden entsprechende Referenzmessungen mit einem Spektralphotometer (Varian, Modell Cary 2400) durchgeführt. Die Durchführung der eigentlichen Messungen erfolgte mit der kollinearen Thermischen Linse bei einer Chopperfrequenz von 20 Hz, einer Laserleistung von 150 mW und bei einer Wellenlänge von 364 nm. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 4.22 gezeigt.

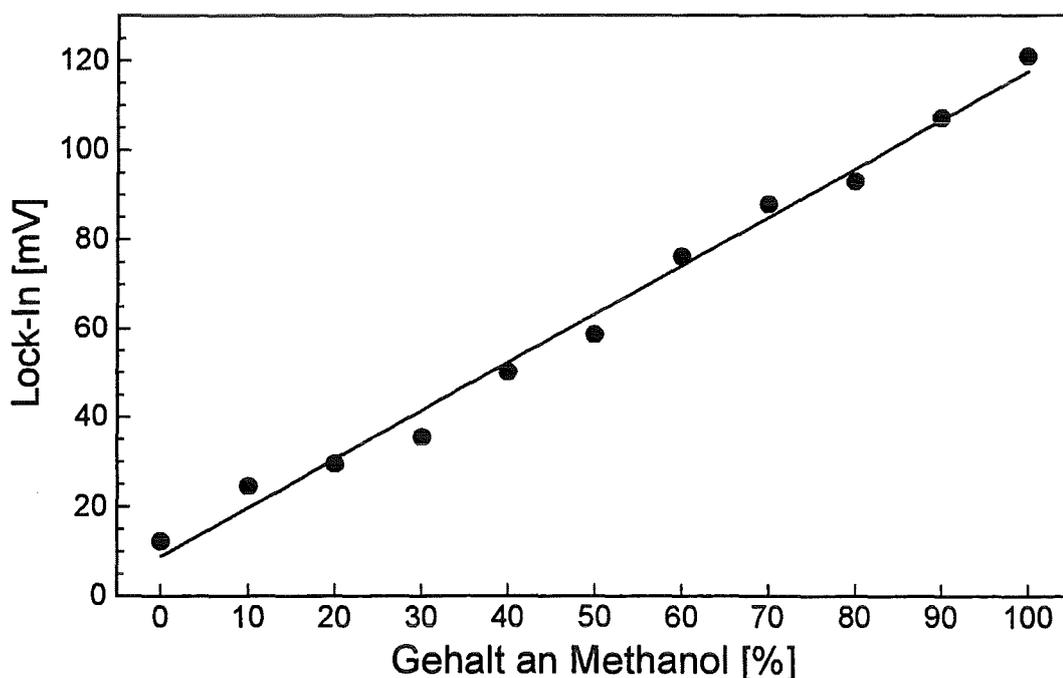


Abb. 4.22: Abhängigkeit des Thermische Linsen Signals von der Lösungsmittelzusammensetzung. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm

Mit steigendem Methanolgehalt nimmt das Signal der Thermischen Linsen zu. Der Unterschied des Thermischen Linsen-Signals mit reinem Wasser und reinem Methanol beträgt 9,8. Bei diesen Messungen wurde nicht der maximal mögliche Faktor von 14 erreicht, wobei berücksichtigt werden muß, daß Gleichung 4.4 nur bei einem optimalen Aufbau der Thermischen Linse-Apparatur gilt. Das heißt, zwischen der Laserstrahltaile und der Probe sollte ein bestimmter Abstand liegen. Allerdings sind die Werte, die in der Literatur für die optimale Distanz zwischen der Laserstrahltaile und der Probe diskutiert werden, ebenfalls unterschiedlich [CARTER UND HARRIS 1984 A, DOVICH I 1987, BERTHOUD ET AL., SHELDON ET AL., FANG UND SWOFFORD]. Tran hat zwischen Wasser und Methanol eine Verstärkung von 10 und NOLAN ET AL. 1984 von 8,6 gemessen.

4.3.4.2 Detektion von Stufengradienten

Bei Stufengradienten wird die Zusammensetzung des Lösungsmittels während der Trennung stufenweise geändert. Bevor Trennungen mit dieser Art des Lösungsmittelgradienten durchgeführt wurden, wurden Vorversuche mit den einzelnen Detektionsmethoden ohne chromatographische Säule durchgeführt. Diese Messungen wurden mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen (Küvette Typ 1) bei einer Chopperfrequenz von 20 Hz, einer Laserleistung von 150 mW und bei einer Wellenlänge von 364 nm gemacht. Die verwendeten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische wurden sehr sorgfältig mit Helium entgast, da Luftblasen bei der Detektion stören. Für die Untersuchung von Lösungsmittelgradienten wurden Methanol/Wasser-Mischungen als gängige Eluenten für die Reversed-Phase Chromatographie gewählt. In Abbildung 4.23 ist die Auswirkung eines Stufengradienten auf das Thermische Linsen-Signal dargestellt. Hierbei wurde die Zusammensetzung des Lösungsmittels innerhalb von 0,01 min von reinem Methanol auf ein Volumenverhältnis von 90/10 Methanol/Wasser verändert. Gemessen wurde bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min und einem Küvettenvolumen von 18 µl. Bis zu der Zeit von 100 s ist die Basislinie von reinem Methanol zu sehen, danach wurde der Stufengradient detektiert und ab 150 s sieht man die Basislinie der 90/10 Methanol/Wasser-Mischung. Die starken Schwankungen dieser Basislinie werden durch den ungleichmäßigen Mischungsvorgang in der Gradientenpumpe verursacht. Die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung wurde mit der Pumpe hergestellt. Die Pumpe entnimmt dazu die entsprechenden Mengen Eluent aus den Vorratsgefäßen, in denen reines Methanol bzw. reines Wasser vorliegt. Laut Hersteller der Gradientenpumpe treten die Lösungsmittel von der unteren Seite der Pumpe her in die Pumpenkammer ein und strömen zwischen Kolben und Kolbenwandung nach oben, die dabei auftretenden Turbulenzen bewirken eine schnelle Durchmischung der Lösungsmittel [HP]. Läßt man jedoch die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung nicht von der Pumpe mischen, sondern setzt eine vorgemischte 90/10 Methanol/Wasser-Mischung ein, so daß die Pumpe zur Erzeugung des Gradienten nur noch

zwischen den beiden Vorratsgefäße umschalten muß, treten die Schwankungen der Basislinie nicht mehr auf (siehe Abbildung 4.24).

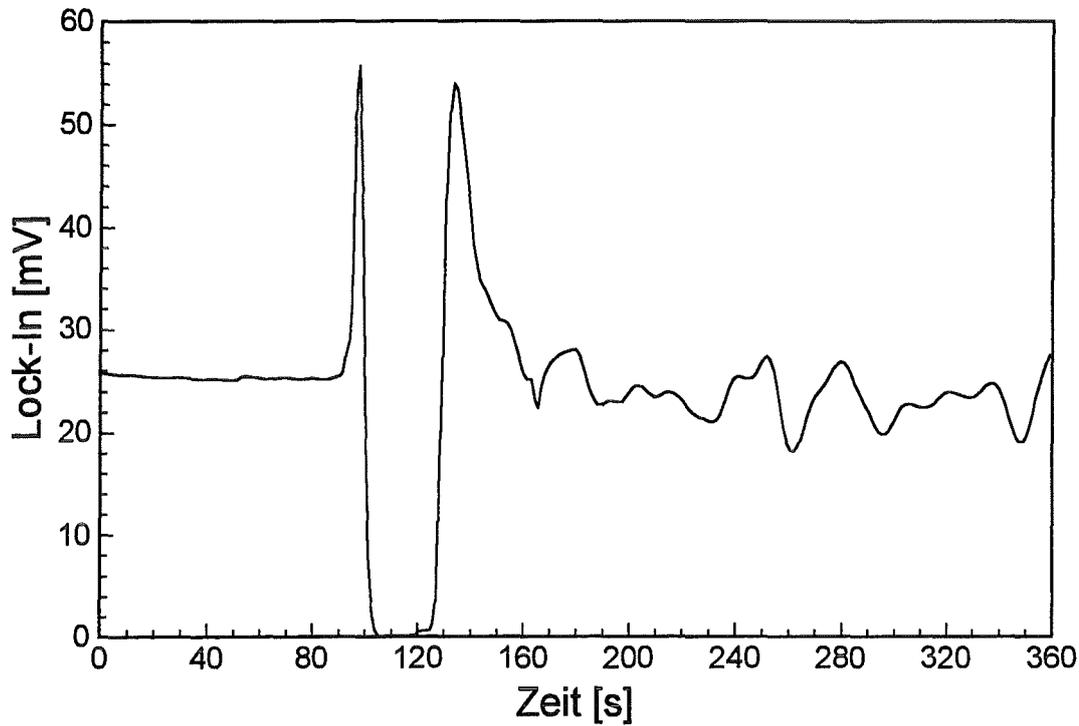


Abb. 4.23: Stufengradient von reinem Methanol zu einer 90/10 Methanol/Wasser-Mischung, detektiert mit kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen, Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Küvettenvolumen 18 μ l. Die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung wurde durch die Pumpe erzeugt.

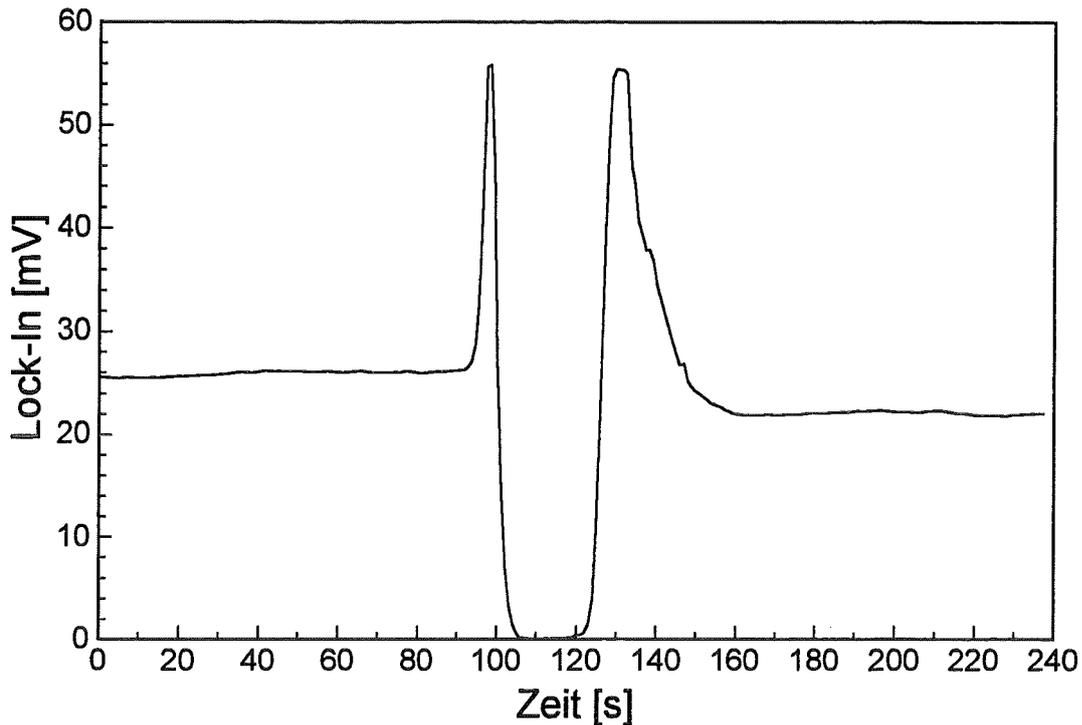


Abb. 4.24: Stufengradient von reinem Methanol zu einer 90/10 Methanol/Wasser-Mischung, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Küvettenvolumen: 18 μ l. Die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung war vorgemischt.

Während der Lösungsmittelgradient durch die Küvette tritt, geht das Lock-In-Signal auf Null zurück und man kann während dieser Zeit kein Thermisches Linsen-Signal nachweisen. Die Verhältnisse in der Durchflußküvette wurden vereinfacht in Abbildung 4.26 dargestellt. Das Methanol (L1) mit einem Brechungsindex n_1 strömt durch den Probenraum der Küvette, durch das Umschalten der Pumpe auf das andere Vorratsgefäß strömt unmittelbar danach die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung (L2) mit einem anderen Brechungsindex n_2 in den Probenraum der Küvette ein. Durch diese unterschiedlichen Brechungsindizes der beiden Lösungen kommt es bei unvollständiger Vermischung zu einer unkontrollierten Ablenkung (Streuung) der Laserstrahlen, die als Trübung wahrgenommen werden kann. In der Zeit, in der der Lösungsmittelgradient durch die Probenkammer strömt, ist somit keine Detektion mehr möglich. Die Trübung der Lösung ist so stark, daß man sie mit dem Auge beobachten kann.

Trägt man die Zeit auf, die für die vollständige Verdrängung des Methanols durch die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung bei unterschiedlichen Durchflußgeschwindigkeiten benötigt wird, d. h. die Zeit, in der man kein Thermisches Linsen-Signal messen kann, so erhält man folgende Abhängigkeiten (siehe Abbildung 4.25). Mit steigender Durchflußgeschwindigkeit wird weniger Zeit für die Verdrängung benötigt, und man kann bei einem Küvettenvolumen

von 8 μl bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 2 ml/min 42 s lang und bei 1 ml/min 78 s lang kein Thermisches Linsen-Signal detektieren.

Bei einem kleineren Probenkammervolumen wird überraschenderweise mehr Zeit für die Verdrängung des Methanols durch die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung benötigt als bei einem großen. Dies könnte vermutlich durch die Küvettengeometrie verursacht werden. Beim Durchströmen der Küvetten bilden sich Abrißwirbel aus, und es kommt zu Turbulenzen in der Küvette [DOVICH AND HARRIS 1981] (siehe Abbildung 4.26). Vermutlich wird bei großen Küvettendurchmessern der Lösungsmittelgradient nicht von den Abrißwirbeln erfaßt, sondern kann am Küvettenrand entlang durch die Küvette strömen.

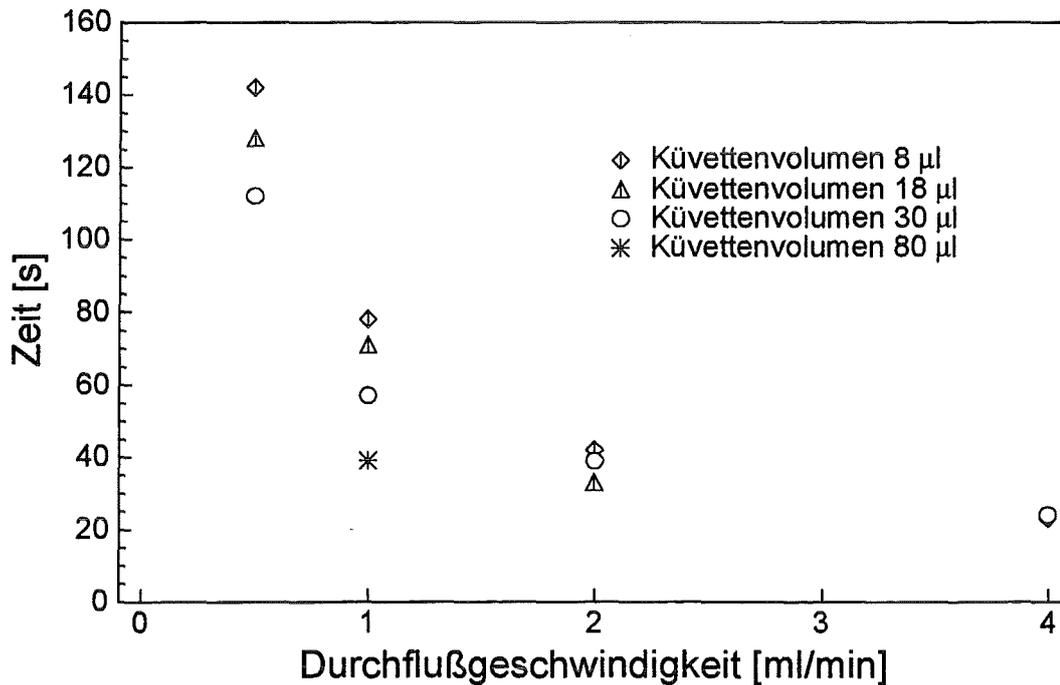


Abb. 4.25: Durchströmungszeit des Stufengradienten in Abhängigkeit vom Küvettenvolumen und der Durchflußgeschwindigkeit. Gemessen wurde mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm

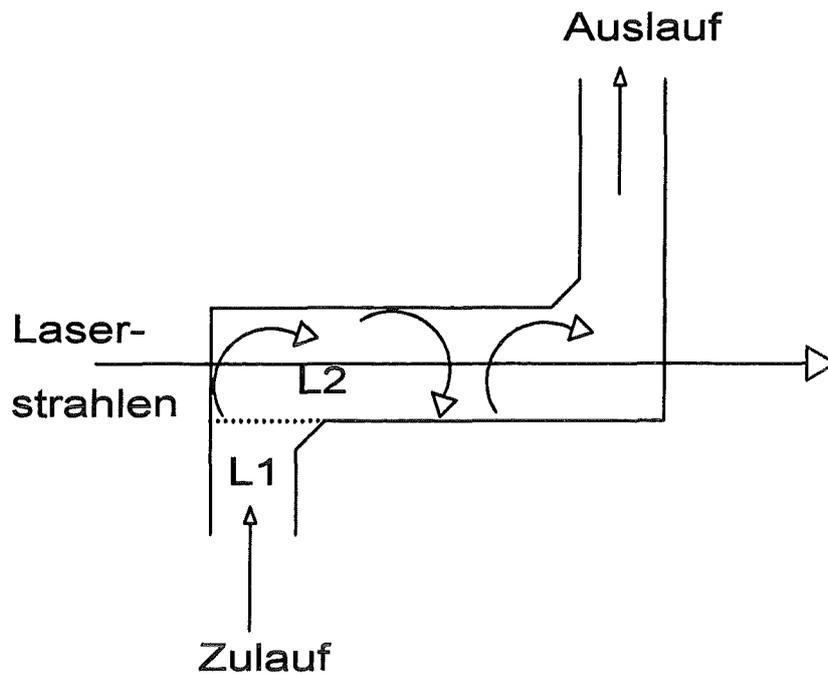


Abb. 4.26: Vereinfachte Darstellung der Verhältnisse in der Durchflußküvette

Dieselben Vorversuche ohne Säule wurden auch mit der kollinearen Thermischen Linse mit der Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen, mit der transversalen Thermischen Linse und mit dem UV-VIS-Detektor durchgeführt. Es wurde wiederum die Lösungsmittelzusammensetzung innerhalb 0,01 min von reinem Methanol auf ein Volumenverhältnis von 90/10 Methanol/Wasser verändert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 364 nm, einer Laserleistung von 150 mW und einer Chopperfrequenz von 20 Hz. Bei allen Methoden wird prinzipiell der in Abbildung 4.27 dargestellte Verlauf erhalten.

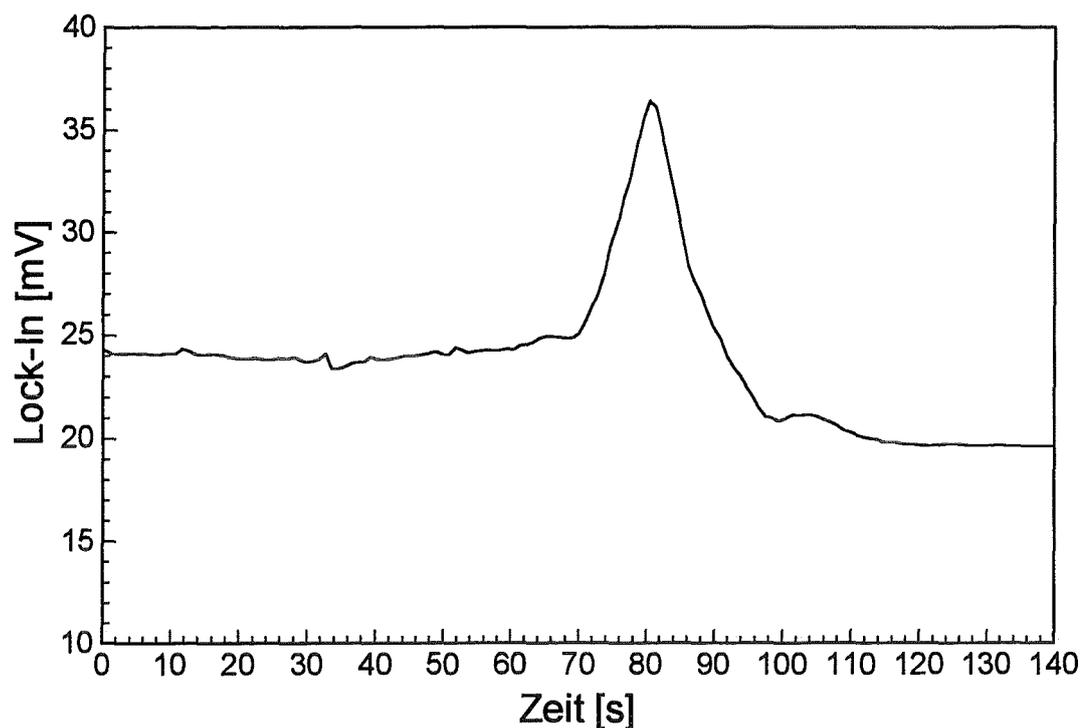


Abb. 4.27: Stufengradient von reinem Methanol zu einer 90/10 Methanol/Wasser-Mischung. Gemessen wurde mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min. Die 90/10 Methanol/Wasser-Mischung war bereits vorgemischt.

4.3.4.3 Detektion von Trennungen mit einem Stufengradienten

Für die Detektion von Trennungen mit einem Stufengradienten wurde die Trennung der Dinitrophenolverbindungen (siehe Kapitel 4.3.3) verwendet und an den entsprechenden Stellen ein Stufengradient eingearbeitet. Für die Trennungen wurde eine RP-18-Säule (Lichrosorb 5 μm , 250 mm * 4 mm) verwendet. Als Eluent wurde eine 75/25 (v/v) Methanol/Wasser-Mischung benutzt, die innerhalb 0,01 min auf ein Verhältnis von 80/20 (v/v) Methanol/Wasser verändert wurde. Die Konzentrationen von Cetrimid (1,5 g/l) und Phosphatpuffer (2 mM) wurden während der ganzen Trennung konstant gehalten. Der Lösungsmittelgradient wurde zeitlich so gelegt, daß er entweder mit dem DNOC-Peak zusammenfiel oder zwischen dem DNOC- und dem DS-Peak auftrat. Die Detektion erfolgte bei allen vier Methoden bei einer Wellenlänge von 364 nm und einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min. Für die Detektion mit der Thermischen Linse wurde eine Chopperfrequenz von 20 Hz und eine Anregungslaserleistung von 150 mW verwendet. Abbildung 4.28 zeigt das Chromatogramm, das bei der Detektion mit der kollinearen Thermischen Linse mit der Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen (Küvettenvolumen 8 μl) erhalten wurde.

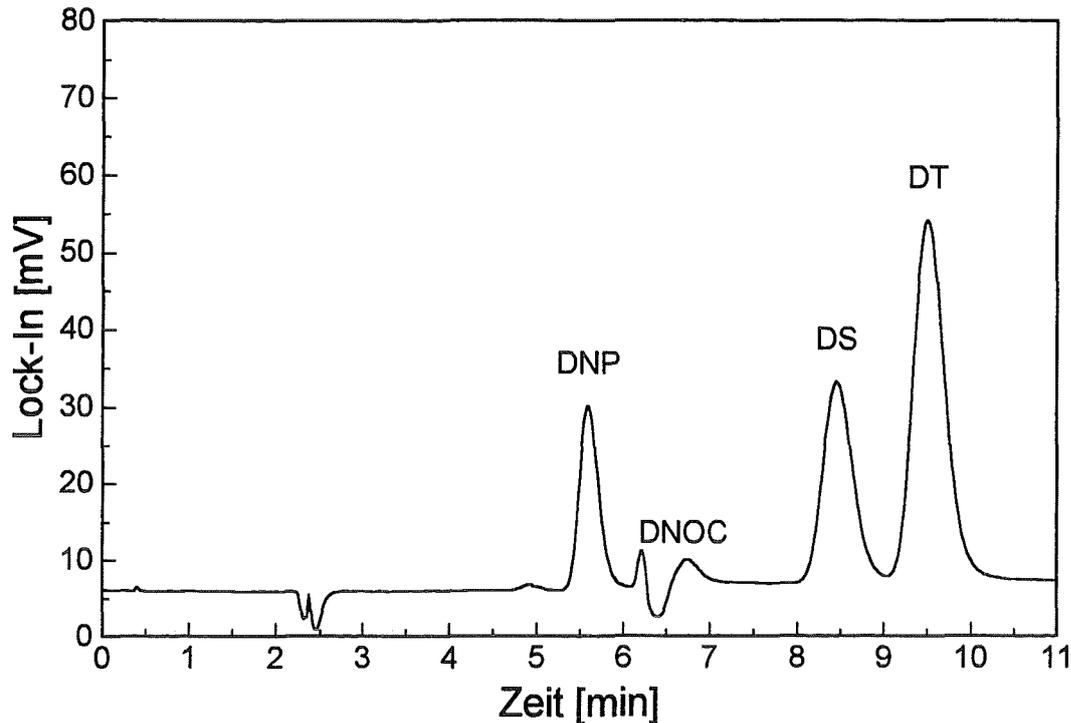


Abb. 4.28: Chromatogramm der Trennung mit einem Stufengradienten, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Konzentrationen: DNP 98 $\mu\text{g/l}$, DNOC 92 $\mu\text{g/l}$, DS 100 $\mu\text{g/l}$, DT 150 $\mu\text{g/l}$

Der DNOC-Peak fällt hier mit dem Lösungsmittelgradienten zusammen. Ein Thermisches Linsen-Signal kann nicht gemessen werden. An der Stelle, an der das DNOC detektiert werden sollte, ist es nicht möglich, verursacht durch den Lösungsmittelgradient, ein Thermisches Linsen Signal zu messen. Das gleiche Ergebnis erhält man auch, wenn man die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung von 5 % auf 2 % verringert.

Bei der Detektion mit dem UV-VIS-Detektor, mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen und mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen treten im wesentlichen die selben Begebenheiten auf, weshalb diese drei Detektionsmethoden zusammen behandelt werden.

Abbildung 4.29 zeigt die Trennung der vier Dinitrophenolverbindungen. Der Lösungsmittelgradient ist zwischen den Peaks von DNOC und DS zu sehen.

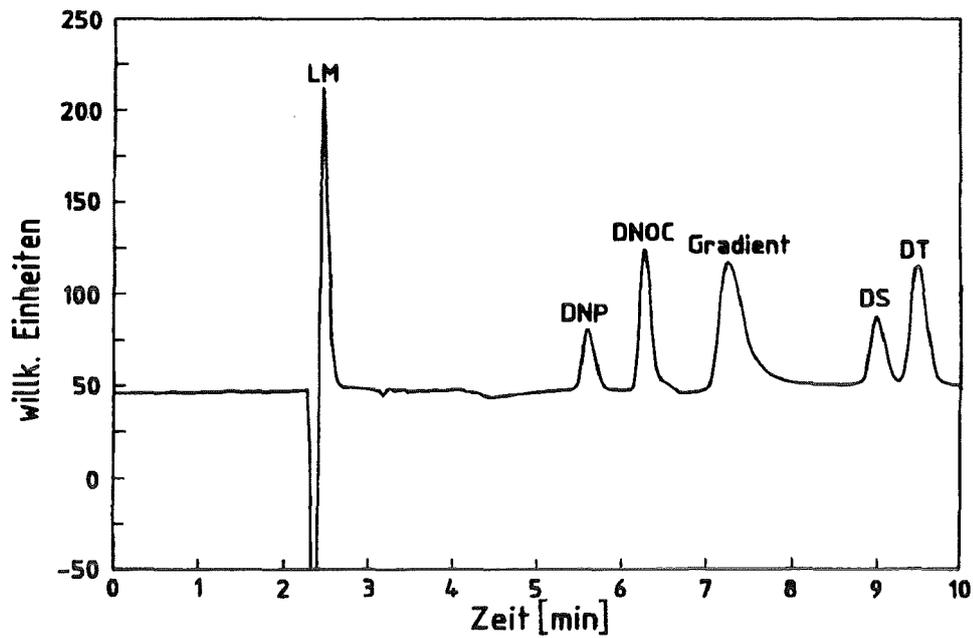


Abb. 4.29: Chromatogramm der Trennung mit einem Stufengradienten zwischen dem DNOC- und DS-Peak, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Konzentrationen: DNP 245 $\mu\text{g/l}$, DNOC 230 $\mu\text{g/l}$, DS 250 $\mu\text{g/l}$, DT 380 $\mu\text{g/l}$

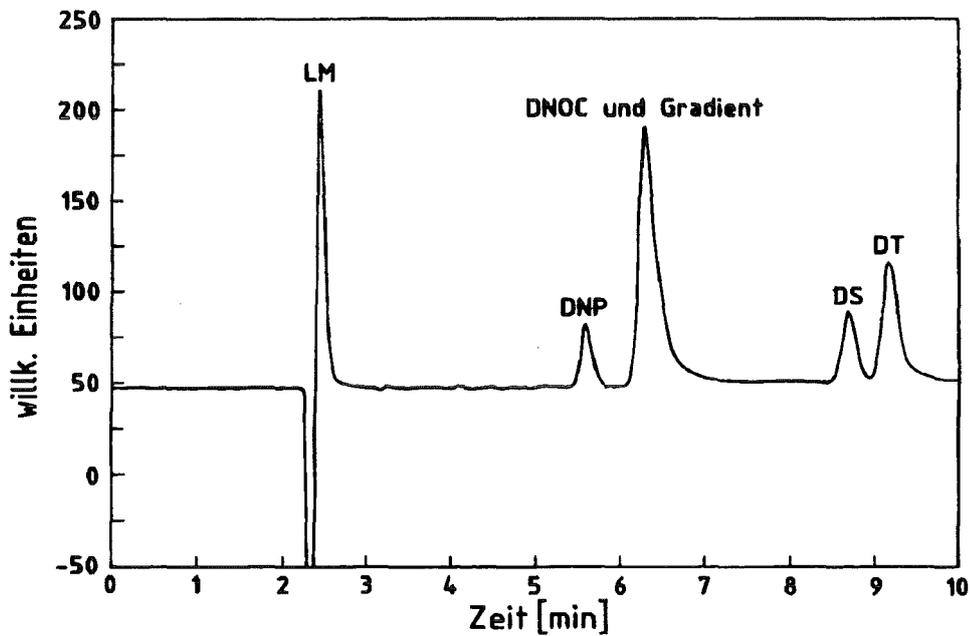


Abb. 4.30: Chromatogramm der Trennung mit einem Stufengradienten auf dem DNOC-Peak, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Konzentrationen: DNP 230 $\mu\text{g/l}$, DNOC 245 $\mu\text{g/l}$, DS 250 $\mu\text{g/l}$, DT 380 $\mu\text{g/l}$

Fällt der Lösungsmittelgradient mit dem DNOC-Peak (siehe Abbildung 4.29) zusammen, so kommt es zu einer Erhöhung des DNOC-Peaks über den ursprünglichen Wert hinaus. Durch eine Aufnahme der reinen Basislinie mit Gradientenpeak und Subtraktion von dem aufgezeichneten Chromatogramm kann der Substanzpeak jedoch ausgewertet werden. Die Konzentrationsreihen, bei denen der Stufengradient mit dem DNOC-Peak zusammenfällt, sind für die einzelnen Detektionsmethoden in den Abbildungen 4.31, 4.32 und 4.33 zu sehen.

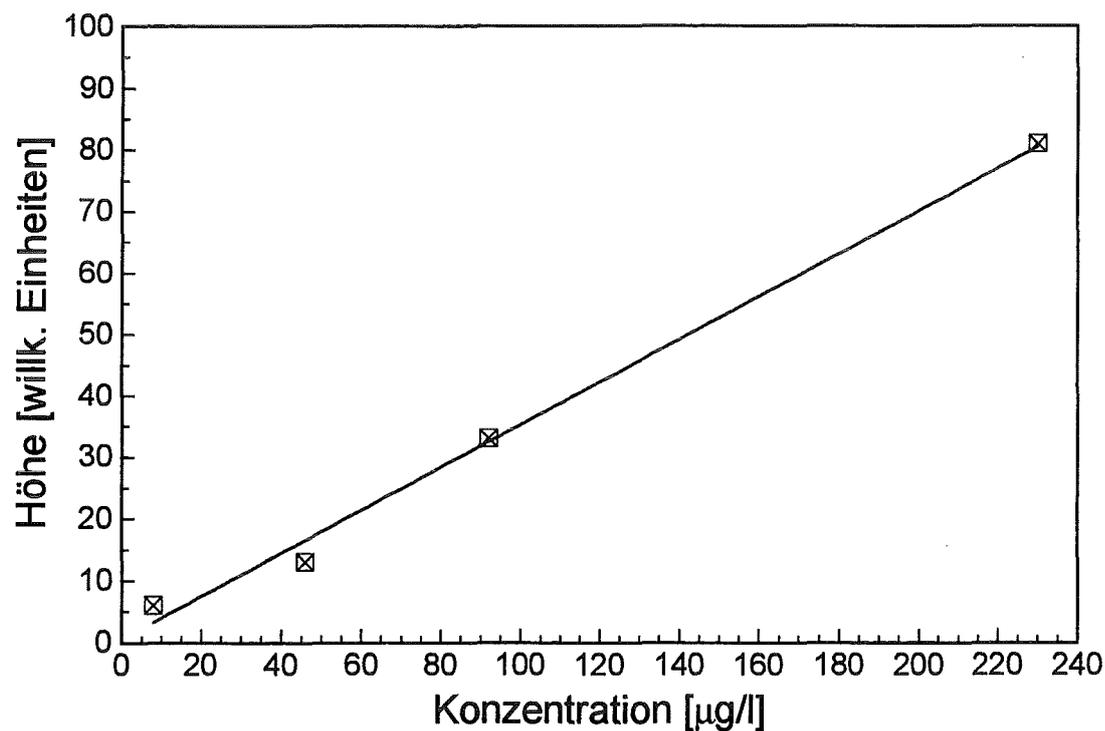


Abb. 4.31: Kalibrierkurve für die Detektion mit einem Stufengradienten für DNOC, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

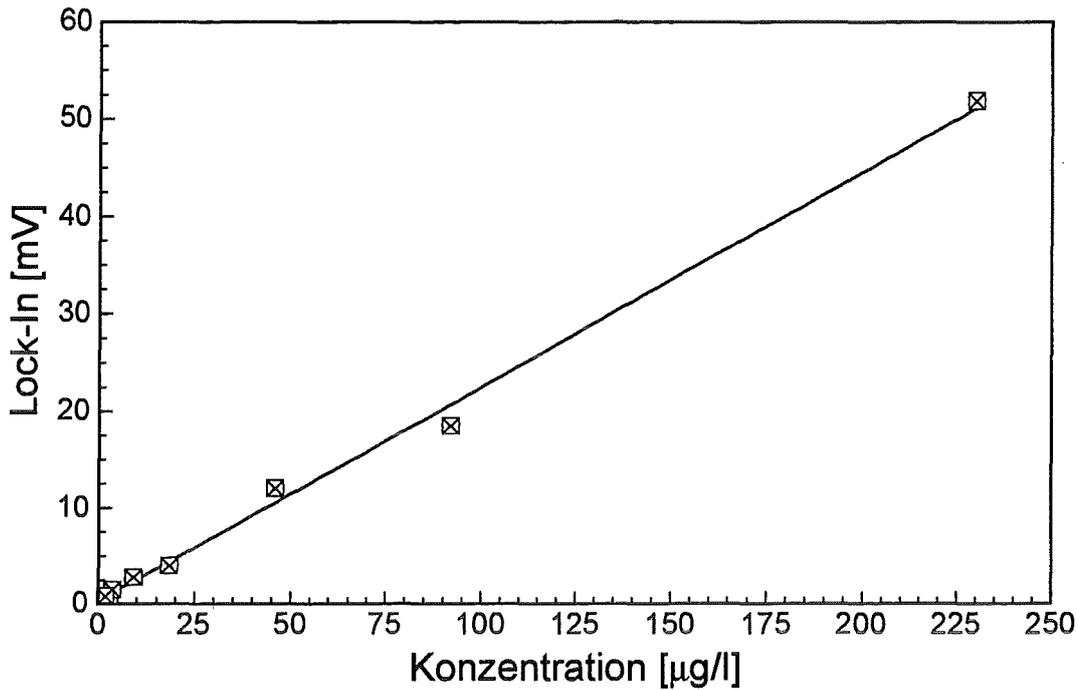


Abb. 4.32: Kalibrierkurve für die Detektion mit einem Stufengradienten für DNOC, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

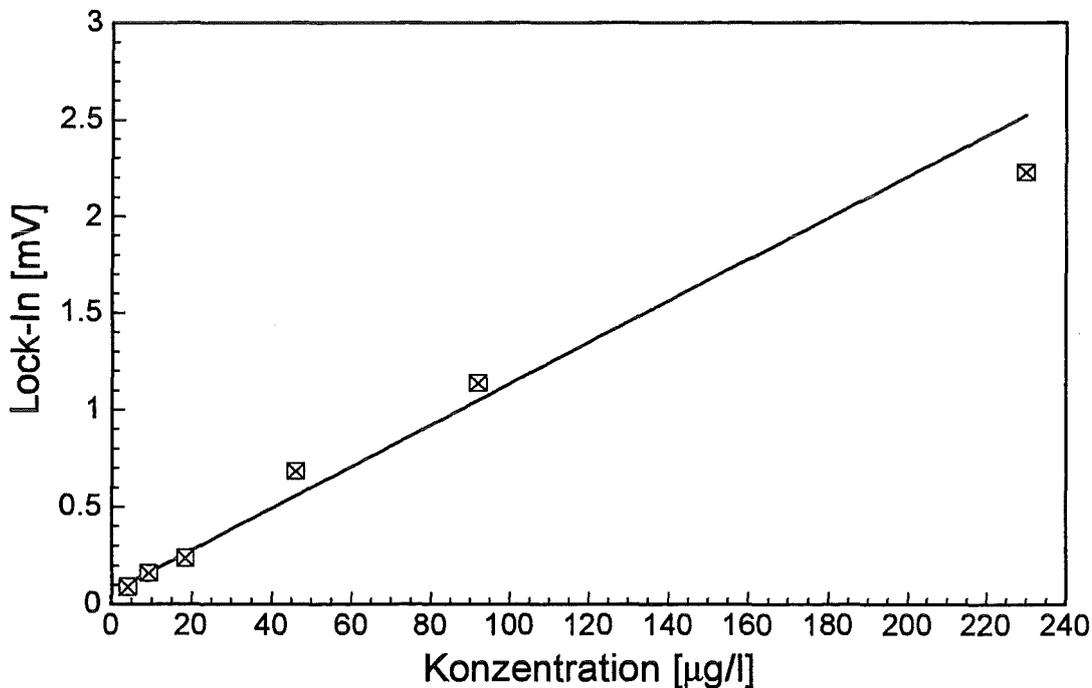


Abb. 4.33: Kalibrierkurve für die Detektion mit einem Stufengradienten für DNOC, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Die Nachweisgrenzen für die zuletzt genannten Detektionsmethoden sind in Tabelle 4.7 aufgeführt. Die Zahlen in Klammern geben den jeweiligen Korrelationskoeffizienten wieder.

Detektor ↓ / Substanz →	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]
	DNOC
UV-VIS	8 (0,995)
kollineare Thermische Linse Durchfluß senkrecht zur Laserstrahlrichtung	2,5 (0,997)
transversale Thermische Linse Durchfluß senkrecht zur Laserstrahlrichtung	4 (0,995)

Tab. 4.7: Nachweisgrenzen für DNOC bei Durchführung der Trennung mit einem Stufengradienten für die verschiedenen Anordnungen der Thermischen Linse im Vergleich mit einem UV-VIS-Detektor.

Die für DNOC bei der Durchführung der Trennungen mit einem Stufengradienten erhaltenen Nachweisgrenzen unterscheiden sich nur unwesentlich von denen, die mit einer isokratischen Trennung erhalten wurden. Allerdings ist bei der Detektion mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen keine Detektion möglich, für den Fall, daß der Substanzpeak zur gleichen Zeit wie der Lösungsmittelgradient am Detektor erscheint.

4.3.4.4 Detektion von linearen Lösungsmittelgradienten

Bei linearen Lösungsmittelgradienten wird die Zusammensetzung des Lösungsmittels während der Trennung kontinuierlich geändert. Bei den Messungen wurde das Methanol/Wasser-Volumenverhältnis von 70/30 innerhalb von 15 min auf 85/15 geändert, d. h. die Methanolkonzentration wurde pro Minute um 1 % erhöht. Dadurch ändern sich auch entsprechend die thermischen Eigenschaften des Eluenten (siehe Kapitel 4.3.4), was mit einem Anstieg der Basislinie verbunden ist. Abbildung 4.34 zeigt die Detektion des Lösungsmittelgradienten mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen (Küvette Typ A, Volumen 8 μl). Die Messungen wurden ohne Säule, mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min, einer Chopperfrequenz von 20 Hz, einer Laserleistung von 150 mW und einer Wellenlänge von 364 nm durchgeführt. Das Mischen des Gradienten erfolgte durch die HPLC-Pumpe, wobei in den beiden Vorratsgefäßen je eine Mischung von 70/30 Methanol/Wasser und 85/15 Methanol/Wasser vorgelegt wurde. Im oberen Teil der Abbildung ist der Verlauf des Lösungsmittelgradienten dar-

gestellt. Der untere Teil zeigt die Messung mit der Thermischen Linse mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen.

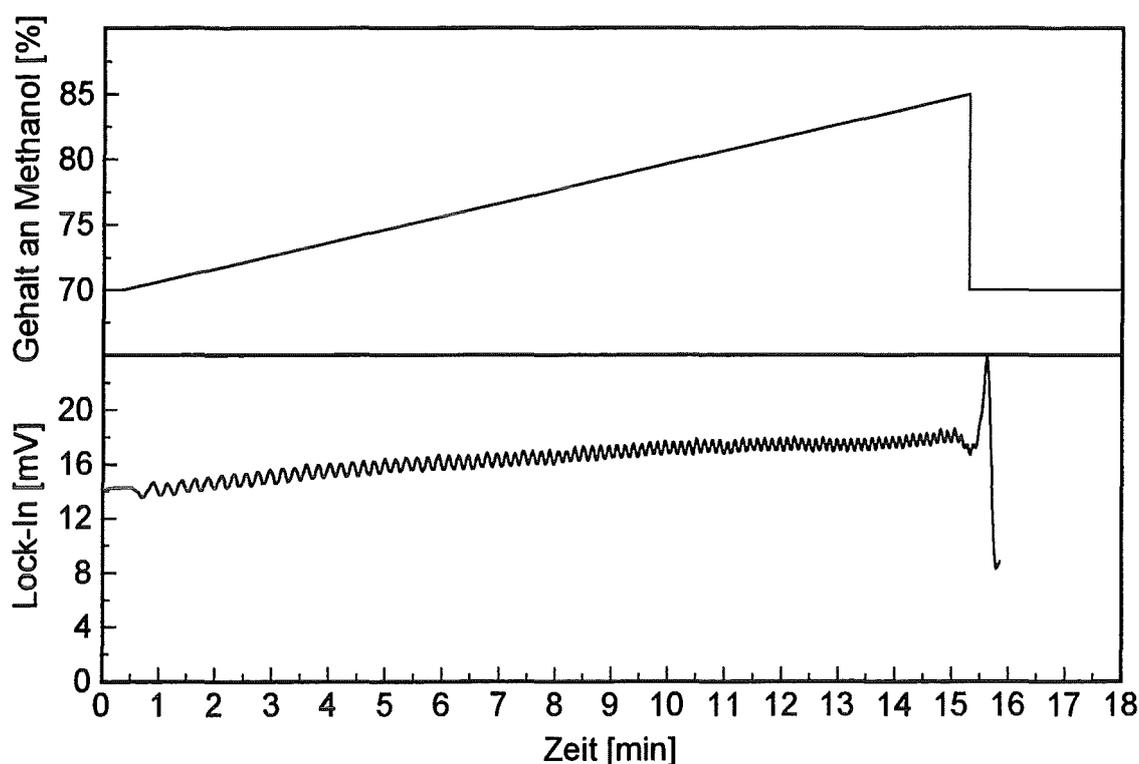


Abb. 4.34: Linearer Lösungsmittelgradient mit einer 1%igen Änderung der Methanol/Wasser-Zusammensetzung. Detektiert wurde mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Küvettenvolumen: 18 μ l

Nach einer Zeit von einer halben Minute beginnt die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung, was durch die periodischen Schwankungen der Basislinie zu sehen ist. Der Lösungsmittelgradient endet nach 15,5 min, danach kommt ein starker Abfall des Thermischen Linsen-Signals, verursacht durch das schnelle Umschalten der Pumpe auf die 70/30 Methanol/Wasser-Mischung. Die periodischen Schwankungen der Basislinie werden durch eine unzureichende Vermischung der Lösungsmittel durch die Gradientenpumpe verursacht. Die Turbulenzen in der Kapillare (siehe Kapitel 4.3.4.2) reichen nicht aus, um eine vollständige Durchmischung zu gewährleisten.

4.3.4.5 Detektion von Trennungen mit einem linearen Lösungsmittelgradienten

Für die Detektion von Trennungen mit einem linearen Lösungsmittelgradienten wurden wiederum die Dinitrophenolverbindungen getrennt. Dabei wurde, wie in Kapitel 4.3.4.4 bereits erläutert, die Zusammensetzung des Eluenten von einem Volumenverhältnis von 70/30 Methanol/Wasser innerhalb von 15 min auf 85/15 Methanol/Wasser geändert. Die Konzentrationen von Cetrimid (1,5 g/l) und Phosphatpuffer (2 mM) wurden während der ganzen Trennung konstant gehalten. Als Säule wurde eine RP-18-Säule (Lichrosorb 5 μm , 250 mm * 4 mm) verwendet, die Durchflußgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Abbildung 4.35 zeigt die Trennung der Dinitrophenolverbindungen detektiert mit dem UV-VIS-Detektor.

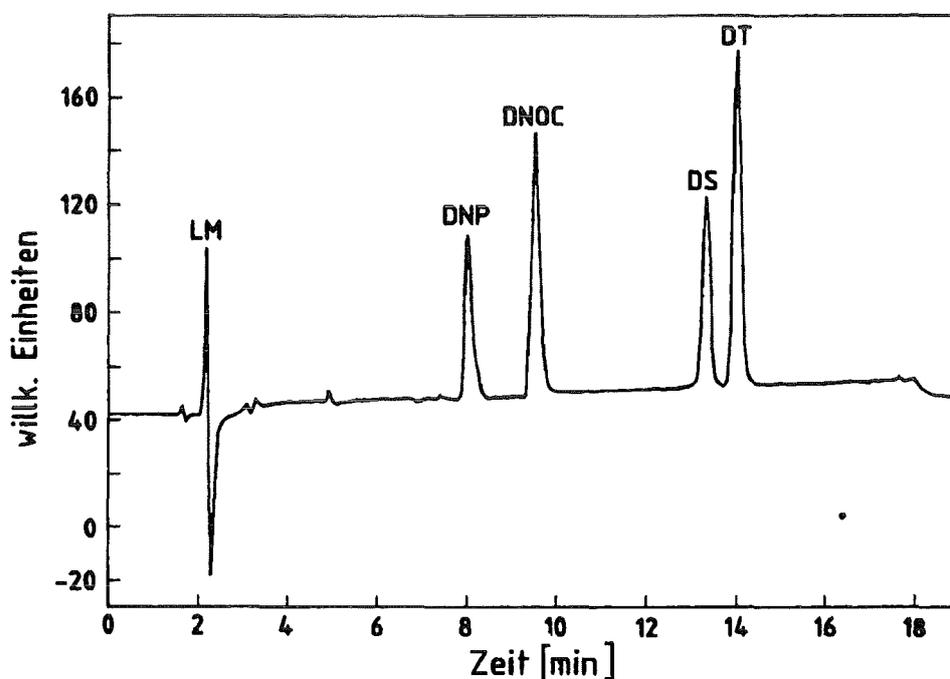


Abb. 4.35: Chromatogramm der Trennung mit einem linearen Lösungsmittelgradienten, detektiert mit einem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Konzentrationen: DNP 490 $\mu\text{g/l}$, DNOC 460 $\mu\text{g/l}$, DS 500 $\mu\text{g/l}$, DT 750 $\mu\text{g/l}$

Durch den höheren Wasseranteil zu Beginn der Gradiententrennung, im Vergleich zu der isokratischen Trennung (siehe Kapitel 4.3.3), ist die Elutionskraft des Eluenten vermindert, was sich durch höhere Kapazitätsfaktoren und eine höhere Auflösung auszeichnet. Die Auflösung für die DNP/DNOC-Peaks ist 4,5 und für die DS/DT-Peaks 2,4. Die Kapazitätsfaktoren für diese Trennung sind in Tabelle 4.8 angegeben.

Substanz	DNP	DNOC	DS	DT
Kapazitätsfaktor k'	2,54	3,22	4,88	5,20

Tab. 4.8: Kapazitätsfaktoren für die Trennung mit einem linearen Lösungsmittelgradienten

Durch die Änderung des Brechungsindex durch den Lösungsmittelgradienten sieht man auch bei der Detektion mit dem UV-VIS-Detektor einen leichten Anstieg der Basislinie.

Für die Aufstellung der Kalibrierkurven wurden die Peakhöhen ausgewertet. Die Kalibrierkurven sind in Abbildung 4.36 zu sehen. Der Übersichtlichkeit wegen werden an dieser Stelle nur diejenigen von DNOC und DNP gezeigt. (Die Kalibrierkurven für DS und DT sind in Anhang D.2 in den Abbildungen D.9 und D.10 dargestellt.)

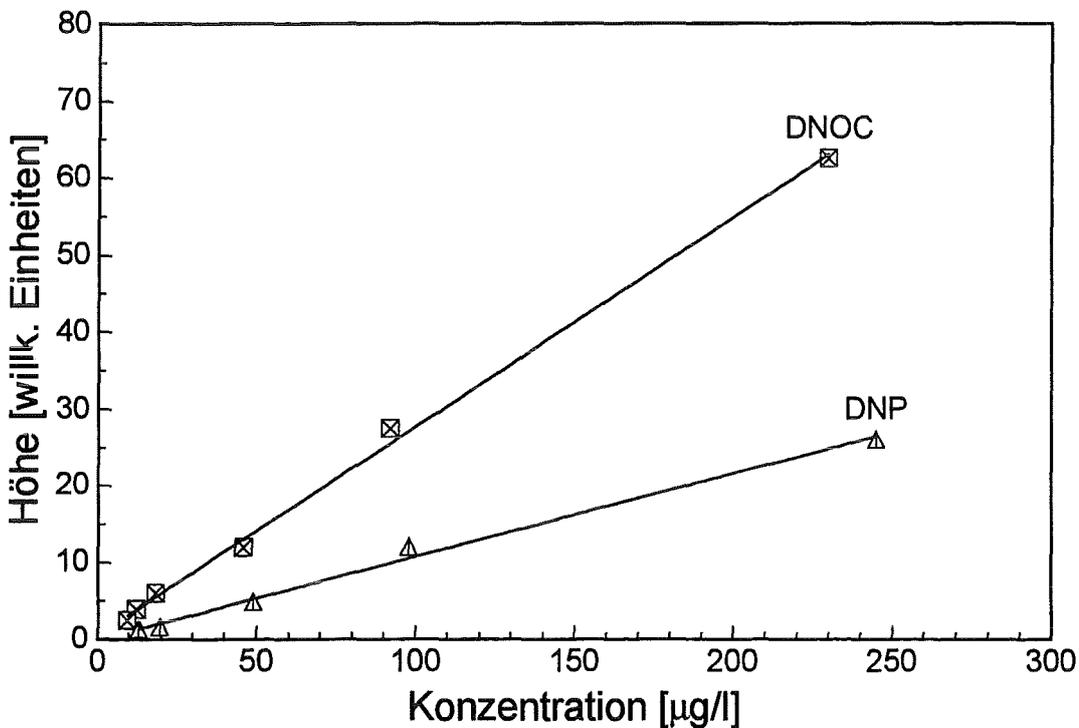


Abb. 4.36: Kalibrierkurven für die Gradientenelution, detektiert mit einem UV-VIS-Detektor, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Diese Trennung wurde nun mit denselben Trennparametern (s. o.) mit der Thermischen Linse detektiert, wobei wieder alle drei Methoden zum Einsatz kamen. Die Detektion wurde bei einer Chopperfrequenz von 20 Hz, einer Laserleistung von 150 mW und einer Wellenlänge von 364 nm durchgeführt. Das Chromatogramm der Gradiententrennung, detektiert mit der Thermischen Linse mit der 8 µl Küvette, mit einer Durchflußrichtung des Eluenten in Richtung der Laserstrahlen, zeigt Abbildung 4.37. Man sieht das periodische Schwanken der Basislinie, verursacht durch das Mischen des Eluenten durch die Gradientenpumpe. Die Peaks werden von diesen Schwankungen überlagert, was sich besonders bei sehr geringen Konzentrationen störend bemerkbar macht. Die Konzentrationsreihen für

DNOC und DNP für diese Detektionsmethode sind in Abbildung 4.38 zu sehen. (Die Kalibrierkurven für DS und DT sind im Anhang D.2 in den Abbildungen D.11 und D.12 dargestellt.)

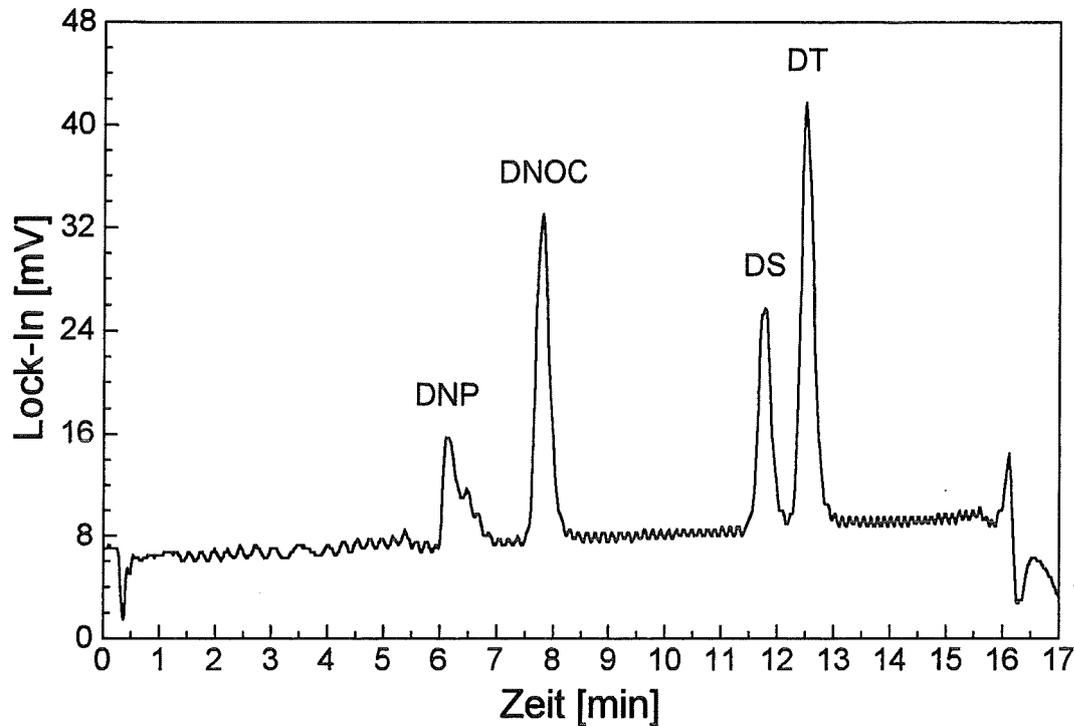


Abb. 4.37: Chromatogramm der Trennung mit einem linearen Lösungsmittelgradienten, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Konzentrationen: DNP 49 $\mu\text{g/l}$, DNOC 46 $\mu\text{g/l}$, DS 50 $\mu\text{g/l}$, DT 75 $\mu\text{g/l}$

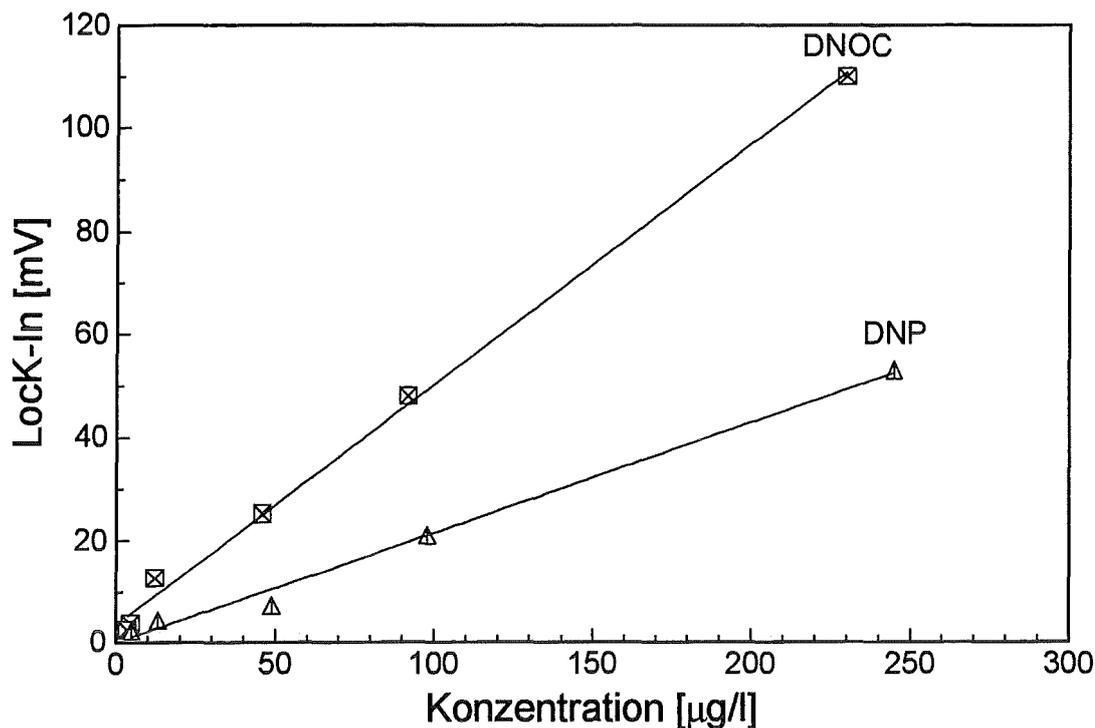


Abb. 4.38: Kalibrierkurven für die Gradientenelution, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Durch die Verwendung von Küvetten gleicher Geometrie treten bei der Detektion mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen und der transversalen Thermischen Linse dieselben Erscheinungen auf, weshalb diese Methoden zusammen behandelt werden. Abbildung 4.39 zeigt das Chromatogramm, welches mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen aufgenommen wurde. Es sind wiederum periodische Schwankungen der Basislinie zu sehen, welche jedoch eine kleinere Frequenz aufweisen. Die kleinere Frequenz wird wahrscheinlich dadurch verursacht, daß die verwendete Küvette (Typ 2, siehe Kapitel 4.2.2.1) ein Zulaufrohrchen mit einem erheblich größeren Durchmesser hat als die Küvette, die bei der Detektion mit Durchflußrichtung in Richtung der Laserstrahlen verwendet wurde. Dadurch ist eine bessere Vermischung des Lösungsmittelgradienten möglich.

In den Abbildungen 4.40 und 4.41 sind die Konzentrationsreihen von DNP und DNOC für diese Detektionsarten dargestellt. (Die Konzentrationsreihen für DS und DT für diese Detektionsarten sind im Anhang D.2 in den Abbildungen D.13 bis D.16 dargestellt.)

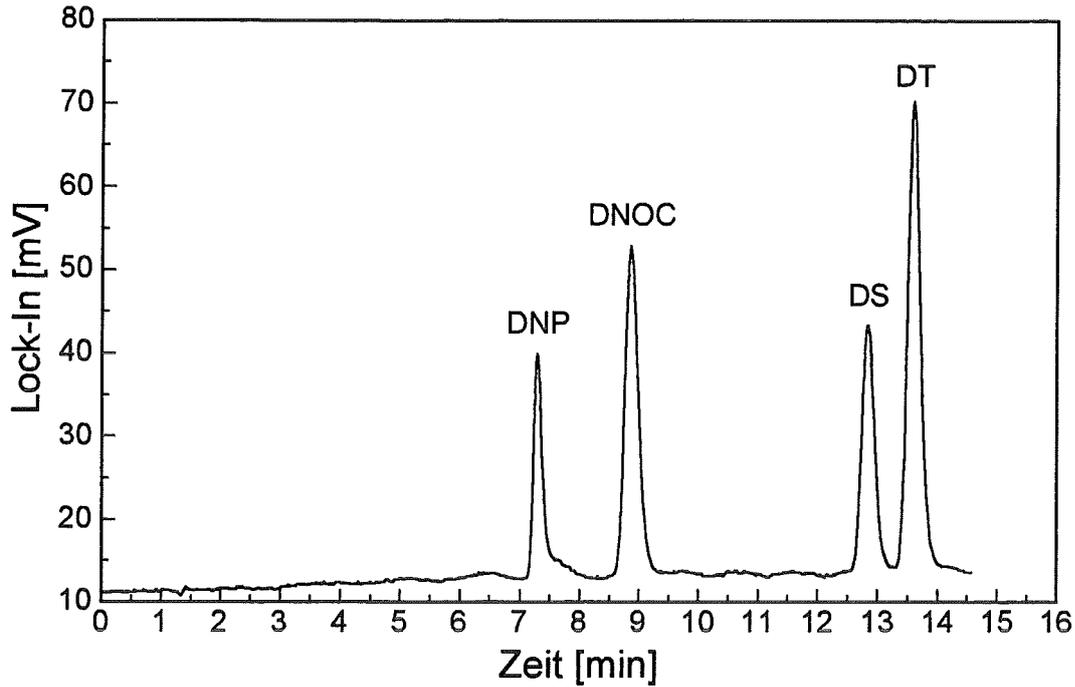


Abb. 4.39: Chromatogramm der Trennung mit einem linearen Gradienten, detektiert mit der Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Konzentrationen: DNP 245 $\mu\text{g/l}$, DNOC 230 $\mu\text{g/l}$, DS 250 $\mu\text{g/l}$, DT 380 $\mu\text{g/l}$

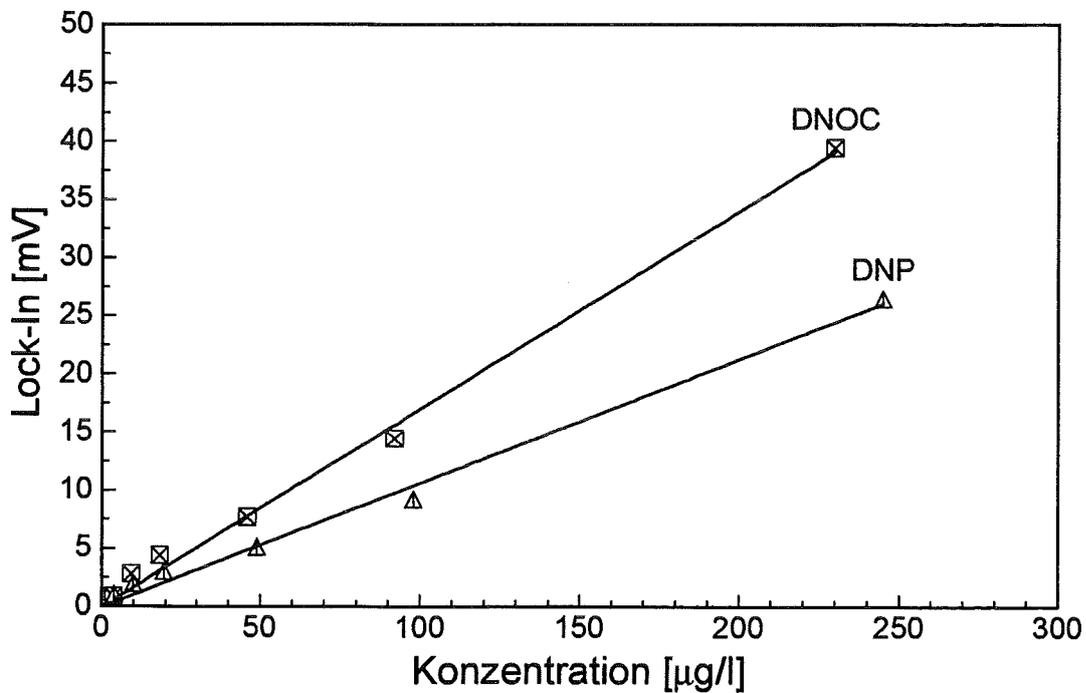


Abb. 4.40: Kalibrierkurven für die Gradientenelution, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

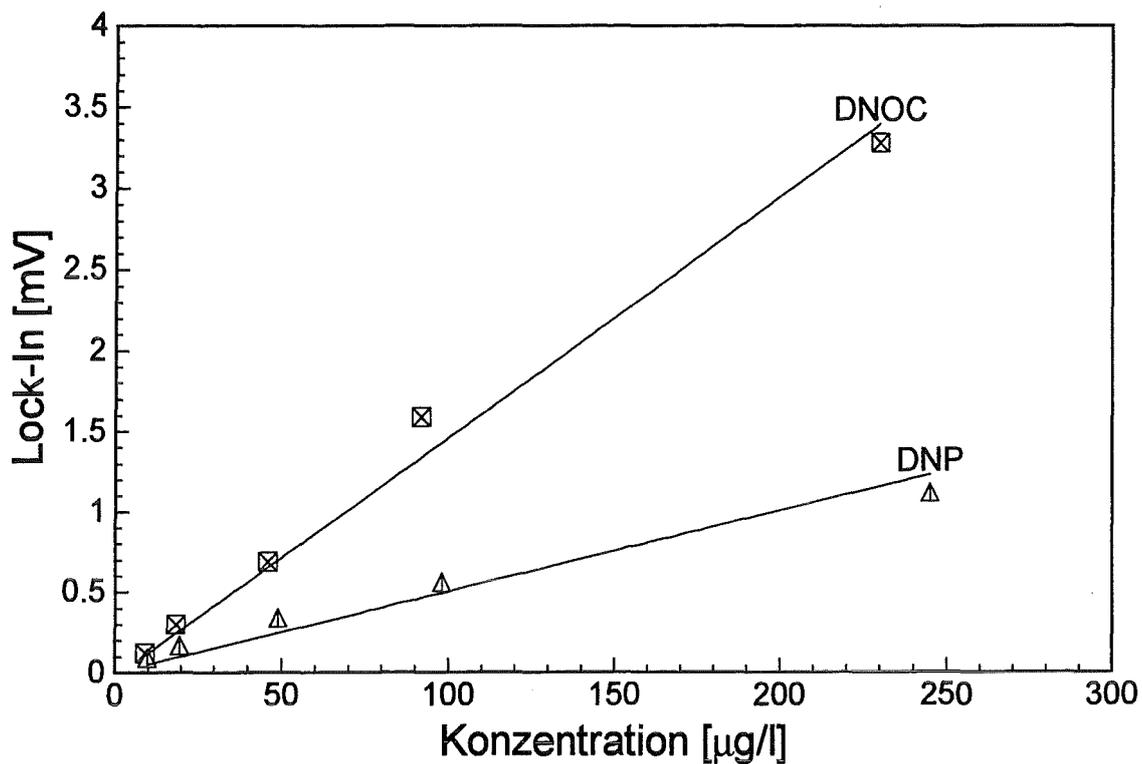


Abb. 4.41: Kalibrierkurven für die Gradientenelution, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit einer Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Die Nachweisgrenzen für die vier Detektionsmethoden sind in Tabelle 4.9 zu sehen (die Zahlen in Klammern geben den jeweiligen Korrelationskoeffizienten wieder). Die Nachweisgrenzen für die Gradientenelution liegen bei allen vier Detektionsarten in der gleichen Größenordnung.

Durch diese Messungen wurde erstmals gezeigt, daß eine Detektion von HPLC-Trennungen mit der Thermischen Linse auch bei Gradientenelutionen möglich ist. Die Brechungsindexänderungen, die durch die Änderungen der Lösungsmittelzusammensetzung verursacht werden, wirken sich nur bedingt auf die Detektion mit der Thermischen Linse aus. Durch die Schwankungen der Basislinie [COLLETTE ET AL.] bei der Detektion mit der Thermischen Linse verschlechtern sich die Nachweisgrenzen im Vergleich zu den isokratischen Trennungen. Dadurch ist eine Detektion mit der kollinearen Thermischen Linse bei der Wellenlänge von 364 nm nur noch um einen Faktor von zwei besser als diejenigen mit dem UV-VIS-Detektor.

Detektor ↓ / Substanz →	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/l}$]			
	DNP	DNOC	DS	DT
UV-VIS	13 (0,996)	9 (0,998)	14 (0,997)	15 (0,996)
kollineare Thermische Linse Durchfluß in Laserstrahlrichtung	5 (0,996)	5 (0,998)	5 (0,998)	8 (0,995)
kollineare Thermische Linse Durchfluß senkrecht zur Laser- strahlrichtung	4 (0,996)	4 (0,998)	4 (0,999)	6 (0,998)
transversale Thermische Linse Durchfluß senkrecht zur Laser- strahlrichtung	10 (0,996)	9 (0,995)	10 (0,992)	15 (0,992)

Tab. 4.9: Nachweisgrenzen für die Trennung der Dinitrophenolverbindungen DNP, DNOC, DS und DT mit der Gradientenelution für die verschiedenen Anordnungen der Thermischen Linse im Vergleich mit einem UV-VIS-Detektor.

4.3.4.6 Abschließender Vergleich der Ergebnisse bei der Detektion von Gradienten

Gradiententrennungen sind ein wichtiges Mittel in der Reversed-Phase Chromatographie. Sie ermöglichen die Auftrennung von komplexen Substanzgemischen und verkürzen oftmals die Analysenzeiten. Es ist folglich wichtig für einen Detektor, daß eine Detektion auch bei der Durchführung der Trennung mit einem Lösungsmittelgradienten möglich ist. In dieser Arbeit wurden erstmals Gradiententrennungen unter Verwendung der Thermischen Linse als Detektor durchgeführt. Dabei wurde sowohl die kollineare Thermische Linse mit unterschiedlichen Durchflußrichtungen des Analyten (in Richtung der Laserstrahlen und senkrecht zu den Laserstrahlen) als auch die transversale Thermische Linse eingesetzt.

Stufengradienten

Die kollineare Thermische Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen eignet sich nur bedingt für die Detektion von Stufengradienten. Da für den Fall, daß der Substanzpeak gleichzeitig mit dem Lösungsmittelgradient (Stufe) am Detektor erscheint, keine Detektion dieses Peaks möglich ist. Die kollineare Thermische Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zu den Laserstrahlen und die transversale Thermische Linse eignen sich für die Detektion von Stufengradienten aber uneingeschränkt. Dabei liegen die Nachweisgrenzen für Stufengradienten in der gleichen Größenordnung wie für isokratische Trennungen. So erhält man für die kollineare Thermische Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen für die Wellenlänge von 364 nm eine um den

Faktor drei und für die transversale Thermische Linse eine um den Faktor zwei bessere Nachweisgrenze als mit einem UV-VIS-Detektor.

Lineare Gradienten

Die Detektion von linearen Gradienten ist mit allen drei Methoden der Thermischen Linse Detektion (kollinear mit Fließrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen und in Richtung der Laserstrahlen, transversal) möglich. Verursacht durch das unzureichende Mischen der Lösungsmittel durch die Gradientenpumpe wird das Rauschen der Basislinie erhöht. Dadurch verschlechtern sich die Nachweisgrenzen für die Detektion von linearen Gradiententrennungen mit der Thermischen Linse gegenüber der Detektion von isokratischen Trennungen. Mit der kollinearen Thermischen Linse (Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen und senkrecht zu den Laserstrahlen) erhält man bei der Wellenlänge von 364 nm eine um den Faktor zwei bis drei bessere Nachweisgrenze als mit einem UV-VIS-Detektor. Bei der transversalen Thermischen Linse sind die Nachweisgrenzen (bedingt durch die kleinere Wechselwirkungsstrecke) für die Detektion mit einem linearen Gradienten in der selben Größenordnung wie mit einem UV-VIS-Detektor.

4.4 Experimenteller Teil zur gepulsten Thermischen Linse

Die meisten umweltrelevanten Schadstoffe wie z. B. Pestizide und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe zeigen Absorptionsbanden unterhalb 300 nm. Daher wurde die Thermische Linse mit einem Nd-YAG-Laser aufgebaut. Der Nd-YAG-Laser hat durch Frequenzvervierfachung eine Wellenlänge bei 266 nm. Des weiteren arbeitet der Nd-YAG-Laser nicht im continuous wave (cw) Betrieb, sondern gepulst. Durch den gepulsten Laser (Pulsbreite 10 ns) verändert sich der Meßaufbau und die Meßwerterfassung gegenüber dem cw-Aufbau (Einstrahlzeit ca. 50 ms), deshalb werden diese Messungen auch gesondert behandelt. Wie in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 zu sehen ist, erreicht man mit dem transversalen Aufbau der Thermischen Linse, bedingt durch die kleinere Wechselwirkungsstrecke, schlechtere Nachweisgrenzen als mit einem kollinearen Aufbau. Daher wurde die gepulste Thermische Linse ausschließlich kollinear aufgebaut. Die für die Trennungen und die Durchflußmessungen verwendete HPLC-Anlage wurde bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben.

4.4.1 Aufbau der gepulsten Thermischen Linse

Der kollineare Aufbau der Thermischen Linse mit einem gepulsten Lasersystem ist in Abbildung 4.42 dargestellt. Als Anregungslaser diente ein frequenzvervierfacher Nd-YAG-Laser (Spectron, Modell SL 404G) bei einer Wellenlänge von 266 nm mit einer maximalen Laserenergie von 8 mJ am Laserausgang, einer Pulswiederholrate von 10 Hz und einer Pulsbreite von 10 ns. Die Laserenergie wurde mit einem Abschwächer (A) (Newport, Modell M935-10) eingestellt. Als Probenlaser diente ein 1 mW HeNe-Laser (HeNe) (Uniphase 1101P). Der He-Ne-Laserstrahl wurde durch eine 12,5 cm vor der Küvette angebrachte -20 mm Bikonkav-Linse (L2) aufgeweitet. Die Fokussierung des Anregungslaserstrahls erfolgte mit einer 200 mm Plankonvex-Linse (L1). Die beiden Laserstrahlen wurden mit einem Langpaßkantenfilter (ST) (Laser Components) mit einer maximalen Transmission bei 532 nm und einer maximalen Reflexion bei 266 nm kollinear eingekoppelt. Im Abstand von 2 cm hinter der Küvette befand sich eine Lochblende (P) mit einem Durchmesser von 1 mm. Vor der Photodiode befand sich die Detektionsoptik zum Ausblenden des Anregungslaserstrahls und zum optimalen Ausleuchten der photoempfindlichen Fläche. Die kollineare Justage der beiden Laserstrahlen erfolgte mit Hilfe der Irisblende (IB) und der Lochblende (P). Bei den Messungen war die Irisblende geöffnet. Für den gesamten Aufbau wurden Komponenten der Spindler & Hoyer Mikrobank verwendet. Da der Nd-YAG-Laser bei der 266 nm Wellenlänge Energieschwankungen bis zu 12% hatte, war es notwendig, die Laserenergie mitzumessen und das erhaltene Thermische Linsen-Signal auf die Laserenergie zu normieren. Hierzu wurde ein Teil des Anregungslaserstrahls mit einer Quarzplatte (ST 1) ausgekoppelt und die Laserenergie mit einer Photodiode (PD 1) gemessen. Es wurde eine Silizium-Pin-Photodiode (Thorlabs, Modell Det2-Si) mit einem spektralen Empfindlich-

keitsbereich von 185 nm - 1100 nm, einer photoempfindlichen Fläche von 1 mm² und einer Ansprechzeit von 1 ns eingesetzt. Das Photodiodensignal wurde auf die Laserenergie kalibriert. Zur Messung der Laserenergie wurde ein Energiemeßgerät (Gentec, Modell PRJ-M) mit den Meßköpfen ED-100, bzw. ED-200 eingesetzt.

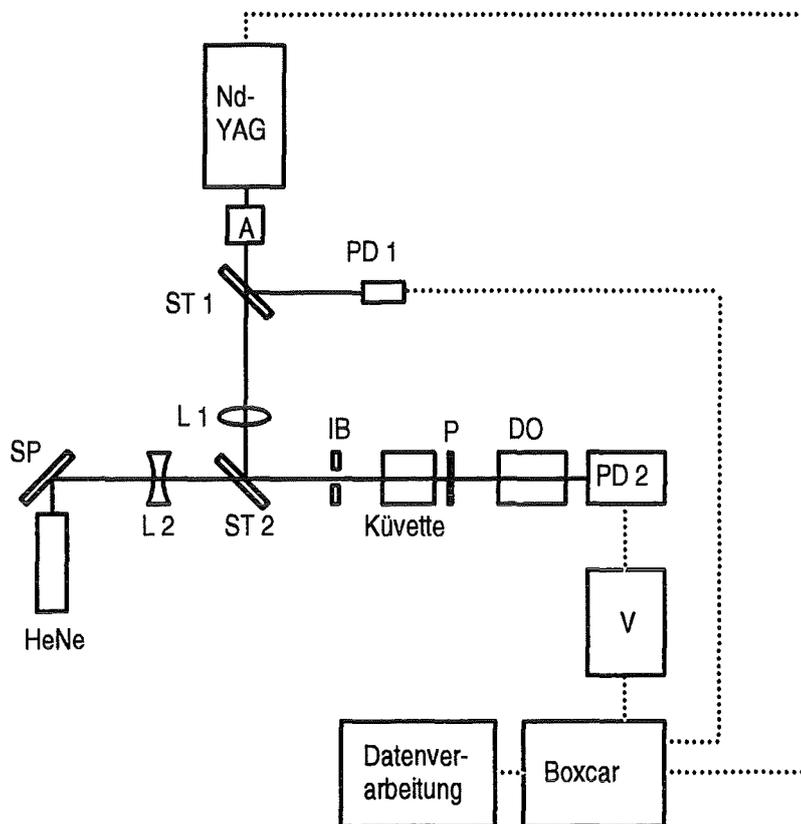


Abb. 4.42: Aufbau der gepulsten Thermischen Linse. Nd-YAG: Nd-YAG-Laser, A: Abschwächer, ST 2: Langpaßkantenfilter, ST 1: Strahlteiler, PD 1, PD 2: Photodioden, L 1: Sammellinse, L 2: Aufweitungslinse, HeNe: HeNe-Laser, SP: Spiegel, IB: Irisblende, P: Lochblende, DO: Detektionsoptik, V: Lichtleistungs-Spannungs-Verstärker, Boxcar: Boxcar-Averager

Küvette

Für Durchfluß- und HPLC-Messungen wurde die in Kapitel 4.2.2.1 beschriebene Durchflußküvette vom Typ 1 mit einem Küvettenvolumen von 8 µl verwendet.

4.4.1.1 Elektronische Meßwerterfassung

Das von der Photodiode (PD 2) (Hamamatsu, Modell S2386-45K) erfaßte Thermische Linsen-Signal wurde von einem Lichtleistungs-Spannungs-Verstärker (der Schaltplan ist in Anhang C abgebildet) aufgenommen und an einen Boxcar-Averager (EG&G, Modell 4162) weitergegeben. Das von der Photodiode (PD 1) erhaltene Signal (Energiemessung) wurde direkt an den Boxcar-Averager geleitet. Um vom Nd-YAG-Laser ausgehende elektroma-

gnetische Störeinflüsse zu minimieren, wurden die Kabelverbindungen möglichst kurz gehalten und in einem Metallrohr verlegt. Ein Speicheroszilloskop (Tektronix, Modell 601A) ermöglichte die Darstellung der Photodiodensignale und der Fenster, die am Boxcar-Averager eingestellt wurden [MALMSTADT ET AL.]. Das Auslösesignal für den Boxcar-Averager wurde von dem Triggerausgang des Nd-YAG-Laser bereitgestellt. Der Boxcar-Averager wurde von dem Triggerausgang des Nd-YAG-Laser bereitgestellt. Der Boxcar-Averager war mit einem Delay-Generator ausgestattet, der es ermöglichte, die Verzögerungszeit t_{delay} zu dem vom Nd-YAG-Laser bereitgestellten Triggerzeitpunkt für die Boxcar-Fenster einzustellen. Innerhalb dieses Zeitfensters, dessen Breite t_{gate} mit dem Boxcar-Averager eingestellt werden konnte, wurde das Photodiodensignal ausgewertet. In Abbildung 4.43a ist das vom Nd-YAG-Laser bereitgestellte Triggersignal zu sehen. Um die Verzögerungszeit richtig einstellen zu können, war es nötig, daß der Boxcar-Averager auf der absteigenden Flanke 1 getriggert wurde. Da es am Boxcar-Averager nur die Einstellmöglichkeit gab, ob auf der absteigenden oder aufsteigenden Flanke getriggert wird, fand die Triggerung auf Flanke 1 oder Flanke 2 statt. Dadurch war es nicht möglich, die Verzögerungszeit richtig einzustellen. Durch eine geeignete elektronische Schaltung wurde deshalb ein Teil des Triggersignals unterdrückt (siehe Abbildung 4.43b), wodurch eine Triggerung auf der absteigenden Flanke 1 ermöglicht wurde und die Verzögerungszeit richtig eingestellt werden konnte.

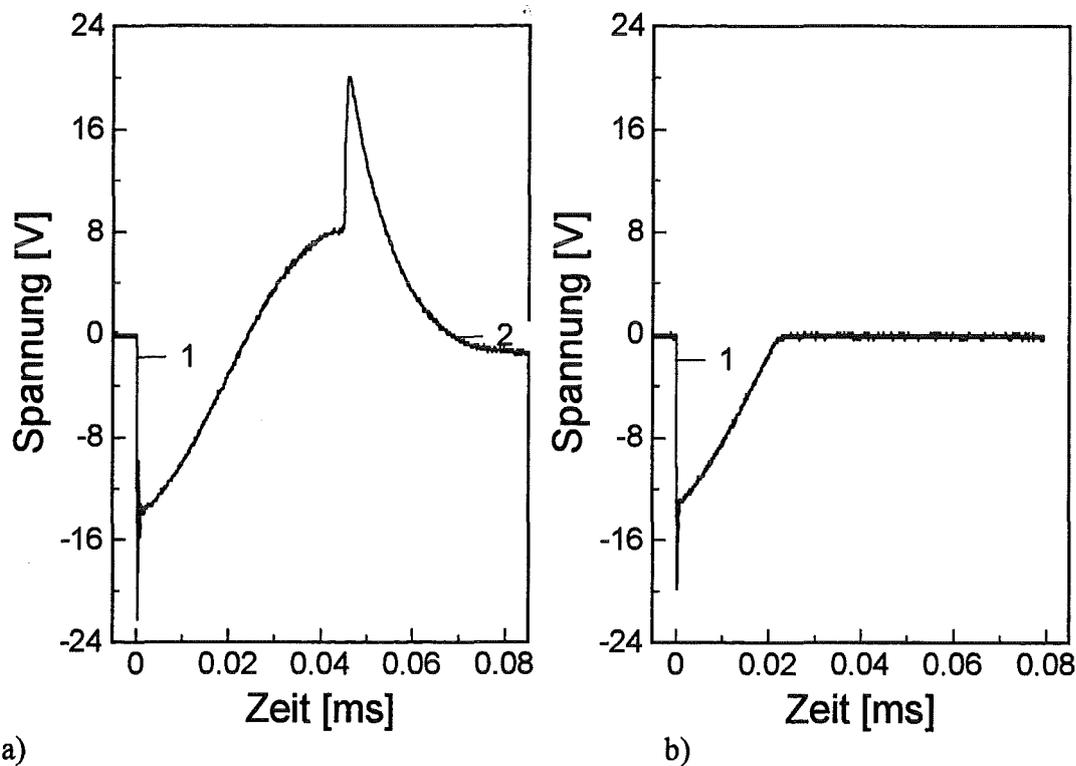


Abb. 4.43: a: Triggersignal des Lasers, b: Triggersignal des Lasers nach der Modellierung

Zur Messung des Thermischen Linsen-Signals wurde am Boxcar-Averager eine Verzögerungszeit t_{delay} von 19,6 μ s und ein Zeitfenster t_{gate} von 15 μ s gewählt. Für die Energiemessung wurde t_{delay} auf 16,3 ns und t_{gate} auf 2 ns eingestellt.

Der Boxcar-Averager konnte über eine GPIB-Schnittstelle mit einem Computerprogramm (EG&G) ausgelesen werden.

Die Peakbreiten, die bei HPLC-Trennungen erhalten werden, betragen ca. 30 s. Um eine genügend hohe Auflösung der Peaks zu erreichen (20-30 Meßpunkte über den Peak verteilt), muß mindestens jede Sekunde ein Wert ausgelesen werden. Das heißt, bei einer Pulswiederholrate von 10 Hz wurde mit der analogen Mittelung des Boxcar-Averagers über zehn Pulse gemittelt und dieser Wert dann ausgelesen. Anschließend wurden die Meßwerte, die von dem Thermischen Linsen-Signal erhalten wurden, durch den entsprechenden Wert der Energiemessung geteilt.

4.4.2 Verwendete Substanzen und Reagenzien

Die Trennung mit der HPLC wurde mit den Harnstoffherbiziden Ethidimuron (Riedel de Haën), Dimefuron (Riedel de Haën) und Thiazafluron (Riedel de Haën) durchgeführt. Der Harnstoff ist bei den Harnstoffherbiziden meist dreifach substituiert, da sich nur sehr wenige disubstituierte Harnstoffe für den Einsatz als Herbizide eignen. Die Harnstoffherbizide werden als Totalherbizide oder zur selektiven Unkrautbekämpfung eingesetzt und werden fast ausschließlich über den Boden appliziert [THIER UND FREHSE]. Die Struktur der Pestizide ist in Abbildung 4.44 dargestellt.

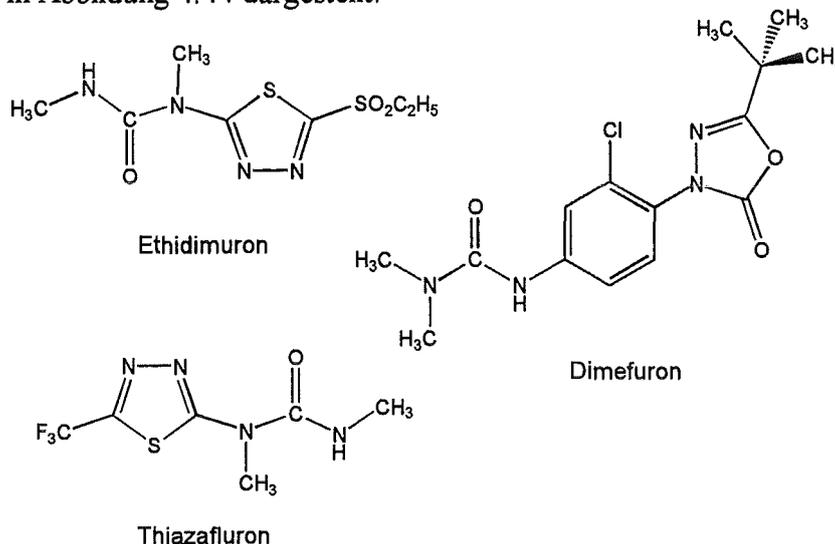


Abb. 4.44: Struktur der Harnstoffherbizide

Die Hauptabsorptionsbanden dieser drei Herbizide liegen unterhalb von 235 nm. Diese zeigen jedoch bei höheren Wellenlängen eine Absorptionsschulter, die eine Detektion bei 266 nm (Laserwellenlänge) möglich macht. Das Absorptionsspektrum dieser Harnstoffherbizide ist in Abbildung 4.45 dargestellt.

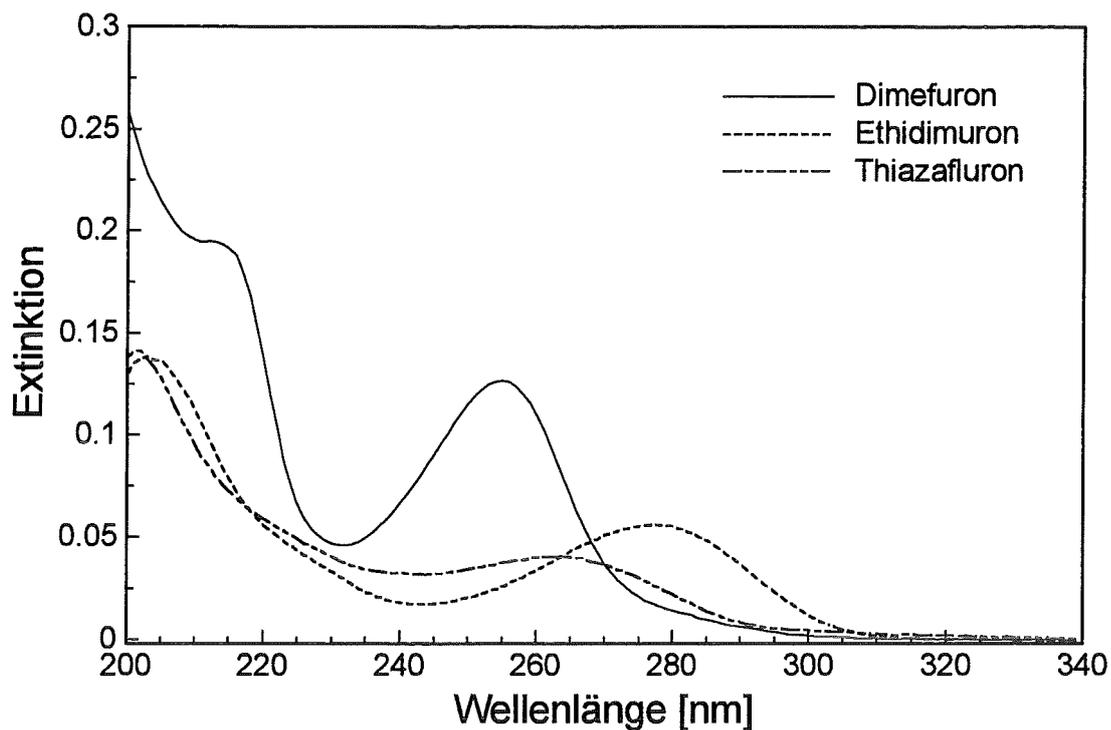


Abb. 4.45: Absorptionsspektrum der Harnstoffherbizide

Außerdem wurde der Textilfarbstoff Reaktivgelb 27 verwendet. Reaktivgelb 27 ist ein Azofarbstoff, der durch kovalente Anbindung an Textilfasern gekoppelt wird. Als reaktive Gruppe dient Dichlorchinoxalin. Das Absorptionsspektrum und die Struktur des Textilfarbstoffes sind in den Abbildungen 4.46 und 4.47 dargestellt.

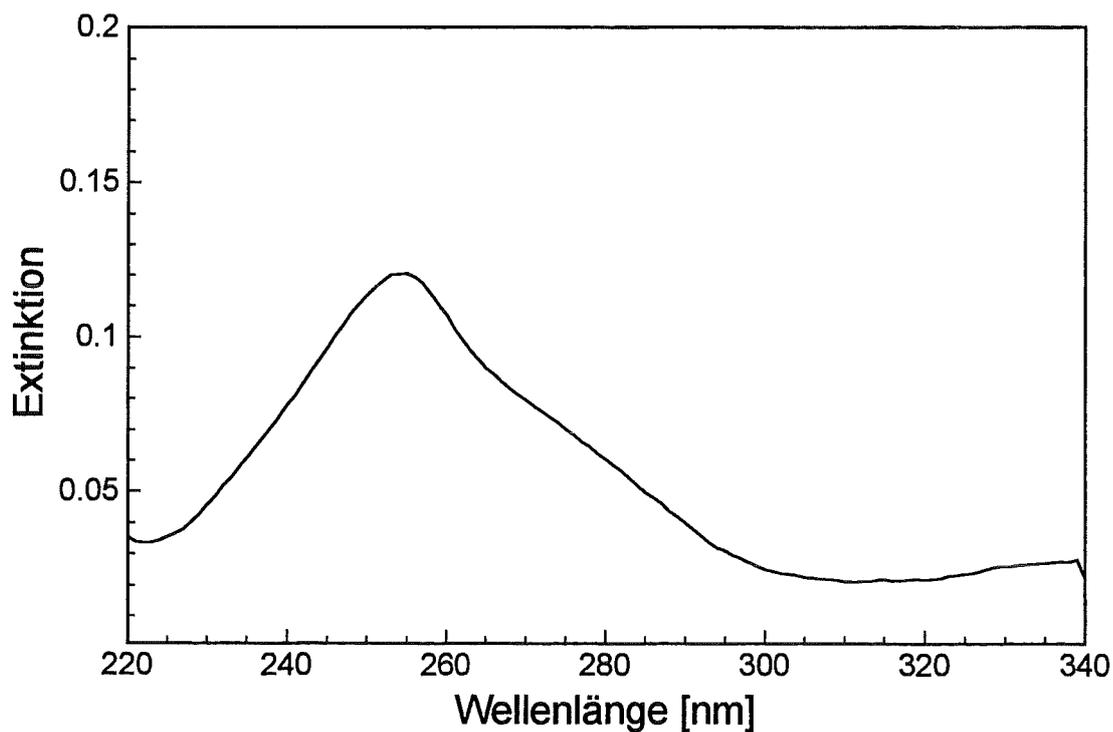


Abb. 4.46: Absorptionsspektrum von Reaktivgelb 27

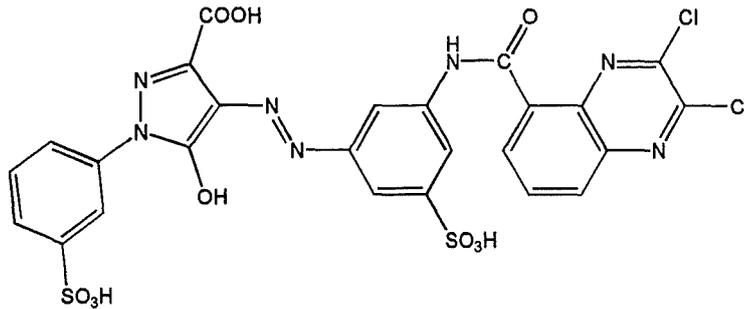


Abb. 4.47: Struktur des Textilfarbstoffes Reaktivgelb 27

4.5 Ergebnisse und Diskussion zur gepulsten Thermischen Linse

Mit der gepulsten Thermischen Linse wurden Durchflußexperimente durchgeführt, um den Einfluß der Durchflußgeschwindigkeit auf das Thermische Linsen-Signal zu ermitteln. Des weiteren wurde die maximale Energie gemessen, die bei verschiedenen Lösungsmitteln eingesetzt werden kann. Die HPLC-Detektion mit der gepulsten Thermischen Linse wurde mit einer isokratischen Trennung der Harnstoffherbizide durchgeführt.

4.5.1 Die Abhängigkeit des gepulsten TL-Signals von der Durchflußgeschwindigkeit

Für einen Vergleich mit cw-modulierten Messungen (siehe Kapitel 4.3.1) wird der Einfluß der Durchflußgeschwindigkeit auf das Thermische Linsen-Signal bei gepulster Anregung kurz erläutert. Die Messungen in dieser Arbeit wurden mit der 8 µl Küvette durchgeführt, im Gegensatz zu SCHULZ, der für Durchflußmessungen bei gepulster Anregung Küvetten mit einem Probenvolumen von 80 µl (siehe Kapitel 4.2.2.1, Typ 1) eingesetzt hat. Abbildung 4.48 zeigt die Abhängigkeit des Thermischen Linsen-Signals von der Strömungsgeschwindigkeit bei gepulster Anregung. Die Messungen wurden bei einer Laserenergie von 600 µJ und einer Pulswiederholrate von 10 Hz durchgeführt. Als Analyt diente eine Lösung von 12,6 mg/l Reaktivgelb 27 in Wasser.

Man sieht in Abbildung 4.48, daß das Thermische Linsen-Signal bei gepulster Anregung, im Gegensatz zur cw-modulierten Anregung (siehe Kapitel 4.3.1), unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit ist. Dies stimmt mit Ergebnissen von Nickolaisen und Bialkowski [NICKOLAISEN UND BIALKOWSKI] überein. Durch die kurze Anregung durch den gepulsten Laser bildet sich das Thermische Linsen-Signal innerhalb von Mikrosekunden voll aus. Der Abtransport der Wärme durch die Konvektion ist dagegen um Größenordnungen langsamer. Dies ist ein Vorteil der gepulsten Anregung gegenüber der cw-modulierten Anregung. Deshalb sollte die gepulste Anregung besser für die Thermische Linse Detektion von HPLC-Trennungen geeignet sein.

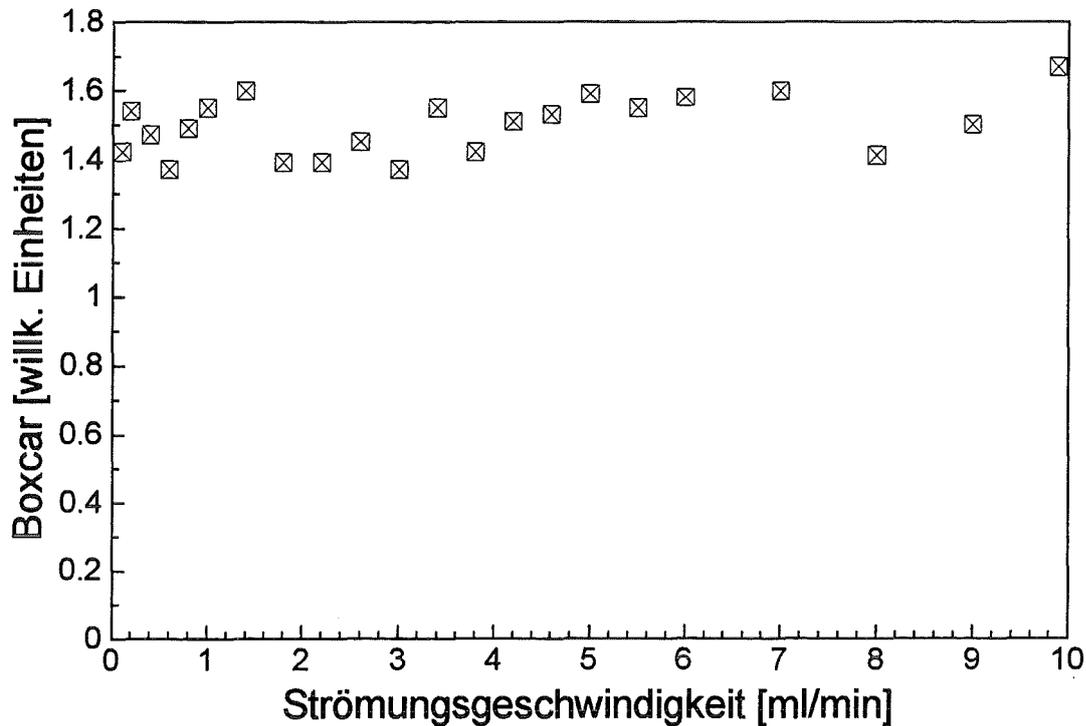


Abb. 4.48: Gepulstes TL-Signal in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit. Küvette: Typ 1, 8 μ l, gepulste Anregung mit 10 Hz, Laserenergie 600 μ J, Analyt: Reaktivgelb 27 in Wasser

4.5.2 Detektion bei isokratischer Trennung der Harnstoffherbizide

Für einen Vergleich der Detektion mit gepulster Thermischer Linse und einem UV-VIS-Detektor wurde eine Trennung [PRIBYL UND HERZEL 1976, 1978, SIDWELL UND RUZICKA] der Harnstoffherbizide Ethidimuron (E), Thiazafuron (T) und Dimefuron (D) durchgeführt. Die Trennung wurde mit einer RP-18-Säule (Lichrosorb 5 μ m, 250 mm * 4 mm), einem Volumenverhältnis von 65/35 Methanol/Wasser und einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt.

Abbildung 4.49 zeigt das Chromatogramm dieser Trennung. Es wurde mit einem UV-VIS-Detektor bei einer Wellenlänge von 266 nm aufgenommen.

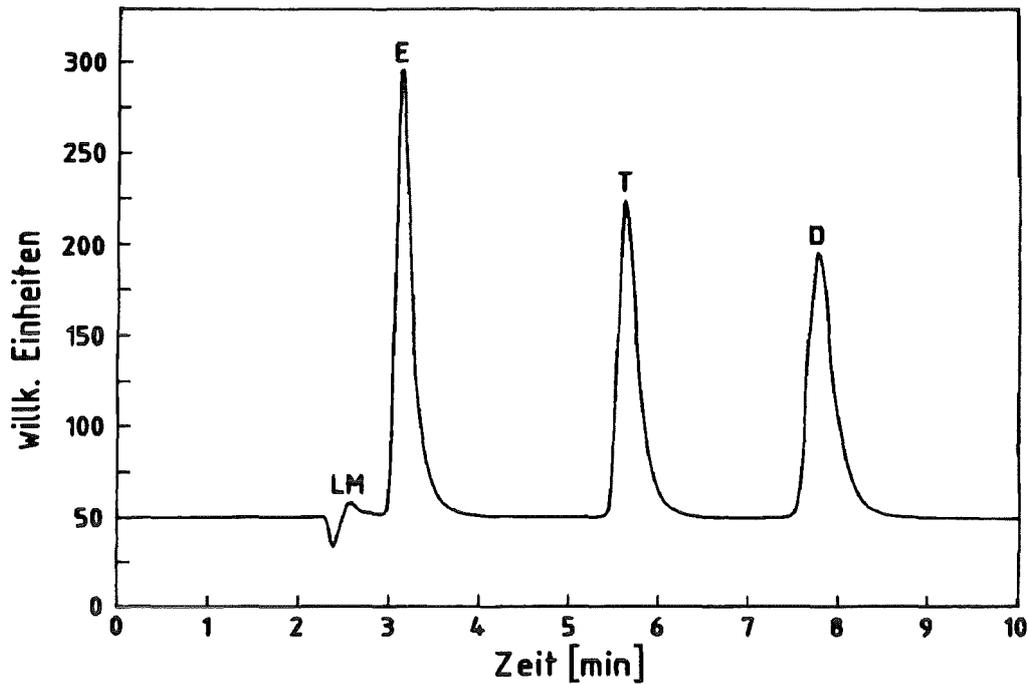


Abb. 4.49: Chromatogramm der Harnstoffherbizidtrennung, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Konzentration: Ethidimuron (E) 2,4 mg/l, Thiazafluron (T) 1,8 mg/l, Dimefuron (D) 1,47 mg/l

Die Kapazitätsfaktoren k' der Harnstoffherbizidtrennung sind in Tabelle 4.10 zu sehen.

Substanz	Ethidimuron	Thiazafluron	Dimefuron
Kapazitätsfaktor k'	0.21	1.16	1.98

Tab. 4.10: Kapazitätsfaktoren der Harnstoffherbizidtrennung

Um die Analysenzeit dieser Trennung zu verringern, müßte der Methanolanteil des Eluenten erhöht werden. Durch eine solche Erhöhung fällt jedoch der Peak von Ethidimuron mit dem Lösungsmittelpeak zusammen.

Für die Trennung wurde eine Konzentrationsreihe mit dem UV-VIS-Detektor aufgenommen. Zur Aufstellung der Kalibrierkurven wurde die Peakhöhe ausgewertet. Die Kalibrierkurve von Dimefuron zeigt Abbildung 4.50. (Die Kalibrierkurven von Ethidimuron und Thiazafluron sind in Anhang D.3 in den Abbildungen D.17 und D.18 zu sehen.)

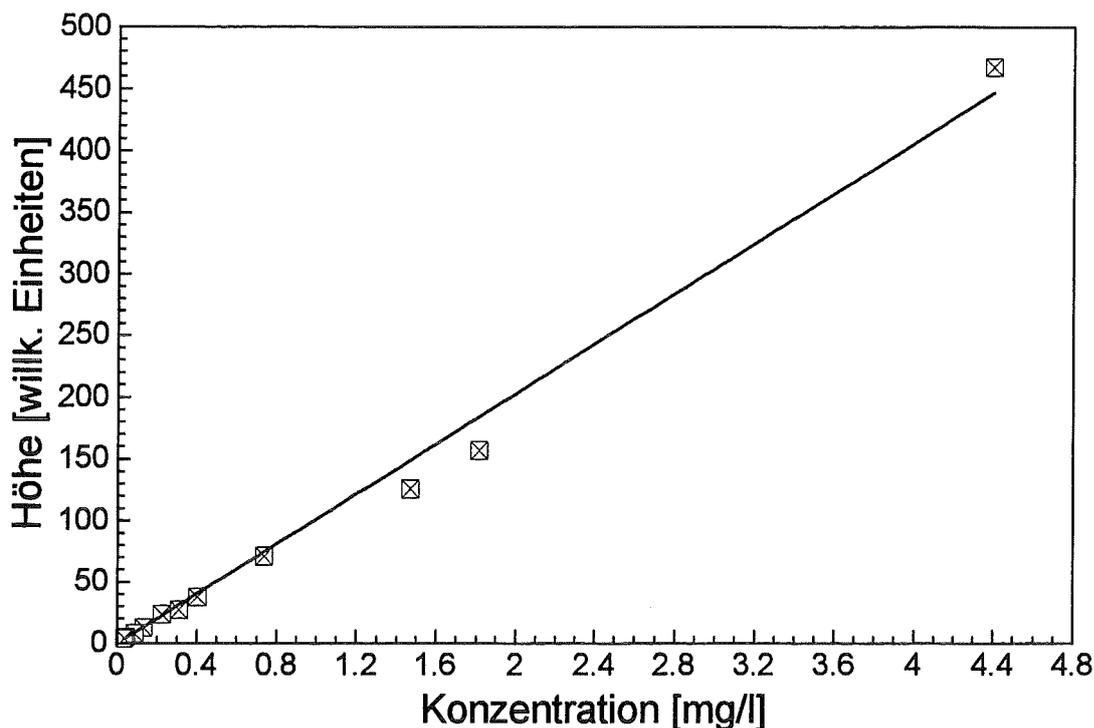


Abb. 4.50: Kalibrierkurve für Dimefuron, detektiert mit einem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Die Detektion mit der gepulsten Thermischen Linse wurde bei einer Laserenergie von 380 μJ , einer Pulswiederholrate von 10 Hz und bei einer Wellenlänge von 266 nm durchgeführt. Durch die Laserbestrahlung der Harnstoffherbizide zersetzen sich diese. Diese Zersetzung läßt sich durch folgende Vorgehensweise nachweisen. Wie bereits in Kapitel 4.2.1 erläutert wurde, konnte nach der Detektion mit der Thermischen Linsen das Chromatogramm zusätzlich noch mit dem UV-VIS-Detektor aufgezeichnet werden. Hierzu wurde das Auslaßröhrchen der Küvette mit dem UV-VIS-Detektoreingang verbunden. Abbildung 4.50 zeigt zwei Chromatogramme, die mit dem UV-VIS-Detektor unter diesen Bedingungen aufgenommen wurden. Chromatogramm 1 (durchgezogene Linie) zeigt die UV-Detektion nach der TL-Detektion. Bei der Aufnahme von Chromatogramm 2 (gestrichelte Linie) wurden die Laser der Thermischen Linsen Detektion ausgeschaltet. Die Peakhöhen von Chromatogramm 1 sind deutlich niedriger als die von Chromatogramm 2, obwohl die Konzentration der Harnstoffherbizide bei beiden Trennungen die gleiche war, was auf eine Zersetzung der Harnstoffherbizide durch die Laserbestrahlung zurückzuführen ist. Durch einer Verringerung der Laserenergie läßt sich der Grad der Zersetzung natürlich verringern, allerdings wird zur Detektion eines Thermischen Linsen-Signals eine gewisse Mindestenergie benötigt.

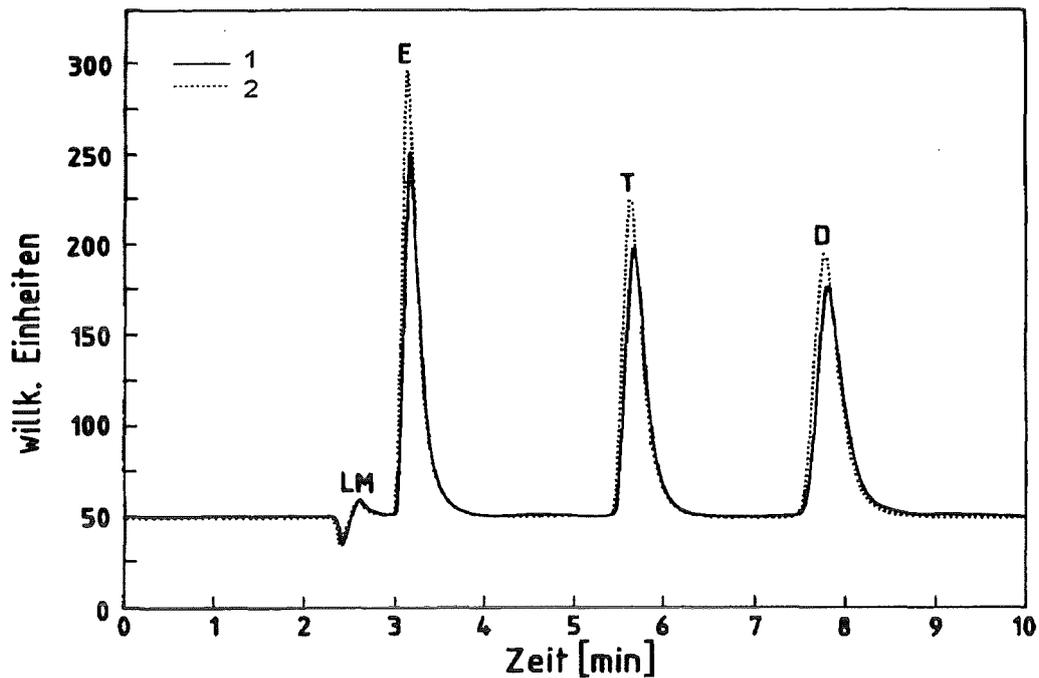


Abb. 4.51: Zersetzung der Harnstoffherbizide. Kurve 1 (—): mit Laserbestrahlung, Kurve 2 (·····): ohne Laserbestrahlung

Durch die hohen Energieschwankungen des Anregungslasers (siehe Kapitel 4.4.1), und da wegen der Auflösung der Peaks nur über 10 Laserpulse gemittelt werden konnte (siehe Kapitel 4.4.1.1), sind die Trennungen, die mit der gepulsten Thermischen Linse detektiert wurden, stark verrauscht. Abbildung 4.52 zeigt ein Chromatogramm, das mit der gepulsten Thermischen Linse detektiert wurde. Die Konzentrationen der Harnstoffherbizide liegen im Bereich der Nachweisgrenze. Der Dimefuronpeak ist vom Basislinienrauschen nicht mehr zu unterscheiden und konnte nur über die Retentionszeit lokalisiert werden. Durch die Normierung des Thermischen Linsen-Signals auf die Laserenergie und Glättung des aufgezeichneten Chromatogramms grenzt sich der Dimefuronpeak deutlich von der Basislinie ab (siehe Abbildung 4.53). Daher wurden sämtliche Chromatogramme, die mit der gepulsten Thermischen Linse aufgezeichnet wurden, vor der Auswertung auf die Laserenergie normiert und anschließend geglättet.

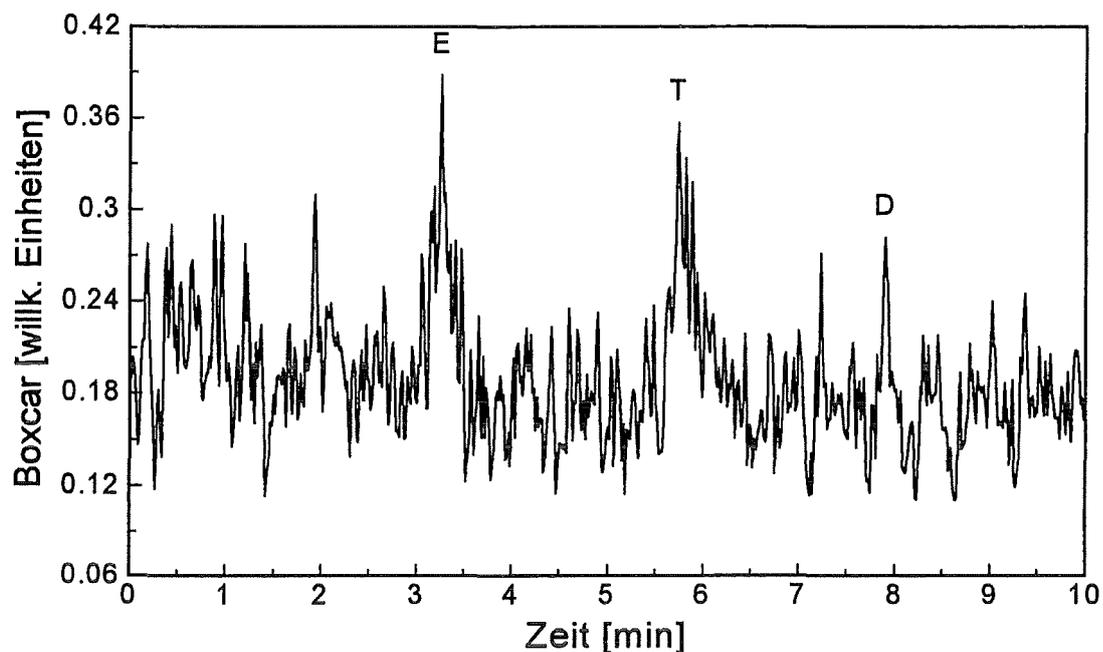


Abb. 4.52: Originalchromatogramm der Harnstoffherbizidtrennung, detektiert mit der gepulsten Thermischen Linse. Pulswiederholrate: 10 Hz, Laserenergie 380 μ J, Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Konzentration: Ethidimuron (E) 420 μ g/l, Thiazafluron (T) 210 μ g/l, Dimefuron (D) 240 μ g/l

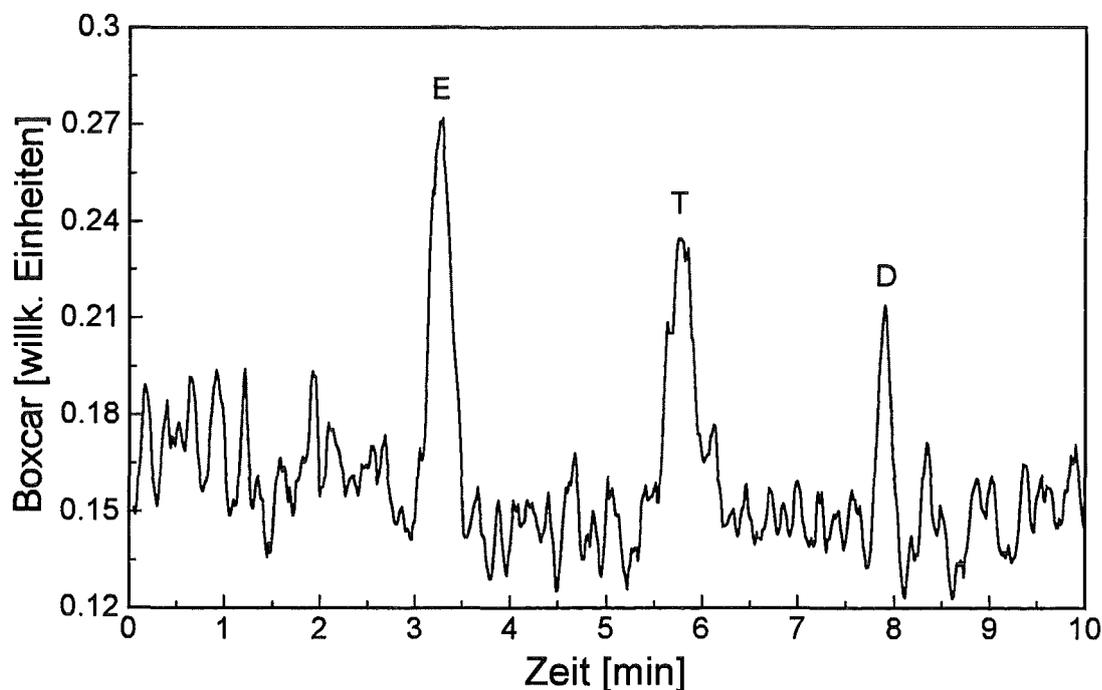


Abb. 4.53: Chromatogramm der Harnstoffherbizidtrennung nach der Energienormierung und der Glättung. Pulswiederholrate: 10 Hz, Laserenergie: 380 μ J, Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Konzentration: Ethidimuron (E) 420 μ g/l, Thiazafluron (T) 210 μ g/l, Dimefuron (D) 240 μ g/l

Für die Aufstellung der Konzentrationsreihen wurde die Peakhöhe ausgewertet. Die Konzentrationsreihe für Dimefuron mit der Detektion mit der gepulsten Thermischen Linse ist in Abbildung 4.54 zu sehen. Die Kalibrierkurven für Ethidimuron und Thiazafluron sind in Anhang D.3 in den Abbildungen D.19 und D.20 dargestellt.

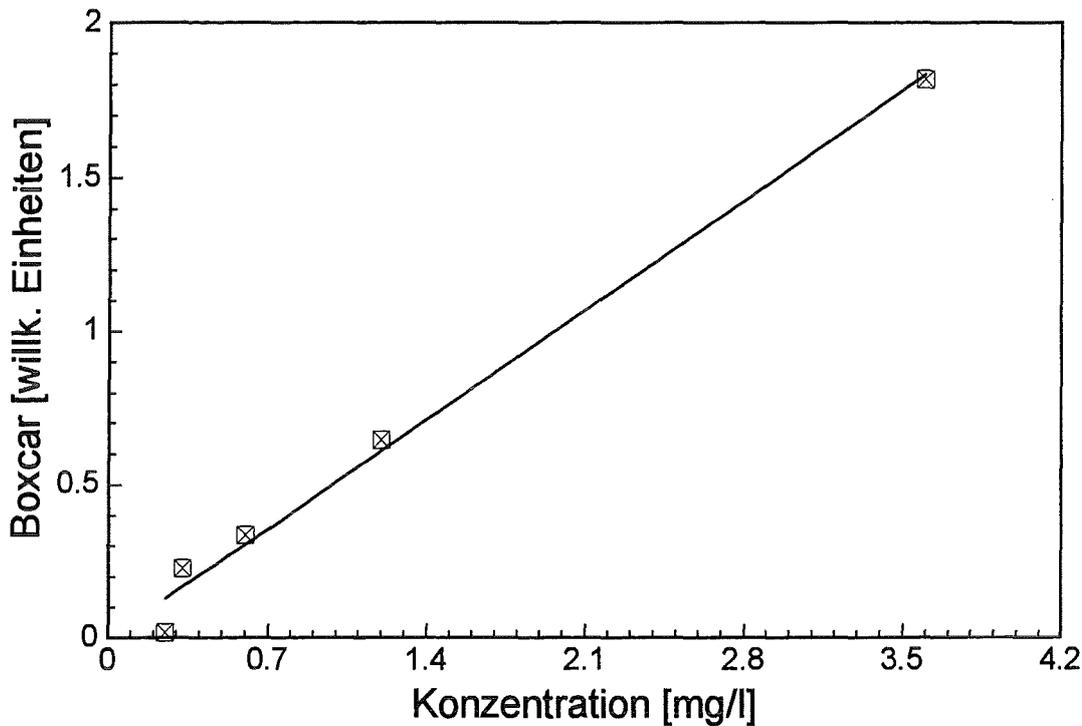


Abb. 4.54: Kalibrierkurve für Dimefuron, detektiert mit der gepulsten Thermischen Linse. Pulswiederholrate: 10 Hz, Laserenergie: 380 μ J, Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

Die Nachweisgrenzen für die Harnstoffherbizidtrennung sind in Tabelle 4.11 dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben den Korrelationskoeffizienten an.

Detektor ↓ / Substanz →	Nachweisgrenze [μ g/l]		
	Ethidimuron	Thiazafluron	Dimefuron
UV-VIS	46 (0,997)	35 (0,997)	35 (0,998)
gepulste Thermische Linse	420 (0,991)	250 (0,995)	280 (0,996)

Tab. 4.11: Nachweisgrenzen für die Harnstoffherbizidtrennung. UV-VIS-Detektor und gepulste Thermische Linse im Vergleich.

Mit der gepulsten Thermischen Linse werden Nachweisgrenzen erreicht, die eine Größenordnung schlechter sind als mit dem UV-VIS-Detektor. Die schlechten Nachweisgrenzen werden unter anderem durch die hohen Energieschwankungen des Anregungslasers verursacht. Des weiteren konnte nur über 10 Laserpulse gemittelt werden. Trotz der Normierung

mit der Energie des Anregungslasers und Glättung der Chromatogramme konnte das Rauschen der Basislinie nicht ausreichend verringert werden, um bessere Nachweisgrenzen zu erhalten. Mit der kollinearen cw-modulierten Thermischen Linse wurde eine um den Faktor 10 bessere Nachweisgrenze als mit dem UV-VIS-Detektor erhalten (siehe Kapitel 4.3.3). SCHULZ erhielt bereits bei statischen Messungen mit der kollinearen gepulsten Thermischen Linse eine um den Faktor 10 schlechtere Nachweisgrenze als mit der kollinearen cw-modulierten Thermischen Linse, wobei er jedoch bei seinen Messungen über 300 Laserpulse gemittelt hat. Durch den Einsatz eines Lasers mit geringeren Energieschwankungen und mit einer höheren Pulswiederholrate (1000 Hz), um das Signal zu Rausch Verhältnis durch eine Mittelung über eine größere Anzahl von Meßpunkten zu verbessern, können die Nachweisgrenzen für die HPLC-Detektion mit der gepulsten Thermischen Linse noch verbessert werden.

4.5.3 Lösungsmittelgradienten

Die Ergebnisse der Detektion mit der kollinearen gepulsten Thermischen Linse bei der Detektion von Lösungsmittelgradienten unterscheiden sich im wesentlichen nicht von denen, die mit der kollinearen cw-Thermischen Linse erhalten wurden. Daher werden die Lösungsmittelgradienten nur kurz besprochen.

4.5.3.1 Detektion von Stufengradienten

Abbildung 4.55 zeigt die Auswirkung eines Stufengradienten auf die gepulste Thermische Linse. Hierbei wurde die Zusammensetzung des Lösungsmittels innerhalb 0,01 min von reinem Methanol auf ein Volumenverhältnis von 90/10 Methanol/Wasser verändert. Die Messungen wurden bei einer Laserenergie von 500 μ J und einer Pulswiederholrate von 10 Hz durchgeführt. Bis zu der Zeit von 35 s ist die Basislinie von reinem Methanol zu sehen, danach wurde der Stufengradient detektiert und ab 70 s sieht man die Basislinie der 90/10 Methanol/Wasser-Mischung. Analog zu den kollinearen cw-modulierten Thermischen Linse Messungen (siehe Kapitel 4.3.4.2) ist in der Zeit, die die 90/10 Methanol/Wasser Mischung benötigt, um das Methanol aus der Küvette zu verdrängen, eine Detektion des Thermischen Linsen-Signals nicht mehr möglich.

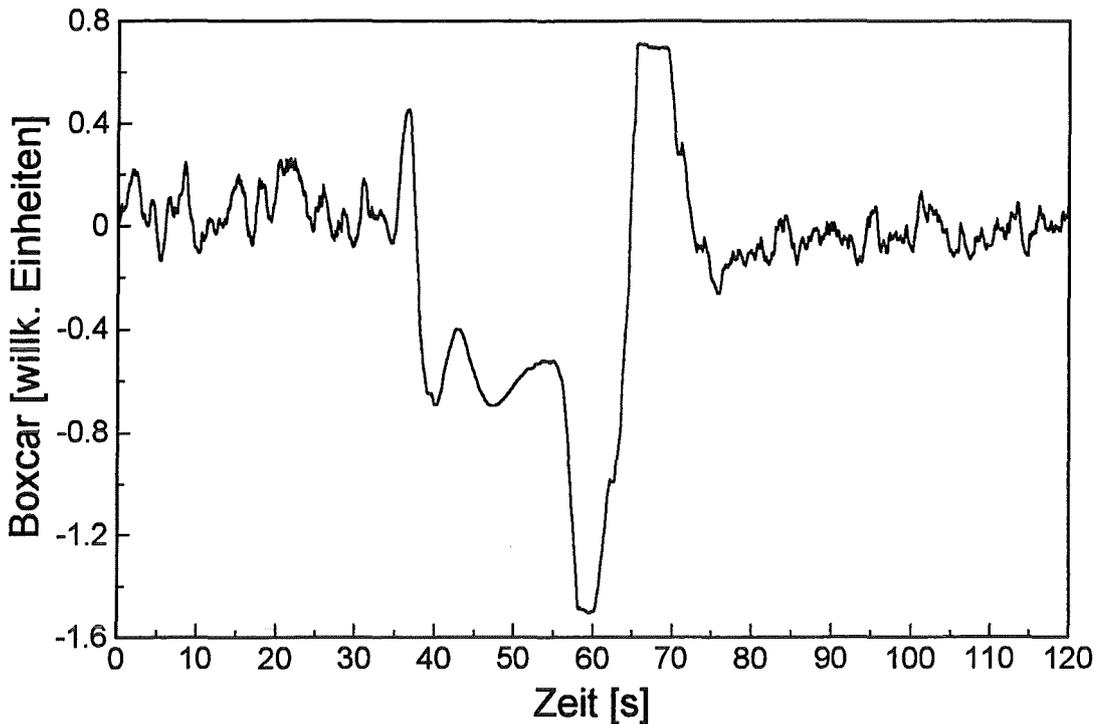


Abb. 4.55: Stufengradient von reinem Methanol zu einer 90/10 Methanol/Wasser-Mischung, gemessen wurde mit der gepulsten Thermischen Linse, Pulswiederholrate: 10 Hz, Laserenergie: 500 μ J, Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 2 ml/min, Küvettenvolumen: 18 μ l

4.5.3.2 Detektion von linearen Lösungsmittelgradienten

Bei der Durchführung von Messungen mit einem linearen Lösungsmittelgradienten wurde das Methanol/Wasser-Volumenverhältnis von 70/30 innerhalb von 15 min auf 85/15 geändert. Die Messungen wurden bei einer Laserenergie von 500 μ J und einer Pulswiederholrate von 10 Hz durchgeführt. Abbildung 4.56 zeigt die Detektion des Lösungsmittelgradienten mit der kollinearen gepulsten Thermischen Linse. Nach der Zeit von 2 min ist die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung durch eine erhöhte Schwankung der Basislinie zu sehen. Nach 17 Minuten endet der Lösungsmittelgradient. Danach ist ein starker Abfall des Thermischen Linsen-Signals zu sehen, verursacht durch das schnelle Umschalten der Pumpe auf die 70/30 Methanol/Wasser-Mischung. Dieses Ergebnis entspricht demjenigen, welches mit der kollinearen cw-modulierten Thermischen Linse erhalten wurde (siehe Kapitel 4.3.4.4).

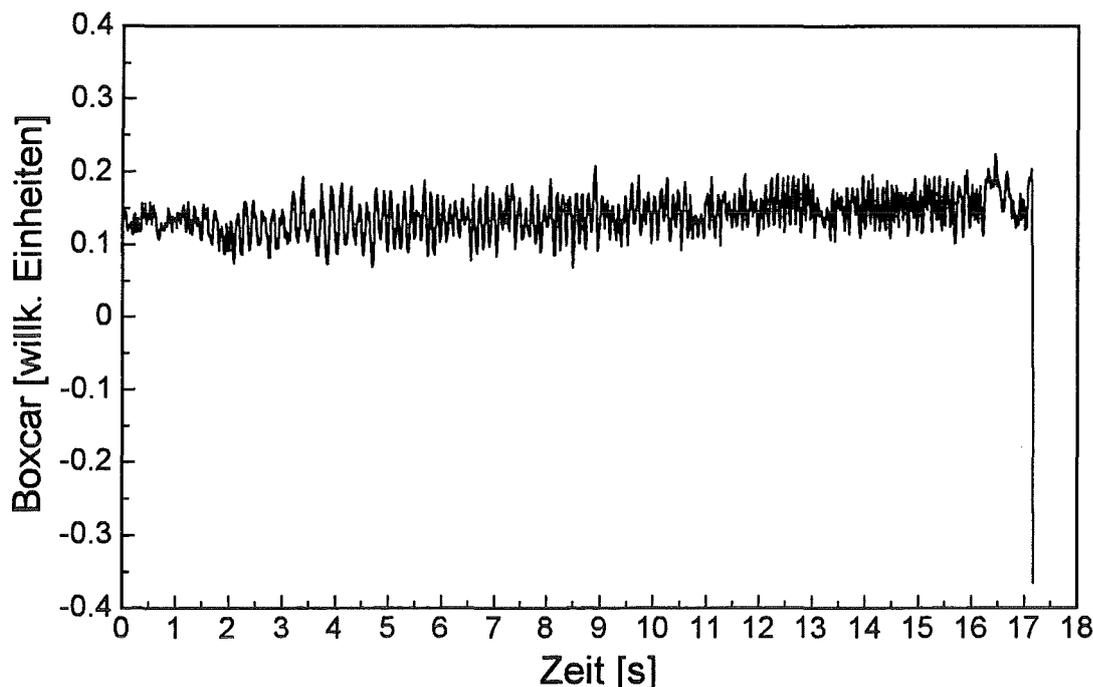


Abb. 4.56: Linearer Lösungsmittelgradient mit einer 1%igen Änderung der Methanol/Wasser-Zusammensetzung, gemessen wurde mit der gepulsten Thermischen Linse Pulswiederholrate: 10 Hz, Laserenergie: 500 μ J, Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min, Küvettenvolumen 18 μ l

4.6 Abschließende Diskussion der gepulsten Thermischen Linse und Vergleich mit der cw-modulierten Thermischen Linse

Für die Detektion von HPLC-Trennungen mit der gepulsten Thermischen Linse wurde die kollineare Anordnung mit der Fließrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen benutzt. Die Nachweisgrenzen für die Detektion von Harnstoffherbiziden mit der gepulsten Thermischen Linse sind um einen Faktor zehn schlechter als die mit einem UV-VIS-Detektor gemessenen. Der Grund dafür waren die hohen Energieschwankungen des gepulsten Lasers und die niedrige Pulswiederholrate.

Mit der cw-modulierten kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen wurde im Gegensatz zu den gepulsten Messungen eine um den Faktor 10 bessere Nachweisgrenze als mit einem UV-VIS-Detektor erhalten.

Bei der Detektion von Lösungsmittelgradienten erhält man für die gepulste und die cw-modulierte Thermische Linse (Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen) im wesentlichen dieselben Ergebnisse. Bei Stufengradienten kann die Substanz nicht detektiert werden, wenn sie zur gleichen Zeit wie der Stufengradient am Detektor erscheint. Bei linearen Gradienten nimmt das Rauschen der Basislinie zu und dadurch werden die Nachweisgrenzen gegenüber isokratischen Trennungen etwas verschlechtert.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung der Thermischen Linse als Detektorsystem sowohl für die Kapillarelektrophorese (CE) als auch für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht.

Dabei wurde die Thermische Linse durchweg als sogenannte Nahfeld-Thermische Linse aufgebaut. Dadurch war es möglich, einen kompakten Meßkopf aufzubauen mit einem Abstand zwischen Probe und Lochblende von nur 1 cm (CE) bzw. 2 cm (HPLC). Bei einem klassischen Aufbau der Thermischen Linse beträgt dieser Abstand mindestens 20 cm.

Bei der Kapillarelektrophorese wurde als Detektionssystem die transversale cw-modulierte Thermische Linse eingesetzt. Für die Detektion der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde die cw-modulierte Thermische Linse sowohl mit transversaler als auch mit kollinearere Anordnung von Anregungs- und Detektionslaserstrahl aufgebaut. Beim kollinearen Aufbau wurde zusätzlich die Fließrichtung des Analyten in den Detektionsküvetten in Richtung der Laserstrahlen und senkrecht dazu geführt.

Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden weiterhin Messungen mit der gepulsten Thermischen Linse in kollinearere Anordnung durchgeführt.

Bei allen Messungen wurde als Referenzsystem ein konventioneller UV-VIS-Detektor verwendet.

Besonders hervorzuheben sind folgende Ergebnisse:

- Bei der Kapillarelektrophorese konnte durch den Einsatz der cw-modulierten transversalen Thermische Linse eine um den Faktor 50 bessere Nachweisgrenze im Vergleich mit einem UV-VIS-Detektor erzielt werden.
- Es konnte außerdem gezeigt werden, daß bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie auch Gradiententrennungen mit der Thermischen Linse detektiert werden können. Die wichtigsten Einflußparameter auf das Thermische Linsen Signal wurden untersucht.

Im einzelnen wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

Für den Einsatz der Thermischen Linse zur Detektion in der Kapillarelektrophorese wurde zuerst eine spezielle Halterung zur Fixierung der Kapillaren im Meßkopf konstruiert. Diese Vorrichtung erlaubt die problemlose und schnelle Justage der Kapillaren sowie eine schwingungsfreie Befestigung.

In verschiedenen Meßreihen wurde die Abhängigkeit des Thermische Linsen-Signals von der Laserleistung, der Chopperfrequenz und der Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Substanzen bestimmt.

Anhand einer Pestizidtrennung mit der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) wurden die Nachweisgrenzen sowohl der Thermischen Linse als auch der UV-VIS-Detektion bestimmt. Mit der (cw-modulierten transversalen) Thermischen Linse wurde

eine um den Faktor 50 bessere Nachweisgrenze als mit einem konventionellen UV-VIS-Detektor erzielt (Nachweisgrenzen für DNOC: 0,038 mg/l für die transversale Thermische Linse, 1,9 mg/l für die UV-VIS-Detektion).

Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden die eingangs geschilderten Varianten der Thermischen Linse realisiert.

Für die Detektion von isokratischen Trennungen wurden für die cw-modulierte kollineare Thermische Linse mit der Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen die besten Nachweisgrenzen erhalten. Die Nachweisgrenze bei der Wellenlänge von 364 nm mit dieser Detektionsmethode war um einen Faktor zehn besser als mit einem UV-VIS-Detektor (Nachweisgrenzen für DNOC: 0,7 µg/l für die Thermische Linse, 7 µg/l für die UV-VIS-Detektion). Für die Detektion mit der Thermischen Linse wurden kommerzielle Küvetten verwendet. Diese Küvetten sind nicht optimal für die Thermische Linse Detektion. Durch eine Verbesserung der Küvette bzw. Neuentwicklung einer an die Erfordernisse einer Detektion mit der Thermischen Linse angepaßten Küvettengeometrie ist eine deutliche Verbesserung der Nachweisgrenze zu erwarten.

Erstmals wurde die Thermische Linse auch für die Detektion von Trennungen mit einem Lösungsmittelgradienten eingesetzt. Dabei wurden sowohl Trennungen mit einem Stufengradienten als auch mit einem linearen Lösungsmittelgradienten durchgeführt.

Bei der Detektion von linearen Lösungsmittelgradienten mit der Thermischen Linse erhält man allerdings ein erhöhtes Basislinienrauschen gegenüber Trennungen, die unter isokratischen Bedingungen durchgeführt werden. Dadurch verschlechtern sich die Nachweisgrenzen für die Detektion mit der cw-modulierten Thermischen Linse. Sie sind jedoch für die cw-modulierte kollineare Thermische Linse immer noch einen Faktor zwei bis drei besser als mit einem UV-VIS-Detektor (Nachweisgrenze für DNP: 4 µg/l für die cw-modulierte kollineare Thermische Linse mit Durchflußrichtung senkrecht zur Strahlrichtung, 13 µg/l für die UV-VIS-Detektion).

Bei der Detektion von Stufengradienten liegen die Nachweisgrenzen für die cw-modulierte Thermische Linse (für DNOC: 4 µg/l für die cw-modulierte transversale Thermische Linse) in der gleichen Größenordnung wie für die isokratischen Trennungen. Die einzige Ausnahme bildet die Detektion mit der cw-modulierten Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Erscheint bei dieser Anordnung die zu detektierende Substanz zur gleichen Zeit wie der Stufengradient am Detektor, so kann die Substanz nicht detektiert werden.

Für die Detektion von HPLC-Trennungen mit der gepulsten Thermischen Linse wurde nur die kollineare Anordnung benutzt mit der Fließrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Die Nachweisgrenzen für die Detektion von Harnstoffherbiziden mit dieser Anordnung der Thermischen Linse sind um einen Faktor zehn schlechter als die mit einem UV-VIS-Detektor gemessenen (Nachweisgrenze für Dimefuron: 420 µg/l für die gepulste

Thermische Linse, 46 µg/l für die UV-VIS-Detektion). Der Grund dafür waren die hohen Energieschwankungen des gepulsten Lasers und die niedrige Pulsfrequenz.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich die Thermische Linse sehr gut als Detektor für die Kapillarelektrophorese und die HPLC eignet.

Der Einsatz der Thermischen Linse als kommerzieller Detektor ist vor allem durch das Lasersystem begrenzt. Es wird ein billiger, kleiner und leistungsfähiger Laser mit geringen Energieschwankungen benötigt. Bedingt durch die Absorptionsbanden vieler Substanzen sollte der Laser Laserlinien zwischen 220 nm und 260 nm besitzen. Bisher stehen die entsprechenden kostengünstigen Lasersysteme noch nicht zur Verfügung, so daß die Entwicklung bzw. die Umsetzung der Thermischen Linse als Detektor für die Kapillarelektrophorese im wesentlichen von der Laserentwicklung abhängt.

6 Anhang

Anhang A: Die Temperaturverteilung

Im folgenden wird die räumliche und zeitliche Temperaturverteilung beschrieben, die sich für den kontinuierlich modulierten photothermischen Effekt ergibt. Sämtliche Erläuterungen und Angaben beziehen sich auf die Vorstellungen von Vyas und Gupta [VYAS UND GUPTA, GUPTA]. Für die Herleitung werden folgende Annahmen gemacht:

- Die Anregung erfolgt mit einem kontinuierlichen Laserstrahl, der sich in z-Richtung (siehe Abbildung 2.1) ausbreitet und mit einer Frequenz von $f = \omega/(2\pi)$ moduliert wird.
- Der Laserstrahl hat senkrecht zu seiner Ausbreitungsrichtung ein gaußförmiges Intensitätsprofil.
- Die Proben sollen schwach absorbierende Lösungen sein.
- Die Probenflüssigkeit ist inkompressibel.
- Die Wärmekapazität C_p , die Dichte ρ und die Wärmeleitfähigkeit k sollen unabhängig von der Temperatur sein.

Die Differentialgleichung für die Temperaturverteilung lautet somit (Gleichung 6.1):

$$\frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 T(\vec{r}, t) - v_x \cdot \frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial x} + \frac{1}{\rho \cdot C_p} \cdot Q(\vec{r}, t) \quad \text{Gl. 6.1}$$

Mit dem Temperaturfeld $T(\vec{r}, t)$, der Temperaturleitfähigkeit D , der Strömungsgeschwindigkeit v_x in x-Richtung, der Dichte ρ , der Wärmekapazität bei konstantem Druck C_p und dem Wärmequellterm $Q(\vec{r}, t)$. Die Temperaturleitfähigkeit erhält man aus der Division der Wärmeleitfähigkeit k durch die Dichte ρ und der Wärmekapazität bei konstantem Druck C_p . Der Wärmequellterm $Q(\vec{r}, t)$ für eine kontinuierliche Anregung ist gegeben durch Gleichung 6.2:

$$Q(\vec{r}, t) = \frac{2 \cdot \alpha \cdot P_{av}}{\pi \cdot W^2} \cdot [\exp(-2r^2/W^2)] \cdot (1 + \cos\omega t) \quad \text{Gl. 6.2}$$

mit dem Absorptionskoeffizienten α , der durchschnittlichen Laserleistung P_{av} , die zwischen 0 und $P_0 = 2P_{av}$ oszilliert, und dem Radius des Anregungslasers W .

Die Gleichung 6.1 kann unter Berücksichtigung des Wärmequellterms $Q(\vec{r}, t)$ in x- und y-Richtung mit folgenden Randbedingungen (Gleichung 6.3) gelöst werden:

$$\begin{aligned} T(x, y, t)|_{t=0} &= 0; \quad T'(x, y, t)|_{t=0} = 0 \\ T(x, y, t)|_{x=\pm\infty} &= 0; \quad T(x, y, t)|_{y=\pm\infty} = 0 \end{aligned} \quad \text{Gl. 6.3}$$

Wobei T' den Temperaturgradienten darstellt und zum Zeitpunkt $t = 0$ der Laserstrahl eingestrahlt wird. Die Lösung für die räumliche und zeitliche Temperaturverteilung lautet dann (Gleichung 6.4):

$$T(x, y, t) = \frac{2 \alpha \cdot P_{av}}{\pi \cdot \rho \cdot C_p} \cdot \int_0^t \frac{(1 + \cos \omega \tau)}{[8 D \cdot (t - \tau) + W^2]} \cdot \exp \left(\frac{-2 ([x - v_x \cdot (t - \tau)]^2 + y^2)}{[8 D (t - \tau) + W^2]} \right) d\tau \quad \text{Gl. 6.4}$$

wobei das Integral in Gleichung 6.4 nur numerisch lösbar ist.

Anhang B: Das Thermische Linsen-Signal $S(t)$

Mit einer gaußförmigen Intensitätsverteilung $I(\vec{r}, t)$ des Detektionslasers ist die Laserleistung P_{det} die hinter der Lochblende detektiert werden kann (siehe Gleichung 6.5):

$$P_{det} = \int_0^b I(r) 2 \pi r dr \approx 2 P \frac{\pi b^2}{\pi w_2^2} \quad \text{Gl. 6.5}$$

Für das Signal $S(t)$ ergibt sich dann (durch Einsetzen von Gleichung 6.5 in Gleichung 2.4) Gleichung 6.6:

$$S(t) = \frac{w_2^2(0) - w_2^2(t)}{w_2^2(0)} \quad \text{Gl. 6.6}$$

wobei im Nenner $w_2(t)$ durch $w_2(0)$ ersetzt wurde, da die Änderung des Detektionslaserstrahlradius sehr klein ist. Man kann nun $w_2(t)$ bestimmen, indem man das sogenannte ABCD-Gesetz [HARRIS UND DOVICH, GUPTA] benutzt. Dadurch erhält man für $S(t)$ einen Ausdruck (Gleichung 6.7) in Abhängigkeit von der Brennweite der Thermischen Linse:

$$S(t) = \frac{z_1}{f_x(t)} + \frac{z_1}{f_y(t)} \quad \text{Gl. 6.7}$$

Die Brennweite f_x der Thermischen Linse ist (Gleichung 6.8):

$$\frac{1}{f_x} = - \frac{\partial n}{\partial T} \cdot l \cdot \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \right)_{y=0} \quad \text{Gl. 6.8}$$

Die Brennweite für f_y ist dazu analog. Für $S(t)$ für die kollineare Thermische Linse mit kontinuierlicher Anregung erhält man dann durch Einsetzen der Brennweiten in Gleichung 6.7 und der Temperaturverteilung (Anhang A, Gleichung 6.4) folgenden Ausdruck (Gleichung 6.9):

$$S(x, t) = \frac{8 \alpha P_{av} l z_1}{\pi \rho C_p} \left(\frac{\partial n}{\partial T} \right) \int_0^t \frac{[(1 + \cos \omega \tau)]}{[W^2 + 8 D (t - \tau)]^2} \left\{ 2 - \frac{4 [x - v_x (t - \tau)]^2}{[W^2 + 8 D (t - \tau)]} \right\} \cdot \exp \left\{ \frac{-2 [x - v_x (t - \tau)]^2}{[W^2 + 8 D (t - \tau)]} \right\} d\tau \quad \text{Gl. 6.9}$$

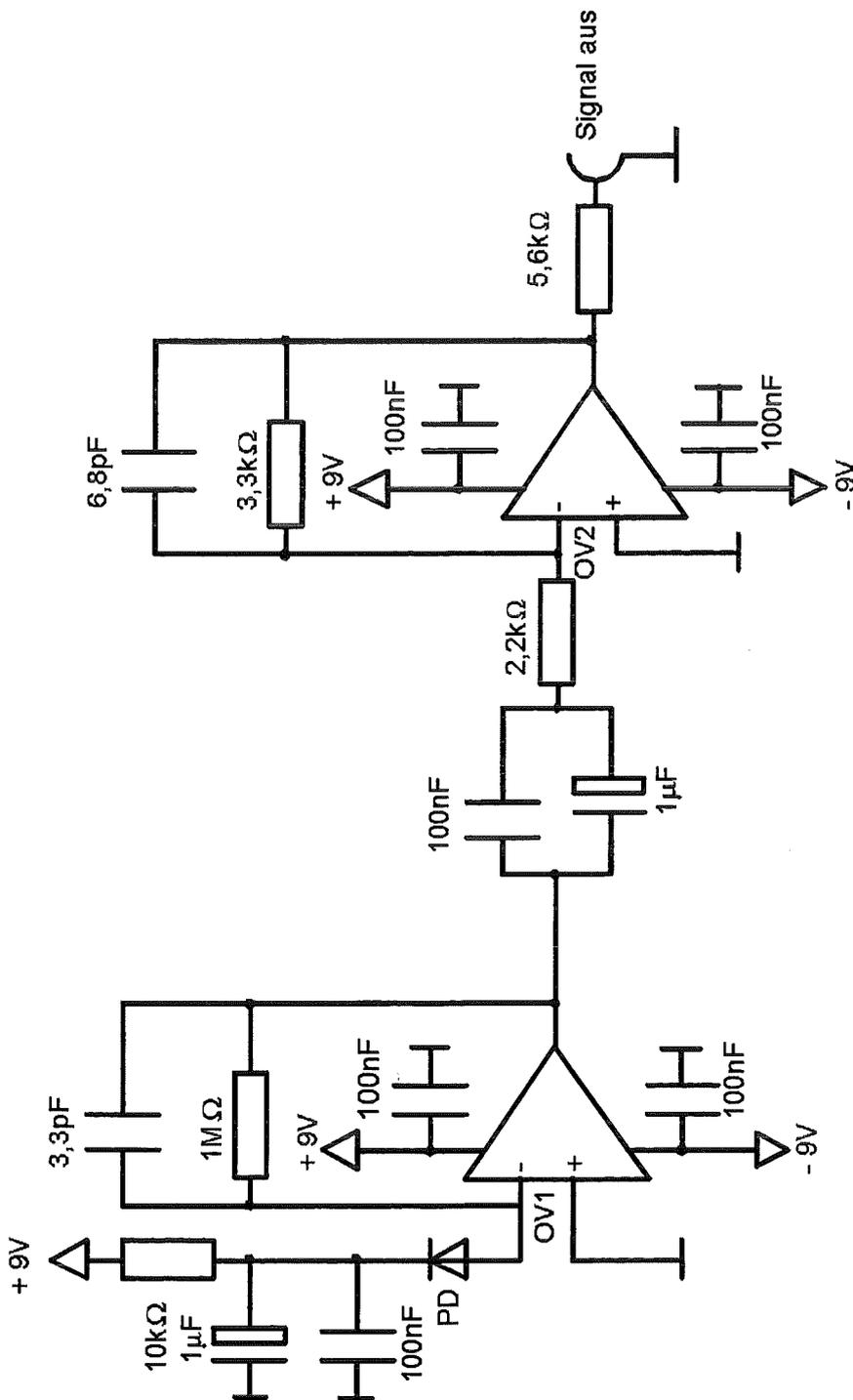
Mit dieser universellen Gleichung kann man $S(x, t)$ nur numerisch berechnen. Für den einfachen Fall, daß $v_x = 0$, $\omega = 0$ und $x = y = 0$ ist, läßt sich ein geschlossener Ausdruck für die Detektion der kontinuierlichen kollinearen Thermischen Linse angeben (Gleichung 6.10):

$$S(t) = \frac{2 \alpha P l z_1}{\pi \rho C_p D W^2} \left(\frac{\partial n}{\partial T} \right) \frac{1}{\left(1 + \frac{t_c}{2 t} \right)} \quad \text{Gl. 6.10}$$

mit t_c (Gleichung 6.11):

$$t_c = \frac{W^2}{4 D} = \frac{W^2 \rho C_p}{4 k} \quad \text{Gl. 6.11}$$

Anhang C: Schaltbild des Lichtleistungs - Spannungs - Verstärkers



PD: Hamamatsu, Modell S2386-45k

OV1: Burr Brown, Modell OPA626

OV2: Burr Brown, Modell OPA37

Anhang D: Kalibrierkurven

D.1: Kalibrierkurven für die isokratische Trennung der Dinitrophenolverbindungen

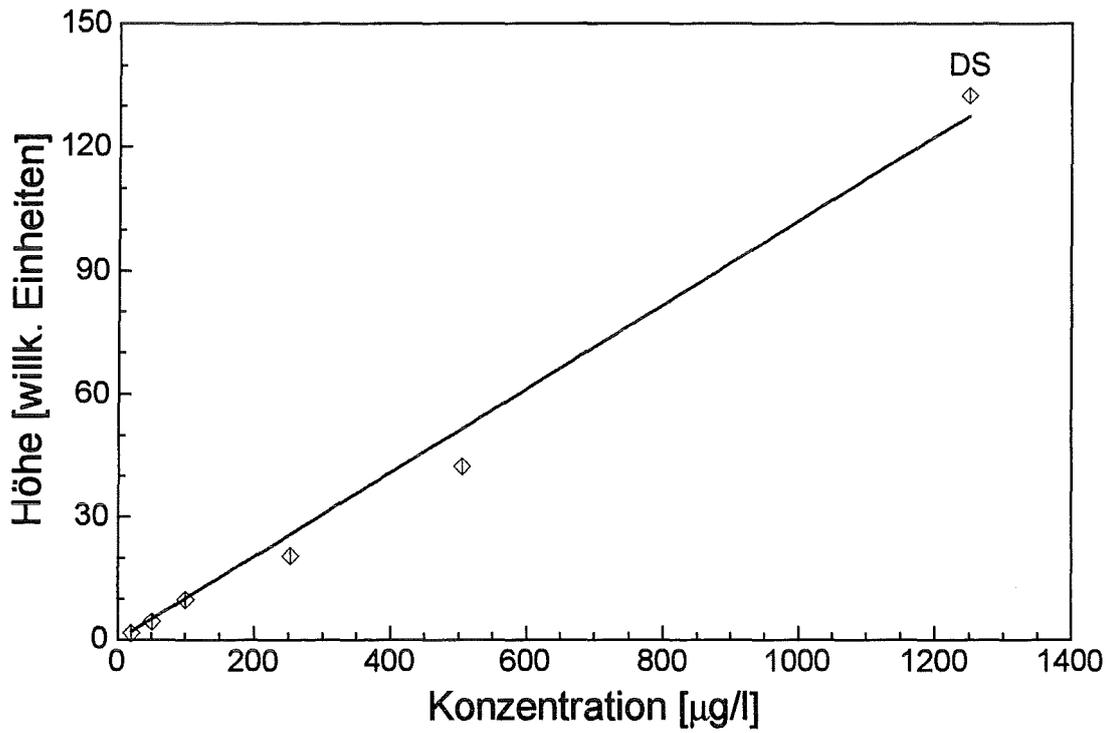


Abb. D.1: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

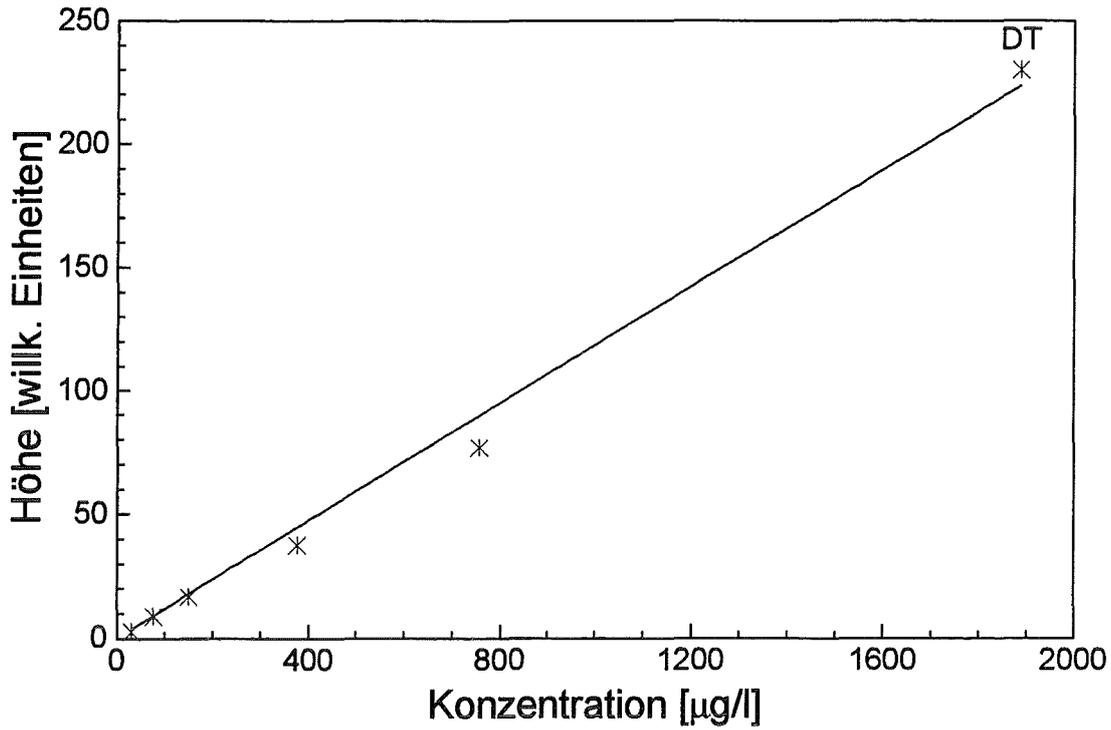


Abb. D.2: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

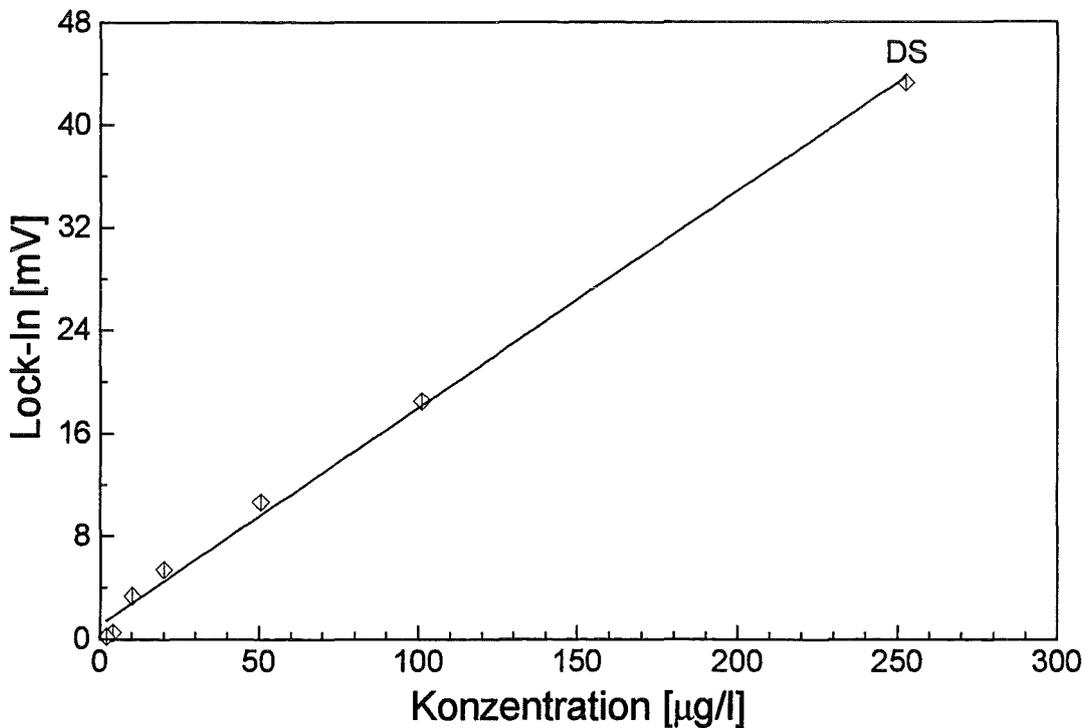


Abb. D.3: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

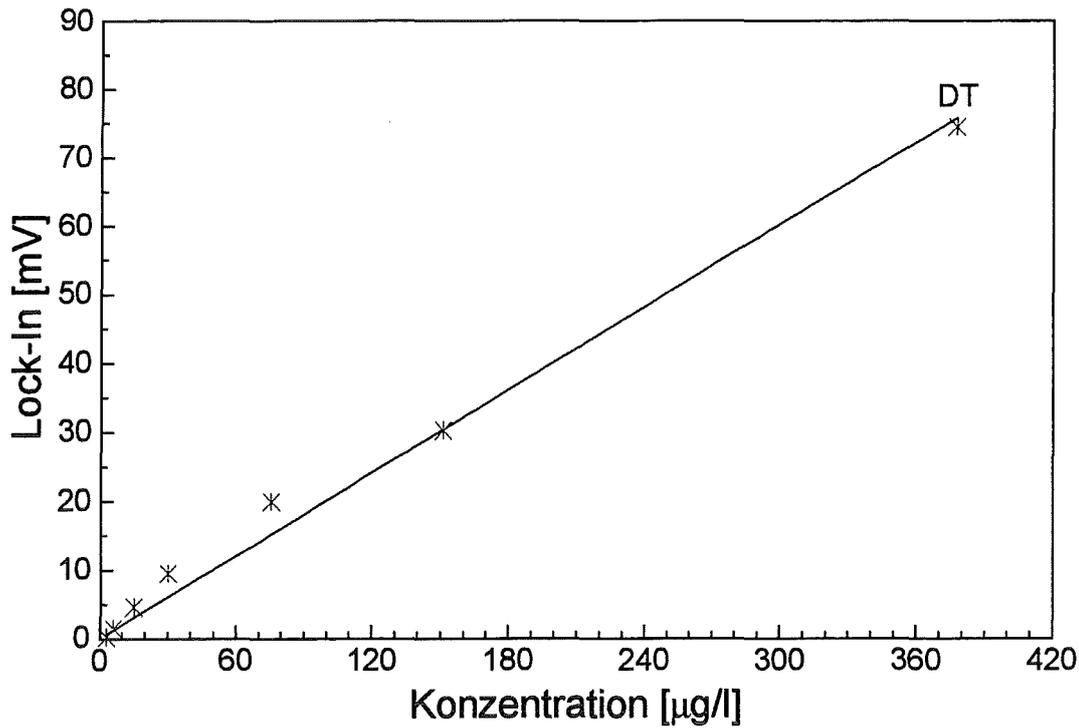


Abb. D.4: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

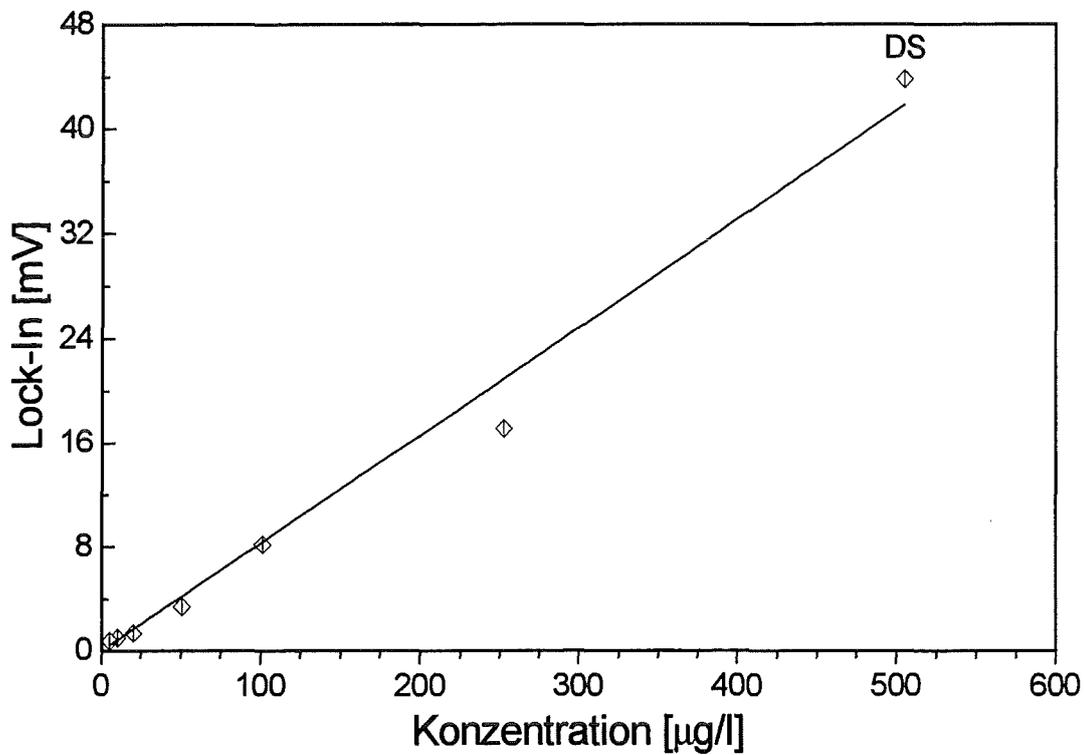


Abb. D.5: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

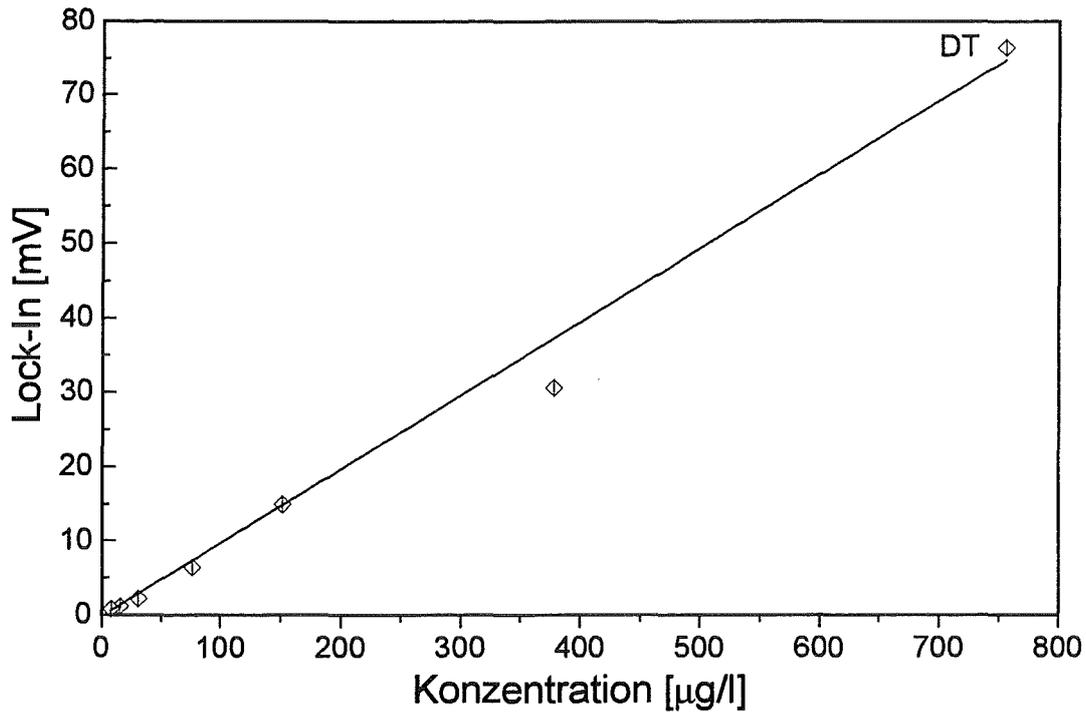


Abb. D.6: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

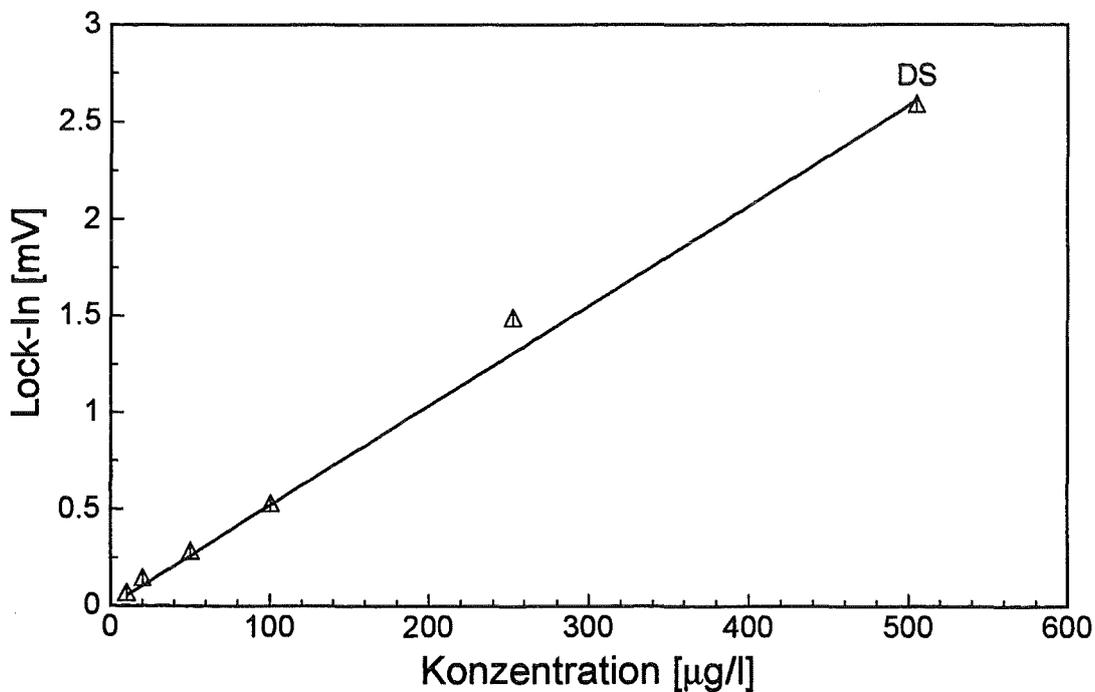


Abb. D.7: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

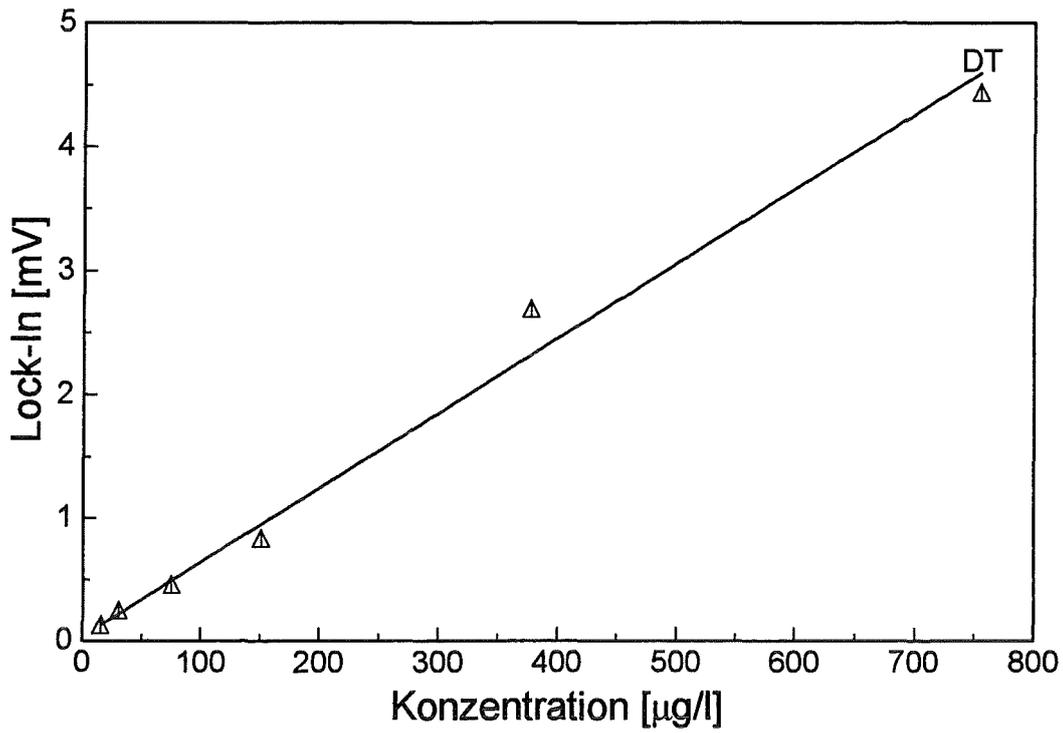


Abb. D.8: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

D.2: Kalibrierkurven für die Trennung der Dinitrophenolverbindungen mit einem linearen Gradienten

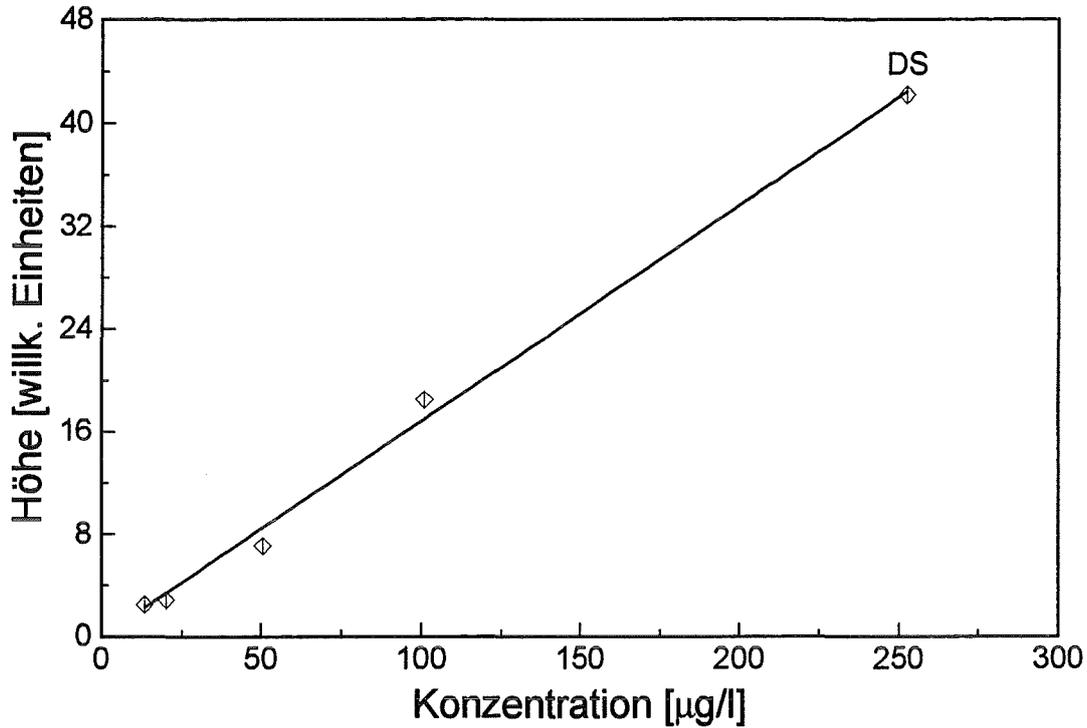


Abb. D.9: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

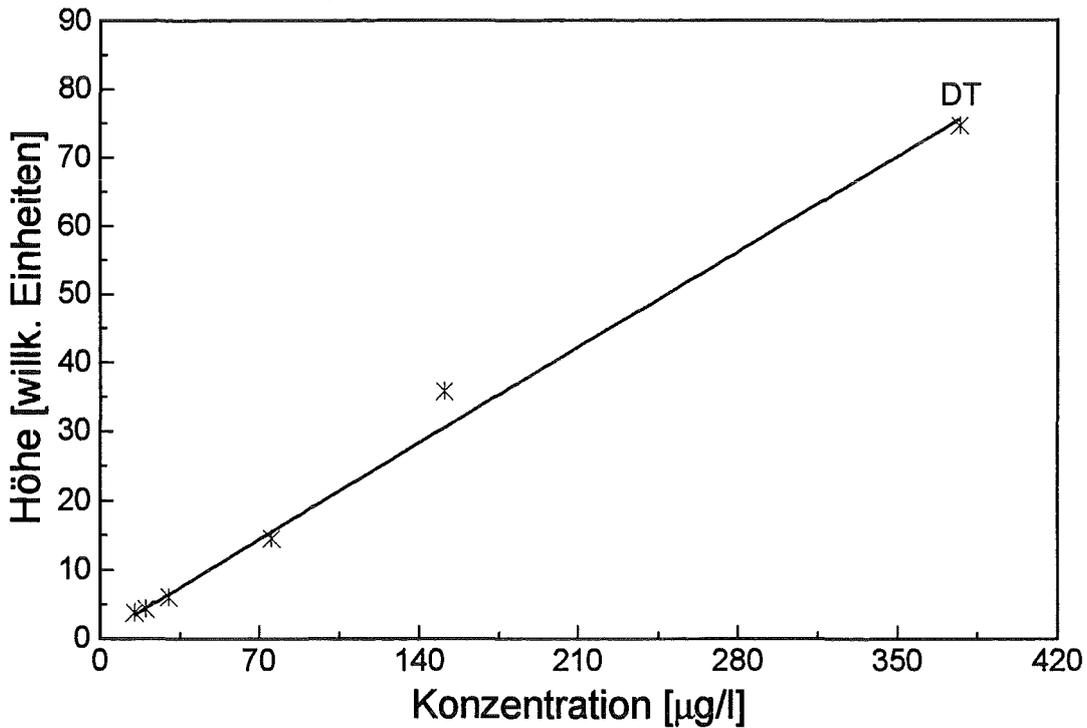


Abb. D.10: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

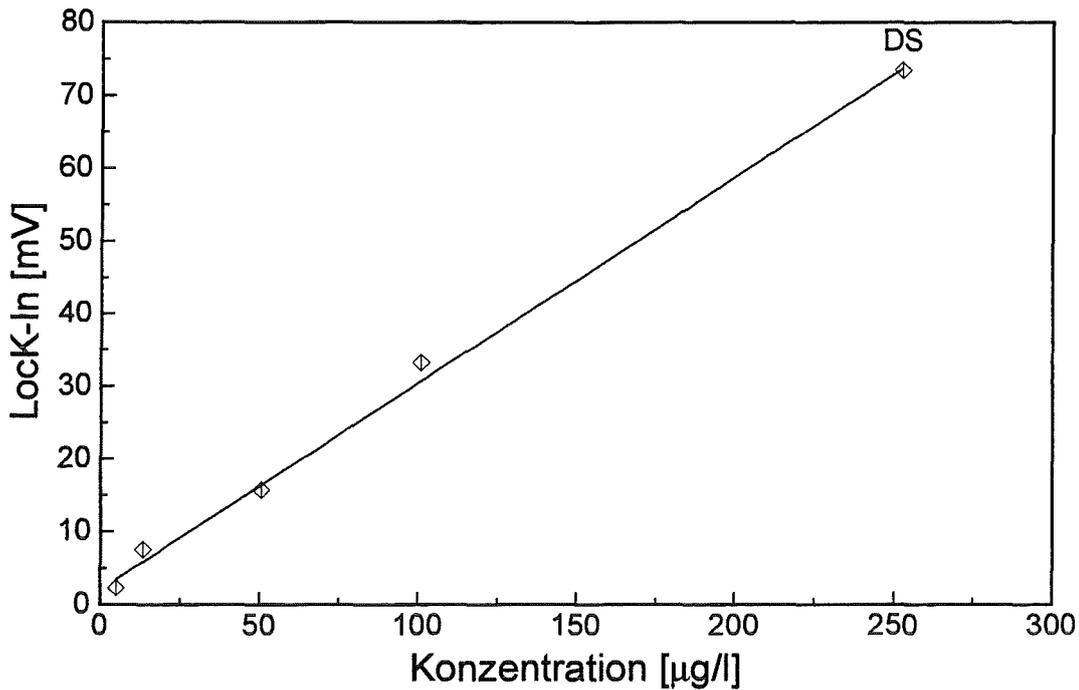


Abb. D.11: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

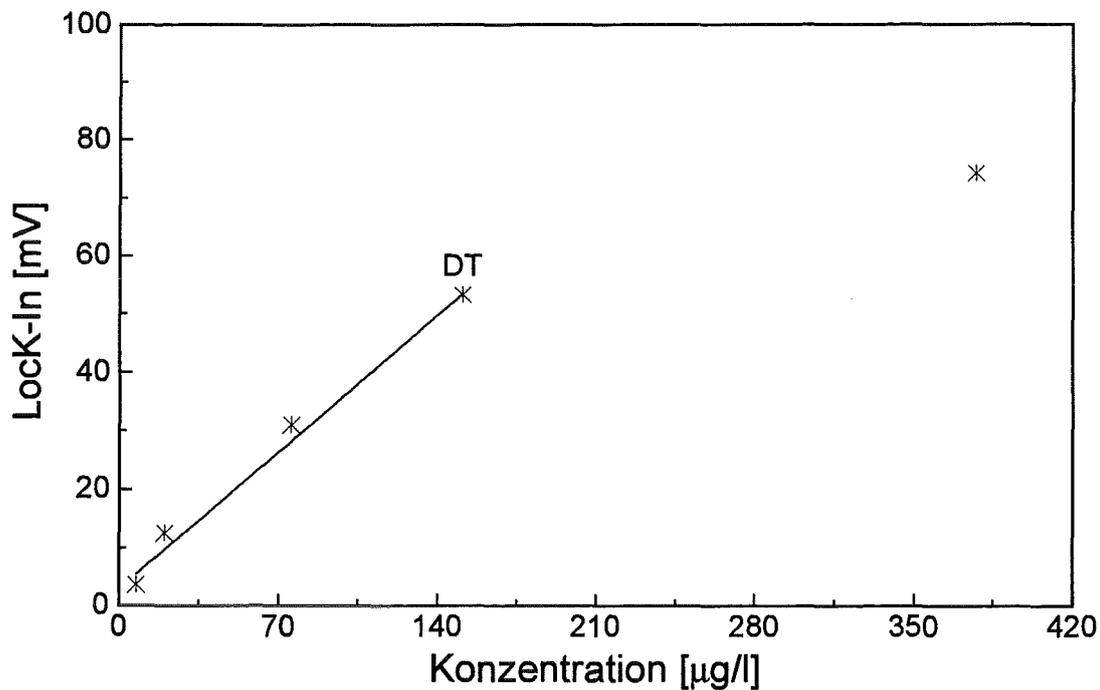


Abb. D.12: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min. (Der Meßwert bei 75 mV wurde als Ausreißer bewertet und nicht in die Auswertung mit einbezogen)

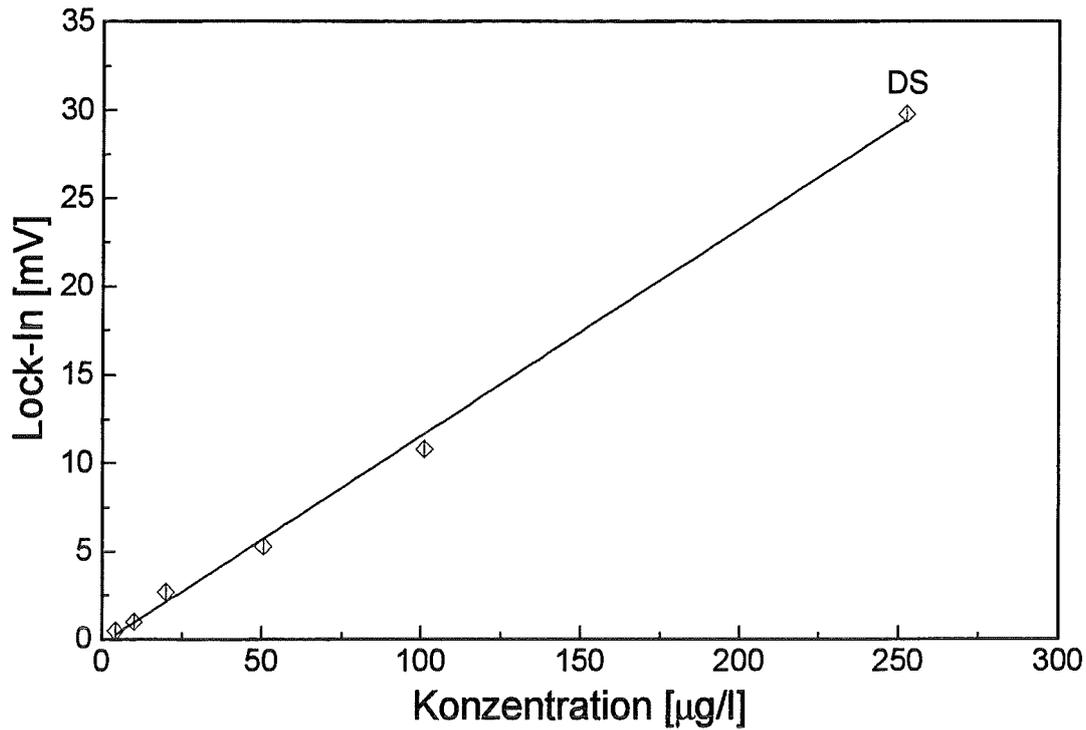


Abb. D.13: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

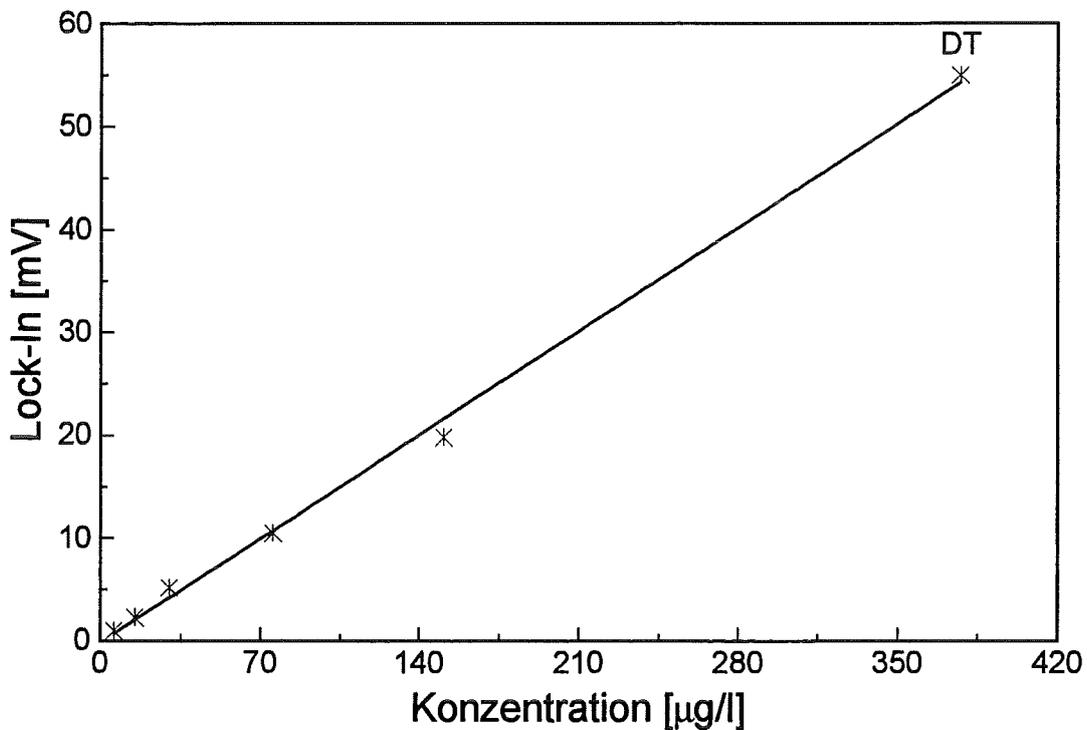


Abb. D.14: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit der kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

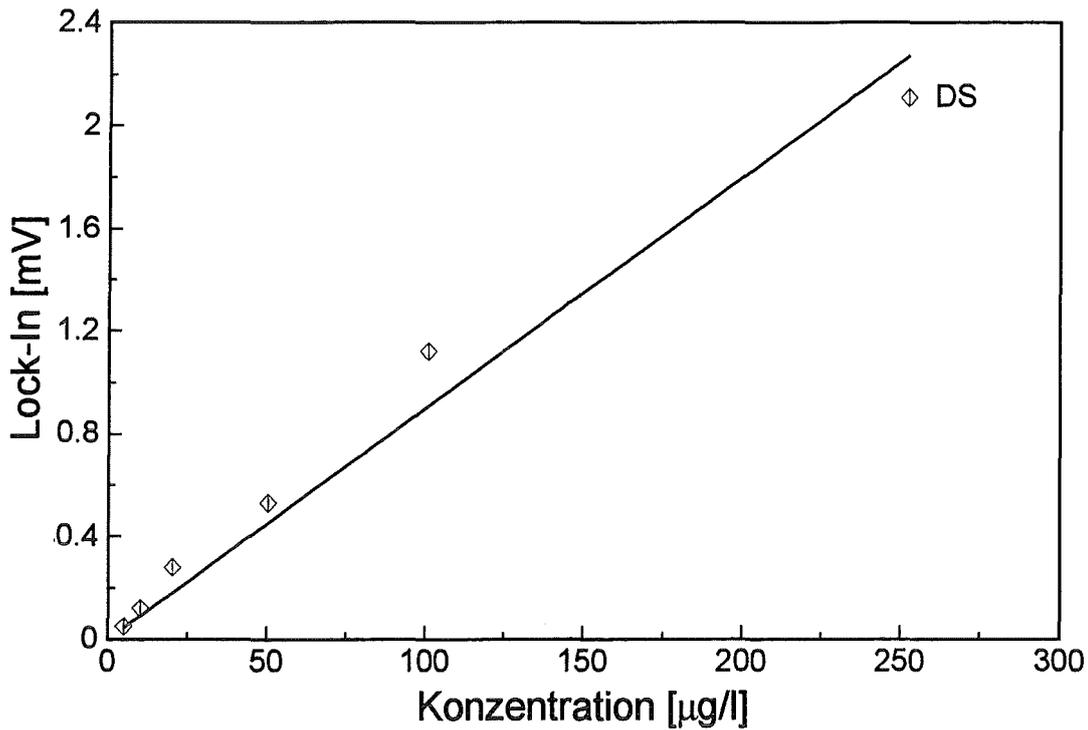


Abb. D.15: Kalibrierkurve für DS, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

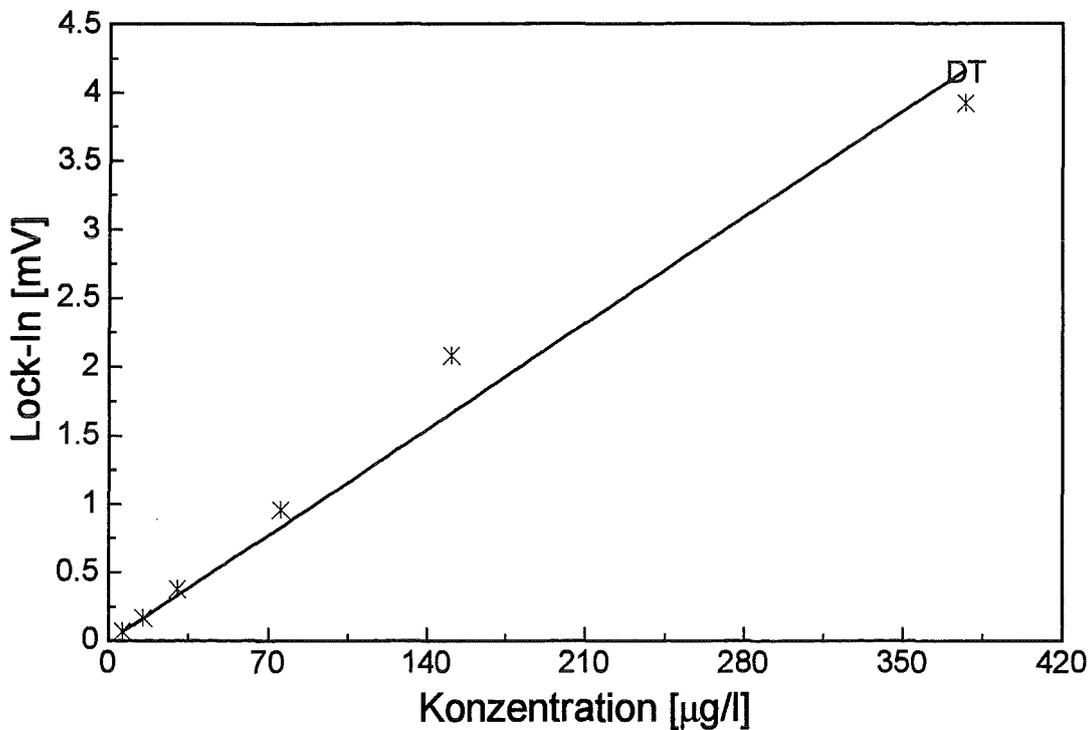


Abb. D.16: Kalibrierkurve für DT, detektiert mit der transversalen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten senkrecht zu den Laserstrahlen. Laserleistung: 150 mW, Chopperfrequenz: 20 Hz, Wellenlänge: 364 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

D.3: Kalibrierkurven für die isokratische Trennung der Harnstoffherbizide

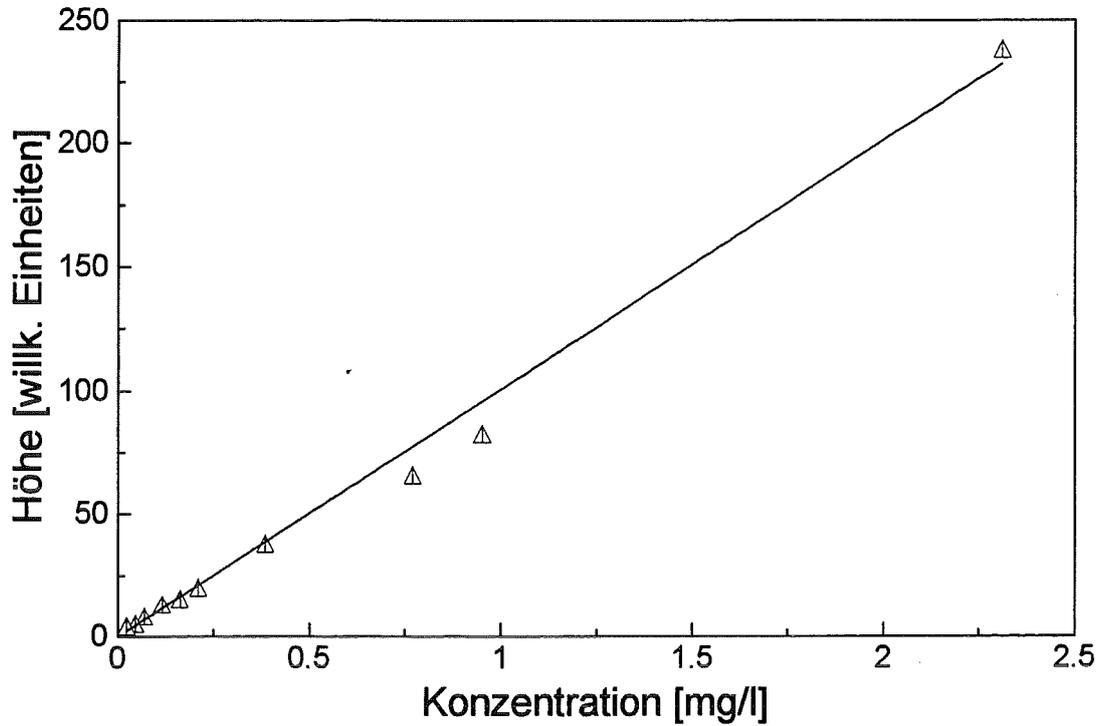


Abb. D.17: Kalibrierkurve für Ethidimuron, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

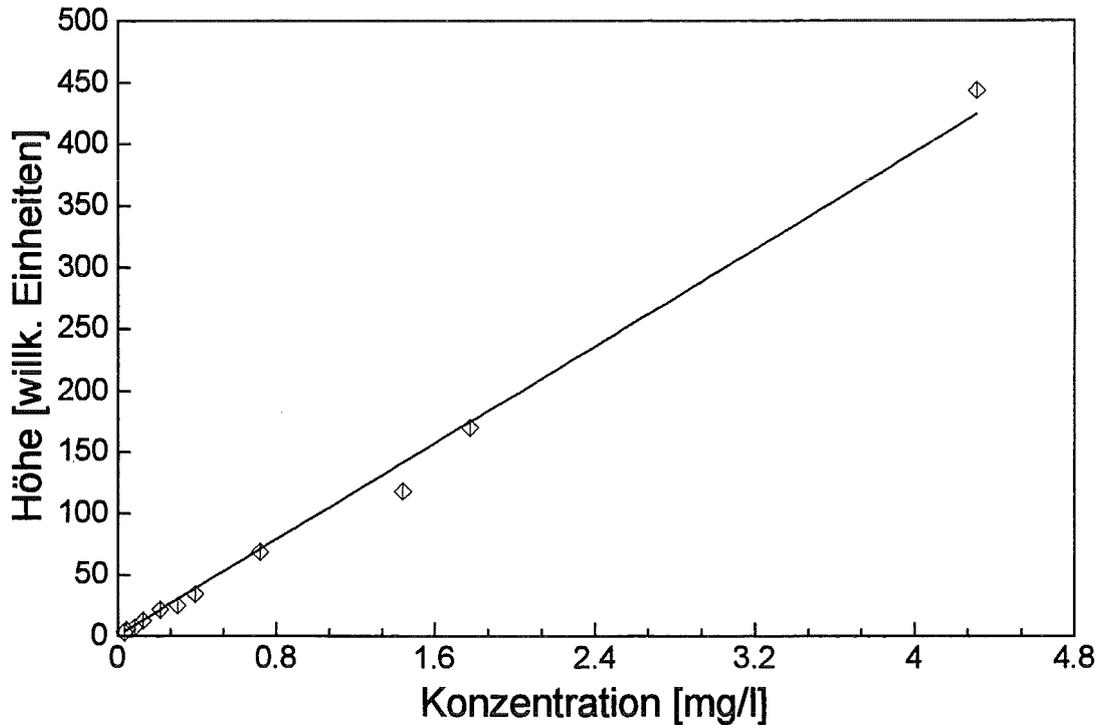


Abb. D.18: Kalibrierkurve für Thiazafuron, detektiert mit dem UV-VIS-Detektor. Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

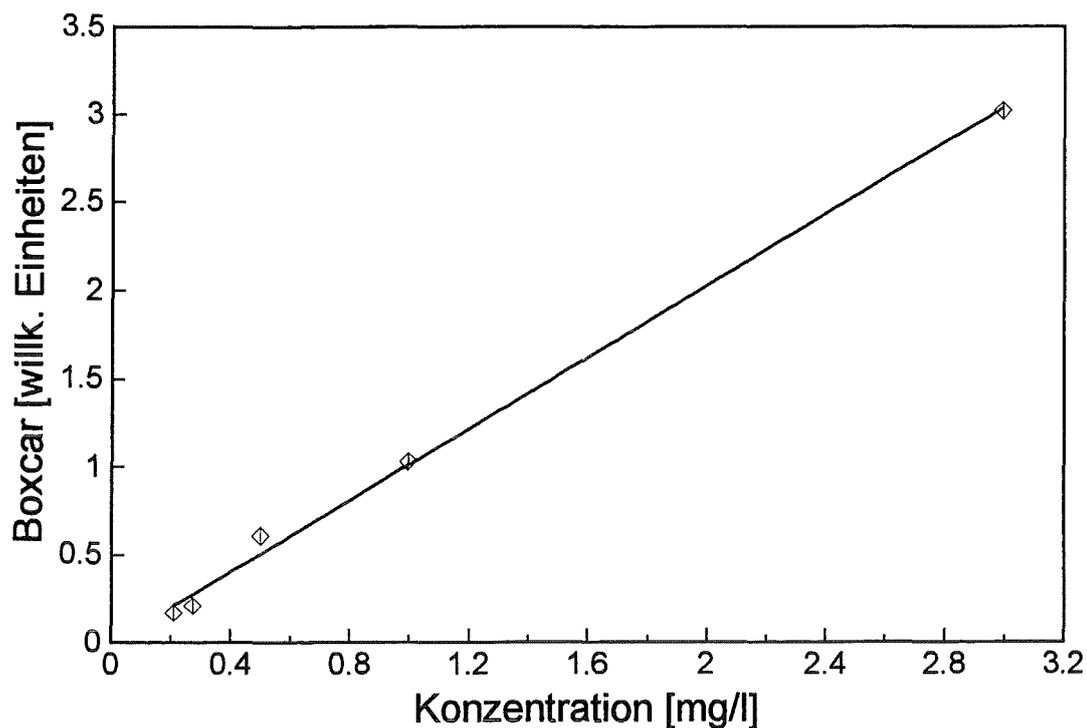


Abb. D.19: Kalibrierkurve für Ethidimuron, detektiert mit der gepulsten, kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserenergie: 380 μ J, Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

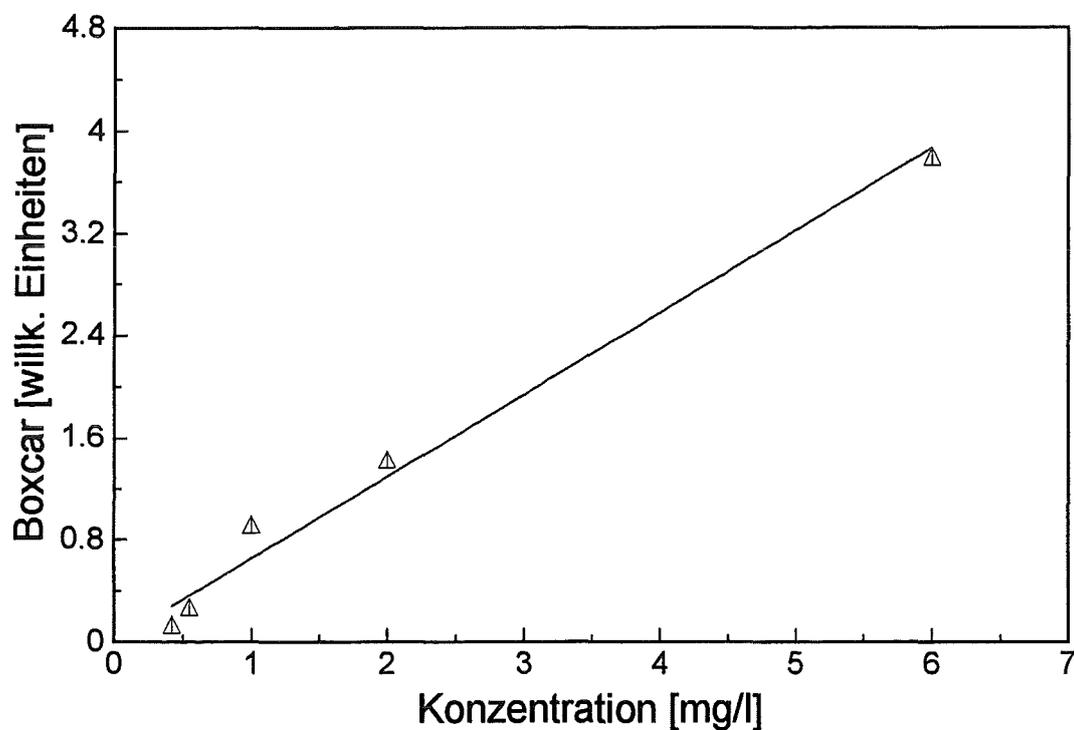


Abb. D.20: Kalibrierkurve für Thiazafuron, detektiert mit der gepulsten, kollinearen Thermischen Linse mit Durchflußrichtung des Analyten in Richtung der Laserstrahlen. Laserenergie: 380 μ J, Wellenlänge: 266 nm, Durchflußgeschwindigkeit: 1 ml/min

7 Literaturverzeichnis

ADELHELM, K., *Laserinduzierte Photoakustische Spektroskopie zum Nachweis organischer Schadstoffe in Lösungen*, Dissertation, Universität Karlsruhe 1992

AHUJA, S., *Trace and Ultratrace Analysis by HPLC*, John Wiley & Sons, Chichester 1991

BARROW, G. M., *Physikalische Chemie*, Vieweg, Wien, Braunschweig 1984

BERTHOUD, T., DELORME, N., MAUCHIEN, P., "Beam Geometry Optimization in Dual-Beam Thermal Lensing Spectrometry", *Anal. Chem.* 57 (1985), 1216

BOCKRIS, J. O'M., REDDY, A. K. N., *Modern Electrochemistry*, Plenum Press, New York 1977

BOHNERT, B., *Transversale und kollineare Photothermische Ablenkungsspektroskopie zur Untersuchung wäßriger Systeme anorganischer und umweltrelevanter organischer Schadstoffe*, Dissertation, Universität Karlsruhe 1992

BÜHLER, W., FAUBEL, W., ACHE, H. J., *Kapillarzonenelektrophorese mit direkter und indirekter UV-Detektion*, Wissenschaftliche Berichte Forschungszentrum Karlsruhe, FZKA 5678, Karlsruhe 1995

BUFFET, C. E., MORRIS, M. D., "Thermal Lens Detection for Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 54 (1982), 1824

BUFFET, C. E., MORRIS, M. D., "Microcell Thermal Lens Detector for Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 55 (1983), 376

BURTON, D. E., SEPANIAK, M. J., "Evaluation of the Use of Various Surfactants in Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography", *Journal of Chromatographic Science* 25 (1987), 514

CARTER, A. C., HARRIS, J. M., "Comparison of models describing the thermal lens effect", *Anal. Chem.* 23 (1984, A), 476

CARTER, A. C., HARRIS, J. M., "Thermal Lens Absorption Measurements on Small Volume Samples", *Anal. Chem.* 56 (1984), 922

CESSNA, A. J., GROVER, J., "Spectrophotometric determination of dissociation constants of selected acidic herbicides", *J. Agric. Food Chem.* 26 (1978), 289

DAVIS, C. C., PETUCHOWSKI, S. J., "Phase Fluctuation Optical Heterodyne Spectroscopy of Gases", *Appl. Opt.* 20 (1981), 2539

DELORME, N., "Rare-Earth Trace Determination by Simultaneous Laser-Induced Fluorescence and Thermal Spectroscopy after High Performance Liquid Chromatography Separation", *Radiochimica Acta* 52/53 (1991), 105

DOERFFEL, K., *Statistik in der analytischen Chemie*, VEB Verlag, Leipzig 1987

DOVICH, N. J., "Thermo-optical spectrophotometries in analytical chemistry", *Crit. Rev. Anal. Chem.* 17 (1987), 357

DOVICH, N. J., HARRIS, J. M., "Thermal Lens Calorimetry for Flowing Samples", *Anal. Chem.* 53 (1981), 689

DOVICH, H. J., NOLAN, T. G., WEIMAR, W. A., "Theory for Laser-Induced Photothermal Refraction", *Anal. Chem.* 56 (1984), 1700

DOVICH, H. J., ZARRIN, F., NOLAN, T. G., BORNHOP, D. J., "Laser detectors for capillary liquid chromatography", *Spectrochim. Acta. Part B* 43B (1988), 639

DÜBEL, O., FAUBEL, W., ACHE, H. J., *Photothermische Oberflächenuntersuchung von Feststoffen*, Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Bericht KfK 5202, Karlsruhe 1993

ENGELHARDT, H., BECK, W., SCHMITT, T., *Kapillarelektrophorese*, Vieweg, Braunschweig 1994

FAUBEL, W., SCHULZ, T., SEIDEL, B. S., STEINLE, E., ACHE, H. J., "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), C7-531

FANG, H. L., SWOFFORD, R. L., *The thermal lens in absorption spectroscopy, in Ultrasensitive Laserspectroscopy*, Hrsg.: Klinger, D. S., Academic Press, New York, London 1983

GLÖCKNER, G., *Polymercharakterisierung durch Flüssigchromatographie*, Alfred Hüttig, Heidelberg 1982

GOTTWALD, W., *RP-HPLC für Anwender*, VCH, Weinheim 1993

GROSSMAN, P. D., LAUER, H. H., MORING, S. E., MEAD, D. E., OLDHAM, M. F., NICKEL, J. H., GOUDBERG, J. R. P., KREVER, A., RANSOM, D. H., COLBURN, J. C., "A practical introduction to free solution capillary electrophoresis of proteins and peptides", *Amer. Bio. Lab. Feb.* (1990), 35

GUPTA, R., *Principles of photothermal spectroscopy in fluids*, in *Progress in photothermal and photoacoustic science and technology*, Band 1, Hrsg.: Mandelis, A., Elsevier, New York, Amsterdam 1992

HARRIS J. M., DOVICH, N. J., "Thermal Lens Calorimetry," *Analytical Chemistry* 52 (1980), 695A

HARROLD, M. P., WOJTUSIK, M. J., RIVIELLO, J., HENSON, P., "Parameters influencing separation and detection of anions by capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography* 640 (1993), 463

HEIGER, D. N., *High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction*, Hewlett-Packard Company, Publication Number 12-5091-6199E, 1992

HEIGER, D., WEINBERGER, R., "Determination of Small Ions by Capillary Zone Electrophoresis with Indirect Photometric Detection", Hewlett Packard Company, Publication Number 12-5963-1138E, 1994

HENSCHEN, A., HUPE, K.P., LOTTSPEICH, F., VOELTER, W., *High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry*, VCH, Weinheim 1985

HESS, P., *Principles of Photoacoustic and Photothermal Analysis, Photoacoustic*, in *Photothermal and Photochemical Processes in Gases*, Hrsg.: Hess, P., Top. Curr. Phys., Vol. 46, Springer-Verlag, Heidelberg 1989

HP, Hewlett Packard Firmenschrift über die HP Serie 1050 Pumpensysteme

ISRAEL, H., "Signal aus dem Rauschen", *Funkschau* 8 (1981), 67

JANDIK, P., BONN, G., *Capillary Elektrophoresis of Small Molecules and Ions*, VCH, New York 1993

JORGENSON, J. W., LUKACS, K. D., *J. Chromatogr.* 218 (1981), 209

KHUEN, Q. E., *Kolloid- und Farbstoffuntersuchungen mit der transversalen photothermischen Ablenkung*, Dissertation, Universität Karlsruhe 1994

KLESSINGER, M., MICHL, J., *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*, VCH, Weinheim 1989

KORTUM, G., *Lehrbuch der Elektrochemie*, VCH, Weinheim 1972

KRAUB, G.-J., KRAUB, G., *Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Serva Praxishefte, Band 2, Heidelberg 1987

KUHR, W. G., MONNIG, C. A., "Fundamental Reviews: Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.* 64 (1992), 389

LEACH, R. A., HARRIS, J. M., "Thermal Lens Calorimetry application to chromatographic detection", *Journal of Chromatography* 218 (1981), 15

MACRAE, R., *HPLC in Food Analysis*, Academic Press, London 1988

MALMSTADT, H. V., ENKE, C. G., CROUCH, S. R., *Electronic measurements for scientists*, W. A. Benjamin, Menlo Park, California 1994

MAZZEO, J. R., KRULL, I. S., "Coated capillaries and additives for the separation of proteins by capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focussing", *BioTechniques* 10 (1991), 638

MEADE, M. L., "Advances in lock-in amplifiers", *J. Phys. E: Sci.* 15 (1982), 395

MEYER, V. R., *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*, Salle+Sauerländer, Frankfurt 1992

MIKKERS, F. E. P., EVERAERTS, F. M., VERHEGGEN, T. P. E. M., *J. Chromatogr.* 169 (1979), 11

MONSON, B., VYAS, R., GUPTA, R., "Pulsed and cw photothermal phase shift spectroscopy in fluid medium: theory", *Appl. Opt.* 28 (1989), 2554

NAIR, J. B., IZZO, C. G., "Anion screening for drugs and intermediates by capillary ion electrophoresis", *Journal of Chromatography* 640 (1993), 445

NICKOLAISEN, S. L., BIALKOWSKI, S. E., "Pulsed Laser Thermal Lens Spectrophotometry for Flowing Liquid Detection", *Anal. Chem.* 58 (1986), 215

NOLAN, T. G., WEIMER, W. A., DOVICH, N. J., "Laser-Induced Photothermal Refraction for Small Volume Absorbance Determination", *Anal. Chem.* 56 (1984), 1704

NOLAN, T. G., BORNHOP, D. J., DOVICH, N. J., "Crossed-Beam Thermal-Lens Detection for 0,25 mm diameter microbore liquid chromatography", *Journal of Chromatography* 384 (1987), 189

ONG, C. P., NG, C. L., CHONG, N. C., LEE, H. K., LI, S. F. Y., "Retention of eleven Priority phenols using micellar elektrokinetic chromatography", *Journal of Chromatography* 516 (1990), 263

OTSUKA, K., TERABE, S., ANDO, T., "Electrokinetic Chromatography with Micellar Solutions Retention Behaviour and Separation of Chlorinated Phenols", *Journal of Chromatography* 348 (1985), 39

PADADOYANNIS, I. N., *HPLC in Clinical Chemistry*, in *Chromatographic Science*, Band 54, Marcel Dekker Inc., New York, Basel 1990

PANG, T.-K. J., MORRIS, M. D., "Liquid chromatography detection at the second harmonic of the modulated thermal lens", *Anal. Chem.* 56 (1990), 1467

PATONAY, G., *HPLC Detection: Newer Methods*, VCH, Weinheim, New York 1992

POWER, J. F., "Pulsed mode thermal lens effect detection in the near field via thermally induced probe beam spatial phase modulation: a theory", *Appl. Opt.* 29 (1990), 52

POWER, J. F., SALIN, E. D., "Mode-mismatched laser induced thermal lens effect detection via spatial fourier analysis of beam profiles", *Anal. Chem.* 60 (1988), 838

- PRIBYL, J., HERZEL, F., "Flüssigchromatographische Parameter herbizider Wirkstoffgruppen I. Harnstoffherbizide", *Journal of Chromatography* 125 (1976), 487
- PRIBYL, J., HERZEL, F., "Flüssigchromatographische Parameter herbizider Wirkstoffgruppen III. Harnstoffherbizide-Ergänzung", *Journal of Chromatography* 166 (1978), 272
- ROBINSON, R. A., "Dissociation constants of some substituted nitrophenols in aqueous solution at 25°C", *J. Research* 71A (1967), 385
- ROMANO, J. P., JANDIK, P., JONES, W. R., JACKSON, P. E., "Optimization of inorganic capillary elektroforese for the analysis of anionic solutes in real samples", *Journal of Chromatography* 546 (1991), 411
- ROMANO, J. P., KROL, J., "Capillary ion elektroforese, an environmental method for the determination of anions in water", *Journal of Chromatography* 640 (1993), 403
- ROSE, A., VYAS, R., GUPTA, R., "Pulsed photothermal deflection spectroscopy in a flowing medium: a quantitative investigation", *Applied Optics* 25 (1986), 4626
- ROSEBOOM, H., BERKHOFF, C. J., WAMMES, J. II., WEGMAN, R. C. C., "Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography of Nitrophenols", *Journal of Chromatography* 208 (1981, A), 331
- ROSEBOOM, H., WAMMES, J. II., WEGMAN, R. C. C., "Determination of Nitrophenol Derivation in various Crops by Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography", *Analytica Chimica Acta* 13 (1981, B), 195
- SALNICK, A., FAUBEL, W., KLEWE-NEBENIUS, H., VENDL, A., ACHE, H. J., "Photothermal Studies of Copper Patina formed in the Atmosphere", *Corr. Science* 37 (1995), 741
- SCHIKARSKI, A., *Trennung von Pestiziden mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Untersuchungen zu ihrer Detektion mit photothermischen Methoden*, Diplomarbeit, Universität Karlsruhe 1991
- SCHMIDT, W., *Optische Spektroskopie*, VCH, Weinheim 1994
- SCHULZ, T., S., *Die Thermische Linse als Detektorsystem für die Spurenanalyse in flüssigen Systemen*, Dissertation, Universität Karlsruhe 1994

SCHWEDT, G., *Taschenatlas der Analytik*, Thieme, Stuttgart 1992

SCHWEDT, G., *Analytische Chemie*, Thieme, Stuttgart 1995

SEIDEL, B., S., FAUBEL, W., ACHE, H. J., *Trennung von Pestiziden mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie sowie ihre spektralphotometrische und elektrochemische Detektion*, Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Bericht KfK 5182, Karlsruhe 1993

SEIDEL, B., S., *Die Photothermische Interferometrie als miniaturisiertes Detektorsystem für Schadstoffe in Flüssigkeiten und Gasen*, Dissertation, Universität Karlsruhe 1995

SEPANIAK, M. J., VARGO, J. D., KETTLER, C. N., MASKARINEC, M. P., "Open tubular liquid chromatography with thermal lens detection", *Anal. Chem.* 56 (1984), 1252

SHELDON, S. J., KNIGHT, L. V., THORNE, J. M., "Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model", *Applied Optics* 21 (1982), 1663

SIDWELL, J. A., RUZICKA, J. H. A., "The Determination of Substituted Phenylurea Herbicides and Their Impurities in Technical and Formulated Products by Use of Liquid Chromatography", *Analyst* 101 (1976), 111

SONTAG, H., TAM, A. C., "Time-resolved flow-velocity and concentration measurements using a traveling thermal lens", *Optics Letters* 10 (1985), 436

STAHR, B., *Quantitative und chelatometrische Bestimmung von Ni²⁺ sowie Np⁴⁺, NpO₂²⁺ in wässrigen Lösungen mittels der Laserinduzierten Gepulsten Photoakustischen Spektroskopie*, Dissertation Universität Karlsruhe 1992

SZEPESI, G., *HPLC in Pharmaceutical Analysis*, Vol. I und II, in *CRC Handbook of Chromatography*, CRC Press, Inc, Boca Raton 1990

TAM, A. C., "Application of photoacoustic sensing techniques", *Rev. Mod. Phys.* 58 (1986), 381

TAYLOR, J. R., *Fehleranalyse*, VCH, Weinheim 1988

TERABE, S., OTSUGA, K., ICHIKAWA, K., TSUCHIYA, A., ANDO, T., "Elektrokinetic Separation with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries", *Anal. Chem.* 56 (1984), 111

THIER, H.-P., FREHSE, H., *Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln*, Thieme, Stuttgart 1986

TRAN, C. D., "Simultaneous Enhancement of Fluorescence and Thermal Lensing by Reversed Micelles", *Anal. Chem.* 60 (1988), 183

VINDEVOGEL, J., SANDRA, P., *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, Hüthig, Heidelberg 1992

VYAS, R., MONSON, B., NIE, Y.-X., GUPTA, R., "Continuous wave photothermal deflection spectroscopy in a flowing medium", *Applied Optics* 27 (1988), 3914

VYAS, R., GUPTA, R., "Photothermal lensing spectroscopy in a flowing medium: theory", *Applied Optics* 27 (1988), 470

WALDRON, K., C., DOVICH, N., J., "Sub-Femtomole Determination of Phenylthiohydantion-Amino-Acids: Capillary Electrophoresis and Thermo-optical Detection", *Anal. Chem.* 64 (1992), 1396

WATERS, *Applicationen der Firma Waters*, Eschborn

WEIMAR, W. A., DOVICH, N. J., "Optimization of Photothermal Refraction for Flowing Liquid Samples", *Applied Spectroscopy* 39 (1985, A), 1009

WEIMAR, W. A., DOVICH, N. J., "Time-resolved crossed-beam thermal lens measurements as a noninvasive probe of flow velocity", *Applied Optics* 24 (1985, B), 2981

WEIMAR, W. A., DOVICH, N. J., "Time-resolved thermal lens measurement in flowing samples", *Applied Optics* 57 (1985, C), 2437

XU, M., TRAN, C. D., "Thermal Lens-Circular Dichroism Detector for High-Performance Liquid Chromatography", *Anal. Chem.* 62 (1990), 2467

YANG, Y., HALL, S. C., DE LA CRUZ, M. S., "Pump/probe thermal lens spectrometry with oppositely propagated beams for liquid chromatography", *Anal. Chem.* 58 (1986), 758

YANG, Y., HO, T. V., "A Comparison of Photothermal Deflection and Thermal Lensing Spectroscopy for Liquid Chromatographic Detection", *Applied Spectroscopy* 41 (1987), 583