

Beiträge zur Miniaturisierung der Fliessinjektionsanalyse und der Kapillarelektrophorese

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Andrea Rainelli

aus Blauen, Baselland

Basel 2005

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag von

Prof. Dr. Ernő Pretsch

und

Prof. Dr. Peter Hauser

Basel, den 08.02.2005

Prof. Dr. Hans-Jakob Wirz

Dekan

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung von drei Projekten. Das erste Projekt betrachtete die Automatisierung des Injektionssystems eines Fliessinjektionsanalyse-Systems im Mikromassstab (μ FIA), welches ohne die teuren lithographischen Prozesse hergestellt wurde. Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern wurden alle Teile der Injektion durch einen Computer gesteuert. Die spektroskopische Bestimmung von Analyten wurde durch den Ersatz der gewöhnlichen Teile des UV-Vis Detektors, durch eine Leuchtdiode, optische Fasern und Photodioden vereinfacht.

Im zweiten Projekt wurde ein selbstgebautes tragbares Kapillarelektrophoresegerät mit einer einfachen Absorptionzelle ohne fokussierende optische Teile getestet. Dazu wurden zusätzlich die erste UV-Leuchtdiode und die erste batteriebetriebene UV-Lichtquelle verwendet, die neu auf den Markt gekommen sind.

Das dritte Projekt bestand aus einer billigen und flexibleren Alternative zu dem elektrophoretischen Chip mit der Benutzung einer konventionellen kurzen Kapillare. Es wurde ein völlig automatisches Injektionssystem unter Verwendung von einem Kreuzteil, zwei Spritzenpumpen und einem Ventil entwickelt. Zur Charakterisierung des neuen Injektors wurden verschiedene Grundexperimente mit einem kommerziellen UV-Detektor durchgeführt. Verschiedene CE Parameter wurden im Vergleich zu der Bodenzahl gemessen. Ein „in house“ gebauter kontaktloser Leitfähigkeitsdetektor wurde dazu mit dem neuen Injektionssystem für eine schnelle Trennung getestet. Am Ende wurden Alkali- und Erdalkalimetalle, anorganische Anionen, Kohlenhydrate, Kohlenhydrate und Aminosäure sowie Arzneimittel mit dem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor gemessen.

Danksagung

Danken möchte ich an erster Stelle meinen Eltern, die mir immer Rat und Unterstützung gegeben haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Hauser, mit dem ich eine gute Zusammenarbeit hatte. Ich danke ihm für die kollegiale Betreuung, für die Freiheit, die er mir bei meiner Arbeit gelassen hat und für die interessanten Diskussionen auch ausserhalb des Dissertationsthemas.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. E. Pretsch für die Begutachtung dieser Arbeit als Korreferent.

Allen Arbeitsgruppenmitgliedern danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die überaus gute Zusammenarbeit. Vielen Dank geht daher an René Knake, Patrick Jacquinet, Benedikt Galliker, Maria Schwarz, Karin Schweizer, Renato Guchardi, Jatisai Tanyanyiwa, Alexandra Stettler, Pavel Kuban, Eva Maria Abad Villar, Xiao-Yang Gong, Qi-Jin Wan und Marketa Vlckova.

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn A. Koller von der mechanischen Werkstatt für die Durchführung aller Arbeiten mit Plexiglas und dem Aufbau diverser Gehäuse.

Des Weiteren danke ich allen Angestellten und Mitarbeitern vom Institut der anorganischen Chemie für ihre Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit.

Dem Schweizerischen Nationalfond danke ich für die finanzielle Unterstützung

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn A. Klemm für die Korrektur des Manuskripts.

Zum Allerletzten möchte ich mich bei meiner Partnerin Romana für ihren Rat, ihre Unterstützung und speziell für ihre Geduld in der anstrengenden Korrektur des Manuskripts bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil.....	5
2.1	Fliessinjektionsanalyse (FIA)	5
2.1.1	Historischer Überblick und Prinzip	5
2.1.2	Spezifische Bauteile des selbstgebauten μ -FIA-Systems	7
2.1.2.1	Spritzenpumpen und Membranpumpen.....	7
2.1.2.2	Hydrodynamische Injektion.....	7
2.1.3	Laminare Strömung	8
2.1.4	Dispersion: Konvektions- und Diffusions-Prozesse	10
2.1.5	Dispersionskoeffizient	11
2.2	Kapillarelektrophorese (CE).....	13
2.2.1	Historischer Überblick.....	13
2.2.2	Physikalische Grundlagen und Trennprinzipien der Kapillarelektrophorese.....	16
2.2.2.1	Elektrophoretische Mobilität	18
2.2.2.2	Elektroosmotischer Fluss (EOF).....	19
2.2.2.3	Messung der elektrophoretischen Mobilität	21
2.2.2.4	Beeinflussung des EOF.....	22
2.2.2.5	Bandenverbreiterung.....	23
2.2.3	Probenaufgabe	26
2.2.4	Detektion.....	27
2.2.4.1	UV-Vis -Detektion.....	28
2.2.4.2	Leitfähigkeitsdetektion	29
2.2.4.3	Andere Detektionsmethoden	34
•	Fluoreszenz	34
•	Amperometrie	34
•	Potentiometrie.....	35

3	Experimenteller Teil.....	36
3.1	Miniaturisiertes Fliessinjektionsanalysensystem (s. KAP. 4)	36
3.1.1	Hauptteil des Fliessinjektionsanalysensystems	36
3.1.2	Das Interface für die automatisierten Ventile und Pumpen.....	40
3.1.3	Methoden und Reagenzien	44
3.2	Tragbares Kapillarelektrophoresegerät (s. KAP. 5)	46
3.2.1	Geräteaufbau.....	46
3.2.2	Photomultiplerröhre.....	51
3.2.3	Methoden und Reagenzien	53
3.2.4	Herstellung der elektronischen Schaltung	53
3.3	Automatischer Injektor für die Kapillarelektrophorese (s.KAP.6,7,8).....	54
3.3.1	Geräteaufbau.....	54
3.3.2	Injektionsmethode.....	58
3.3.3	Kontaktloser Leitfähigkeitsdetektor	59
4	Automatisierte hydrodynamische Injektion für ein Fliessinjektionsanalysensystem im Mikromassstab.....	64
4.1	Hintergrund.....	64
4.2	Charakterisierung der μ -FIA-Einheit	64
4.3	Resultate	65
4.4	Schlussfolgerung	71
5	Optische Detektion für ein tragbares Kapillarelektrophoresegerät basierend auf optischen Fasern.....	72
5.1	Photodioden.....	72
5.1.1	Einleitung.....	72
5.1.2	Kerngrößen der Glasfaser.....	73
5.1.3	Kationen.....	74
5.1.4	Anionen.....	76
5.1.5	Anionen mit UV-Leuchtdiode	78
5.1.6	Schlussfolgerung.....	79
5.2	Eine Photomultiplerröhre	79

5.3	Zwei Photomultiplerröhren	84
5.4	Schlussfolgerung	85
6	Entwicklung eines automatischen Injektors für die Kapillarelektrophorese, um schnelle Messungen durchzuführen	87
6.1	Einleitung	87
6.2	HPLC-Pumpen	87
6.3	Spritzenpumpen	89
6.3.1	Vier 2-Weg Ventile	89
6.3.2	Zwei 3-Weg-Ventile	92
6.3.3	Hydrostatische Pumpe	93
6.3.4	4-offenes 4-geschlossenes Pinchventil	95
6.4	Schlussfolgerung	99
7	Einsatz des Injektors mit dem UV-Detektor	101
7.1	Einleitung	101
7.2	Der Einfluss der Kapillarlängen	101
7.3	Der Einfluss der Geometrie des Detektors	105
7.4	Der Einfluss der Feldstärke	106
7.5	Der Einfluss der Konzentration	108
7.6	Der Einfluss der Injektionsmenge	109
7.7	Schlussfolgerung	110
8	Einsatz des Injektors mit dem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor	111
8.1	Einleitung	111
8.2	Optimierung des kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektors	111
8.3	Der Einfluss der Kapillarlängen	113
8.4	Der Einfluss der Feldstärke und des Kapillarinne- durchmessers	115
8.5	Der Einfluss der Injektionsmenge	119
8.6	Vergleich Chip und Kapillare	121
8.7	Anwendungen	122
8.7.1	Anorganische Kationen	122
8.7.2	Anorganische Anionen	124

8.7.3	Kohlenhydrate.....	126
8.7.4	Kohlenhydrate und Aminosäuren	128
8.7.5	Arzneimittel	132
8.8	Schlussfolgerung	135
9	Schlussfolgerungen	136
10	Anhang.....	138
10.1	Layout der Platine für den LOG 100 mit Photodiode inklusive Liste der elektronischen Komponenten	138
10.2	FORTH-Programm für FIA.....	139
10.3	Belegung des Detektorteils und des Steuerteils für das tragbare Kapillarelektrophoresegerät.....	141
10.3.1	Steuerteil.....	141
10.3.2	Detektionsteil.....	147
10.4	Layout der Platine für den LOG 100 mit Photomultiplerröhre inklusive Liste der elektronischen Komponenten	151
10.5	Änderung des Interface und Belegung des SCSI-Steckers.....	153
10.6	LabVIEW-Programm für den automatischen Injektor	155
10.7	Layout der Platine für den Leitfähigkeitsdetektor inklusive Liste der elektronischen Komponenten	164
11	Literaturverzeichnis	168

1 Einleitung

Während des letzten Jahrzehnts haben hauptsächlich zwei Entwicklungen in der Analytischen Chemie stattgefunden. Die erste ist der Trend zur Automatisierung der analytischen Systeme, wobei der Bediener nur noch minimal eingreifen muss, die zweite ist deren Miniaturisierung. Diese zwei Trends wurden hauptsächlich durch die wirtschaftlichen Vorteile gefördert.

Durch die Automatisierung werden Laborkosten reduziert, vor allem durch geringen Bedarf an Personal, mehrere Analysen pro Zeit, die in weniger Zeit durchführbare Injektion und die über einen langen Zeitraum reproduzierten Resultate, da keine menschliche Einflüsse, wie z. B. die Müdigkeit, die Messung beeinflussen.

Durch die Miniaturisierung wird der Verbrauch von Stoffen und Energie gesenkt. Die Analysenzeiten werden auch gesenkt, dadurch sind wiederum mehrere Analysen pro Stunde durchführbar und die Betriebskosten werden reduziert. Kleinere Geräte bringen noch einen zusätzlichen Vorteil, und zwar die Möglichkeit eines tragbaren Gerätes zu entwickeln, das an jedem beliebigen Ort eingesetzt werden kann. Die Resultate sind sofort verfügbar und die Analysezeit zwischen Probennahme und Analyse wird verkürzt, so wird eine eventuelle Probenkontamination, durch den Transport zum Labor oder mit dem Kontakt mit der Luft oder Fremdstoffen, reduziert oder vermieden. Die Vor-Ort Analyse bringt für Feldanalyse eine flexible und gezielte Probennahme. So kann man nach der letzten Messung entscheiden, wo die nächste Probe genommen werden soll. Diese Strategie bringt eine Reduktion der Analysenzahl.

Die Fliessinjektionsanalyse (FIA) wird seit 30 Jahren stark entwickelt. Der einfache apparative Aufbau, die Vielseitigkeit und die einfache Anpassung zur Analysenmethode, der geringere Reagenzverbrauch, die kürzere Analysezeit, kleinere Geräte- und Wartungskosten sind einige Vorteile dieser Analysenmethode. Die Fliessinjektionsanalyse wurde als eine der ersten automatisierten Systeme entwickelt.

Diese Merkmale machen die FIA geeignet für Kontrolle und Routineanalyse in vielen Feldern der Analytischen Chemie wie z. B. in Klinik-, Umwelt-, Pharmazie- und Landwirtschaftslaboratorien. In der Fliessinjektionsanalyse werden Detektoren zur Atomabsorptions- und Emissionsspektroskopie, Fluorimeter, elektrochemische Systeme (Amperometrie, Ionselektivelektrode und Leitfähigkeit), Massenspektroskopie sowie Absorptionsspektroskopie eingesetzt, wo die letztgenannte am häufigsten benutzt wird. Im Fall der Absorptionsspektroskopie werden durch Verringerung der optischen Wegstrecke, gegeben durch die Miniaturisierung von FIA, immer leistungsfähigere Detektoren benötigt. In den letzten Jahren wurde der auf optischen Fasern basierte optischer Detektor eingesetzt.

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine relativ junge Analysenmethode, auf deren Gebiet aber derzeit eine grosse Entwicklung, sowohl in der Forschung als auch bei Routineanalysen, stattfindet. Die CE hat eine sehr hohe Trenneffizienz bei relativ kurzer Analysezeit, die in der Regel unter 15 Minuten liegt.

Eine Möglichkeit die Analysezeit zusätzlich zu reduzieren, ist die Trennungsspannung zu erhöhen. Hutterer und Jorgenson [1] haben ein kommerzielles 30kV Hochspannungsgerät modifiziert, um eine Trennungsspannung von 120 kV zu erreichen. Mit diesem Verfahren wurde die Trennung verbessert und die Analysezeit verkürzt. Dieses Verfahren ist bei normalen Anwendungen nicht einsetzbar, da Spannungen grösser als 30 kV zu störenden Entladungen neigen. Bei grossen Spannungen wurde der Strom in der Kapillare vergrössert, mit der Folge dass sich eine hohe Joule-Wärme entwickelte und die Trenneffizienz verschlechtert wurde. Diese könnte durch die Verkleinerung des Kapillarinneendurchmessers reduziert werden, wobei manchmal dadurch auch die Nachweisgrenze verschlechtert wird.

Eine weitere Möglichkeit, um die Analysezeit zu reduzieren, ist die Kapillare zu verkürzen. Dies ist durch das Lab-on-Chip-Gerät bewiesen, das normalerweise aus einer Glasplatte mit einem Kanal von einigen Zentimetern Länge besteht, wo die Analysezeit kürzer als eine Minute ist. Im Gegensatz zu dem Lab-on-Chip-Gerät, gibt es sehr wenige Publikationen zu dem Einsatz einer kurzen Kapillare. Der Grund dafür könnte

der sein, dass der Einsatz einer kurzen Kapillare mit den kommerziellen Geräten wegen den geometrischen Einschränkungen, nicht ganz einfach ist. Zemmann verwendete eine Kapillare von 7.5 cm, um anorganische und organische Anionen in weniger als einer Minute zu trennen [2] und Yang und Mitarbeiter zeigten ähnlich schnelle Trennungen von anorganischen Anionen mit einer 13 cm Kapillare [3-5]. Bjørnsdottir und Hansen [6] und Riekkola und Mitarbeiter [7] haben die Analyse von Drogen in 2 Minuten mit der Verwendung von Kapillaren von entsprechend 8.5 und 23 cm durchgeführt. Li und Mitarbeitern verglichen eine 13 cm Kapillare und ein Chip Gerät mit dem Resultat, dass die zwei Systeme vergleichbar sind [8].

Die meistverbreitete Detektionsmethode in der CE, ist die UV-Absorption. Wenn der Analyt keine Chromophore enthält, wie z. B. Metallionen, anorganische Anionen oder aliphatische organische Anionen, muss er auf Kosten der Empfindlichkeit mit der indirekten Methode detektiert werden. Die Fluoreszenz wird auch wegen ihrer hohen Empfindlichkeit verwendet. Aber nur einige Analyte fluoreszieren, alle anderen müssen derivatisiert werden. Eine wichtige Alternative zum Absorptionsdetektor, der kontaktlose Leitfähigkeitsdetektor, wurde 1998 von Zemmann [9] und Mitarbeitern und do Lago und Mitarbeitern [10] eingeführt. Diese Methode ist universell und in der CE können damit alle Ionen detektiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war in drei Projekte aufgeteilt. Das erste war die Automatisierung der Injektion eines μ -FIA Gerätes, um die Reproduzierbarkeit zu verbessern. Das zweite war die Prüfung einer CE-Zelle ohne fokussierende optische Elemente mit einer Kapillare von 75 μ m Innendurchmesser für ein tragbares CE Gerät mit optischer Detektion. Das tragbare Kapillarelektrophoresegerät wurde neu gebaut, da das vorherige PVC-Gerät nicht mehr genügend sicher war. Wenn die Hochspannung angelegt wurde, entstanden zwischen Gerätewand und Elektroden Funken. Das PVC wurde nach einer gewissen Zeit beschädigt und verlor somit seine Isolierfähigkeit. Zusätzlich wurden eine neue UV-Leuchtdiode und eine neue kleine batteriebetriebene UV-Lichtquelle eingesetzt. Das letzte Projekt war die schnelle Trennung mit der Kapillarelektrophorese mit einer kürzen konventionellen Kapillare durch die

Entwicklung eines schnellen Injektors durchzuführen. Als Detektor wurden zuerst ein kommerzieller UV-Detektor und dann ein "in house" gebauter kontaktloser Leitfähigkeitsdetektor verwendet.

2 Theoretischer Teil

2.1 Fliessinjektionsanalyse (FIA)

2.1.1 Historischer Überblick und Prinzip

Die Fliessinjektionsanalyse wurde Mitte der 70er Jahre erstmals beschrieben und wurde gleichzeitig von Ruzicka und Hansen in Dänemark und von Stewart in den USA patentiert [11,12]. Die FIA ist eine hocheffiziente Methode für die automatische Bestimmung von Analyten, die aufeinander folgend in einen Trägerfluss injiziert werden, der die Probe zum Detektor transportiert. Der Erfolg dieses analytischen Systems liegt in der kurzen Analysezeit, der Vielseitigkeit, dem geringen technischen Aufwand, dem geringen Lösungsverbrauch, der guten Reproduzierbarkeit, der Automatisierung, der Möglichkeit zu Online-Messungen und in der Preiswertigkeit der einzelnen Teile des Systems [13]. Abbildung 2.1 zeigt eine FIA-Anlage mit ihren wesentlichen Komponenten [14].

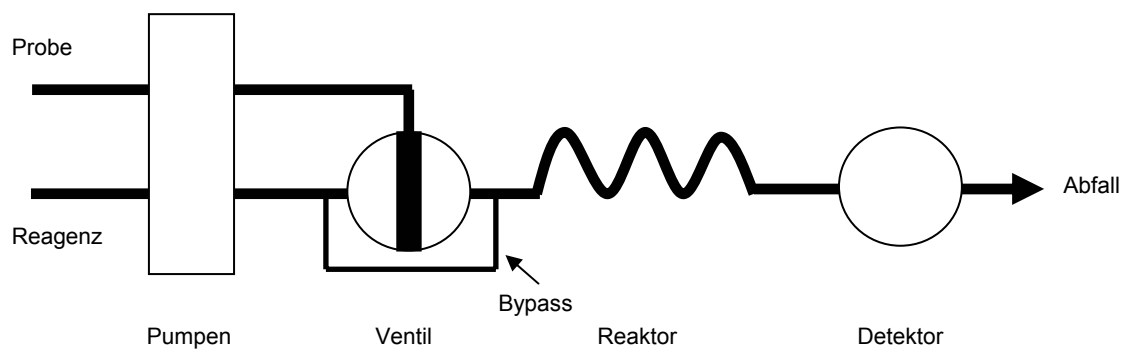


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines FIA-Systems.

Die Probe werden mit grosser Reproduzierbarkeit über ein Ventil in eine von einer Pumpe getragenen Flüssigkeitsstrom injiziert. Dieser kontinuierliche Trägerstrom

transportiert die Probe zum Detektor und anschliessend in ein Abfallgefäss. Ein typisches FIA-System besteht aus den folgenden Teilen. Als Fördersystem wird häufig eine peristaltische Pumpe [15,16] wegen des konstanten Fließstromes benutzt. Die Lösung wird normalerweise mit Hilfe rotierender Rollen durch einen Kunststoffschlauch gequetscht und weggepumpt. Als Injektor wird ein normales Drehventil mit Bypass verwendet [17]. Als Reaktor wird normalerweise ein Schlauch oder ein Kanal verwendet, in denen die Reaktion stattfindet. Bei speziellen Prozessen, wie z. B. der Dialyse [18-22], der Gasdiffusion [23-26], der Extraktion [16,27-30], usw. werden andere Reaktoren benutzt. Zur Detektion wird am häufigsten die molekulare Absorption verwendet [31-33], es können aber auch Atomabsorptions- und Emissionsspektroskop- [20,30,34,35], Fluorimeter- [26,36,37] und elektrochemische Detektoren [23,37-41] eingesetzt werden.

Mit der Entwicklung des Fließinjektionsanalyse-Systems im Mikromassstab (μ FIA) haben einige Vorteile noch zugenommen, insbesondere ist die Analysezeit noch kürzer und der Lösungsverbrauch noch geringer geworden, was weniger Kosten und chemische Abfälle verursacht. Die Vorreiter dieser Methode waren Ruzicka und Hansen 1984 [42]. Fließkanäle, Injektionseinheit und die Detektorzelle wurden auf eine PVC-Platte eingebaut. Semizirkuläre Kanäle mit einem Durchmesser von 0.8 mm wurden in die Platte eingefräst oder eingedrückt und mit einer zweiten Platte zugeklebt um die Kanäle zu schliessen. Alle anderen Teile des μ FIA-Systems waren wie diejenige eines konventionellen FIA-Gerätes. Der Kanaldurchmesser des μ FIA-Systems wurde auch nicht viel kleiner als der des konventionellen Gerätes mit Teflonschlauch, so dass der Reagenzverbrauch nicht dramatisch reduziert wurde. Carlsson und Mitarbeiter berichteten über ein ähnliches System zur Phosphatbestimmung, mit dem Unterschied, dass darin eine Kolbenpumpe benutzt wurde [43]. Fettiger et al. berichteten über ein μ FIA-System mit konventioneller Technik. Es wurden verschiedene gestapelte (Polymethyl)methacrylat (PMMA)-Scheiben und Kanäle mit einem Innendurchmesser von 0.8 mm verwendet [44]. Van der Schoot und Mitarbeiter bauten ein μ FIA-System mit piezoelektrischen Pumpen und ionselektiven Feldeffekttransistoren (ISFET), um

einige Ionen zu bestimmen [45,46]. Haswell und Mitarbeiter [47-50] bauten ein Glas- μ FIA-System mit photolithografischer Ätztechnik, um die Absorption von Nitrat, Nitrit und Phosphat zu bestimmen.

2.1.2 Spezifische Bauteile des selbstgebauten μ -FIA-Systems

2.1.2.1 Spritzenpumpen und Membranpumpen

Diese beiden Pumpen erzeugen einen kleinen Fluss, der für die normale FIA nicht geeignet ist, da die Spritzen bei den dort auftretenden Fließraten zu häufig wieder befüllt werden müssen. Der Spritzenkolben funktioniert dank einem Schrittmotor der einen konstanten Druck ausübt. Da der 60 mm lange Weg, den der Spritzenkolben zu durchlaufen hat, in 829'925 Schritte unterteilt ist, ist der resultierende Fluss nahezu kontinuierlich und pulsfrei. Zur Probeninjektion ist ein pulsfreier Fluss nicht so wichtig, deswegen wurde eine Membranpumpe verwendet. Diese Pumpe besteht aus einer Membran mit einem piezoelektrischen Teil, an der eine Wechselspannung angelegt wird und zwei passive Rückschlagsventile, eines für den Einlass und eines für den Auslass der Flüssigkeit. Durch die angelegte Wechselspannung am Piezoteil der Membran vergrößert sich das Volumen im Innenraum der Pumpe und es wird Flüssigkeit vom Einlass-Ventil angesaugt, danach verringert sich das Innenraumvolumen wieder, wodurch die Flüssigkeit wieder von dem Auslass-Ventil ausgestossen wird [46,51-53].

2.1.2.2 Hydrodynamische Injektion

Die hydrodynamische Injektion wurde für spezielle Anwendungen entwickelt, und zwar um eine genau abgemessene Menge einer Flüssigkeit in den Trägerstrom einzubringen ohne Einsatz von beweglichen Teilen [14,54]. Das Prinzip ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

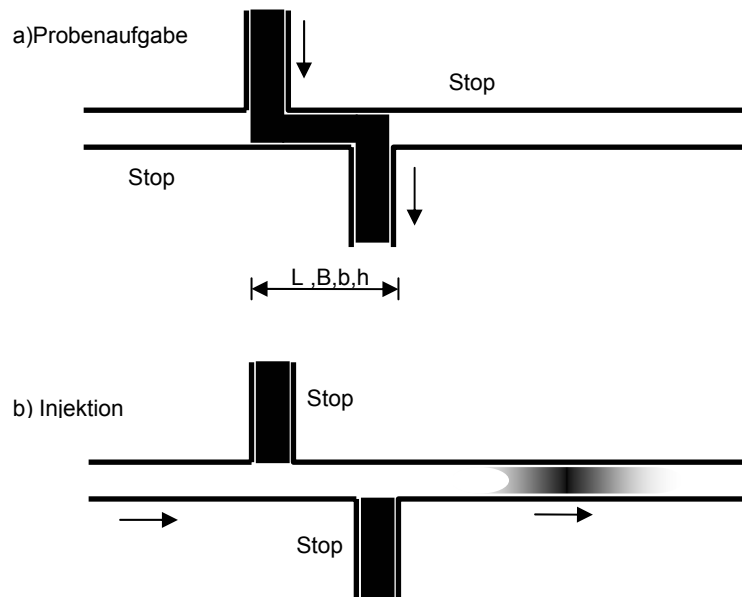


Abbildung 2.2: Das Prinzip der hydrodynamischen Injektion.

Als Erstes wird der Trägerfluss gestoppt und das Doppel-T mit der Probe befüllt (s. Abb. 2.2a). Dann wird der Probenfluss gestoppt und der Trägerfluss gestartet. Die Probe, die sich in der Intersektion zwischen dem Doppel-T und dem Trägerkanal befand, wird injiziert (s. Abb. 2.2b). Das Injektionsvolumen V der Probe ist konstant und geometrisch definiert, in diesem Fall durch die trapezoidale Querschnittsfläche des Kanals und der Länge L .

$$V = \frac{(B+b) \cdot h}{2} \cdot L \quad (1)$$

B steht für die Länge der grossen Basis des Kanals, b für die Länge der kleinen Basis des Kanals und h für die Höhe des Kanals.

2.1.3 Laminare Strömung

Um einen reproduzierbaren Probentransport in der FIA zu erzeugen, sind laminare Strömungsbedingungen notwendig, d. h. ein einheitlicher und gerichteter Fluss

ohne Turbulenzen. In einem kreisförmigen Rohr (bzw. Schlauch) sind unter laminaren Bedingungen die Stromlinien parallel zueinander symmetrisch um das Zentrum des Kanals verteilt. Dort bewegt sich die Flüssigkeit mit der doppelten Durchschnittsgeschwindigkeit, während an den Wänden die Geschwindigkeit gegen Null geht. Daraus resultiert das für die laminare Strömung charakteristische parabolische Strömungsprofil.

Der Wechsel von der laminaren in die turbulente Strömungsform hängt von der Reynoldszahl R_e ab, die sich aus der mittleren Fließgeschwindigkeit \bar{v} , dem Rohrdurchmesser d , der Dichte ρ der Flüssigkeit und der Viskosität η der Flüssigkeit zusammensetzt

$$R_e = \frac{\bar{v} \cdot d \cdot \rho}{\eta} \quad (2)$$

Wenn die kinematische Viskosität $\nu_k = \frac{\eta}{\rho}$ ist, wird die Gleichung 2 zu

$$R_e = \frac{\bar{v} \cdot d}{\nu_k} \quad (3)$$

vereinfacht. Für Reynoldszahlen $R_e < R_e^{krit}$ ist die Strömung laminar, andernfalls turbulent. Die kritische Reynoldszahl R_e^{krit} beträgt bei Rohrströmungen 2100 [14].

Auch bei kleinen Reynoldszahlen können durch Schlauchbiegungen oder sich ändernden Schlauchdurchmessern Unregelmässigkeiten in der Strömung entstehen. Besonders der Übergang von einem kleinen zu einem grösseren Schlauchdurchmesser stört den laminaren Fluss. Daher sollten bei dem Trägerkanal und dem Doppel-T Änderungen im Durchmesser der Kanäle vermindert werden.

2.1.4 Dispersion: Konvektions- und Diffusions-Prozesse

Wenn die Probe in den Fluss injiziert wird, hat es ein rechteckiges Profil (s. Abb. 2.3a). Während die Probe durch den Trägerfluss zum Detektor transportiert wird, findet eine Bandenverbreiterung statt. Die Dispersion ist das Resultat von zwei Phänomenen: der Konvektion, gegeben durch den laminaren Fluss und der Diffusion, gegeben durch den Konzentrationsgradienten zwischen der Probe und dem Reagenz.

Die Konvektion der Probe wird innerhalb von Millisekunden entlang des parabolischen Profils verteilt (s. Abb. 2.3b). Sie nimmt bei einer Vergrößerung der Schlauch- oder der Kanaldimension und bei Erhöhung der Fließgeschwindigkeit zu.

Die Diffusion kann in zwei Arten auftreten: Als axiale Diffusion, d. h. Diffusion in der Flussrichtung und die radiale Diffusion, d. h. die Diffusion senkrecht zur Flussrichtung. Nur die letzte hat einen wichtigen Einfluss und zwar bewirkt sie die eigentliche Durchmischung von Probe und Trägerstrom. Dabei werden zum einen Probenelemente an der Spitze der Probezone, d. h. auf den Stromlinien in Zentrumsnähe, nach aussen in Zonen geringerer Strömungsgeschwindigkeit bewegt, was zu einem Abbremsen führt. Zum anderen werden Probenelemente, die sich von aussen auf die zentrale Stromlinie zubewegen, beschleunigt [14]. Die Diffusion hilft dabei, die Integrität des Probenprofils, d. h. die Peakbreite, zu erhalten (s. Abb. 2.3c). Nach zirka 25 s wirkt nur noch die Diffusion (s. Abb. 2.3d). Ohne die Diffusion wäre das parabolische Profil gestreckt, d. h. die Probe würde dort, wo sie injiziert wurde, an den Wänden bleiben und im Zentrum immer mehr Richtung Detektor gehen, was eine Peakverbreiterung verursachen würde. Durch die Konvektion allein werden Probe und Trägerstrom nicht durchmischt, die einzelnen Schichten würden lediglich entlang der Stromlinien nebeneinander herlaufen. Für die FIA-Anwendungen spielt daher die radiale Dispersion eine wichtige Rolle, da zwischen Probe und Reagenz eine chemische Reaktion ablaufen muss, z. B. für die Absorption. Sie verursacht die tatsächliche Durchmischung von Probe und Reagenz und kann damit die Reaktion zwischen beiden Komponenten begünstigen. Durch Einsatz einer zweiten Strömung ist die radiale Diffusion der Probe im Trägerstrom immer vorhanden.

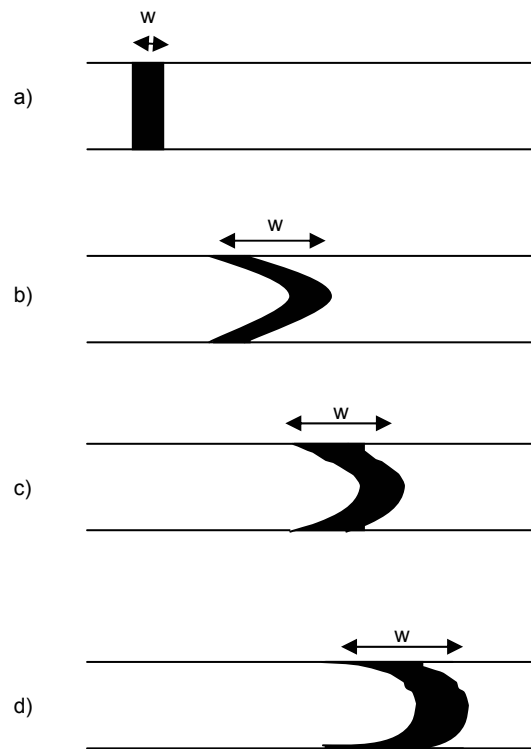


Abbildung 2.3: Effekt der Dispersion am Probenprofil zu verschiedenen Zeiten während einer FIA Messung. a) Injektion; b) Konvektion; c) Konvektion und Diffusion; d) Diffusion.

2.1.5 Dispersionskoeffizient

Der Dispersionskoeffizient charakterisiert das FIA-System und ist durch folgende Gleichung definiert:

$$D = \frac{C_0}{C} \quad (4)$$

C_0 ist die Analytkonzentration der injizierten Probe und C die Konzentration der verdünnten Probe zu dem Zeitpunkt, an dem dieser Dispersionskoeffizient bestimmt wurde.

Man betrachte als Modell das Probenprofil als zylinderförmig, die Probe ist homogen und hat eine Analytkonzentration von C_0 . Am Detektor würde dadurch ein rechteckiges Signal erzeugt werden, dessen Höhe proportional zur Probenkonzentration wäre (s. Abb. 2.4 links). Der Dispersionskoeffizient beträgt 1, da die Probe unverdünnt vorliegt. In der Realität wird eine Dispersionszone ausgebildet, bei deren Detektion der Peak ein Konzentrationskontinuum widerspiegelt (s. Abb. 2.4 rechts). Man betrachtet dieses Kontinuum so, als sei es aus einzelnen Fluidelementen zusammengesetzt, von denen kein einziges die gleiche Konzentration wie ein benachbartes hat. Jedes dieser Elemente wird einzeln detektiert.

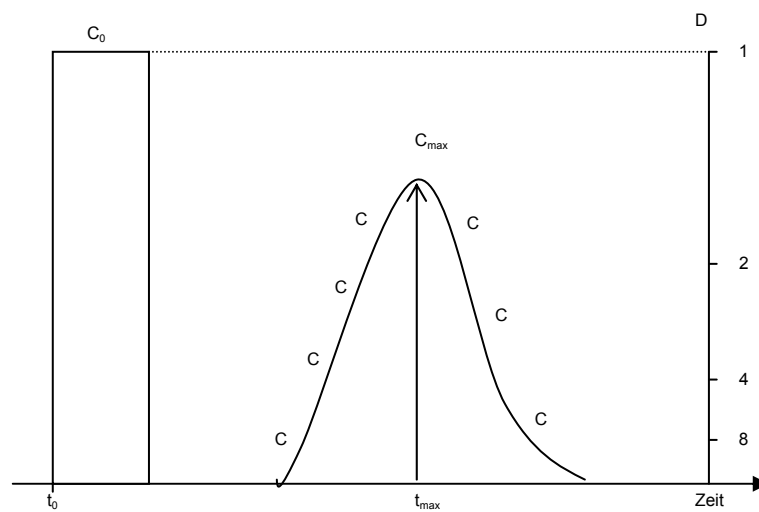


Abbildung 2.4: Detektion nicht dispergierte (links) und dispergierte (rechts) Probenzonen.

Der Wert für den Dispersionskoeffizienten D hängt demnach vom Zeitraum zwischen dem Zeitpunkt t_0 der Probeninjektion und dem Zeitpunkt t ab, an dem das dispergierte Element des Probenmaterials durch das Beobachtungsfeld des Detektors fließt. Wird allein über die Peakhöhe ausgewertet, dann wird das Fluidelement mit der maximalen Konzentration der injizierten Probenlösung C_{max} , das zum Zeitpunkt t_{max} den Detektor erreicht (s. Abb. 2.4 rechts), zur ursprünglichen Konzentration der injizierten Probenlösung C_0 ins Verhältnis gesetzt:

$$D_{\max} = \frac{C_0}{C_{\max}} \quad (5)$$

Mit diesen D_{\max} -Werten ist es möglich, die FIA-Einheit, den Detektor und die Detektionsmethode zu charakterisieren. Je nach Ausmass der Dispersion bezeichnet man sie als begrenzt ($D = 1-3$), mittel ($D = 3-10$) oder gross ($D > 10$) [14]. Die Zeit t_{\max} ist wichtig, weil es die verfügbare Zeit ist, in der die eventuelle chemische Reaktion zu abzulaufen hat.

Der FIA-Peak ist häufig das Ergebnis zweier gleichzeitig stattfindender Prozesse: Eines physikalischen Prozesses der Zonendispersion und zusätzlich eines chemischen Prozesses, der durch die Reaktion zwischen Probe und Reagenz stattfindet. Der Dispersionskoeffizient berücksichtigt jedoch nur den physikalischen Dispersionsprozess.

2.2 Kapillarelektrophorese (CE)

2.2.1 Historischer Überblick

Schon am Ende des 19. Jahrhunderts (1879) wurde das erste Gesetz von Kohlrausch (Gesetz der unabhängigen Ionenwanderung) formuliert: „Geladene Teilchen wandern in Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit“. Das Trennprinzip wurde zuerst nur zur Erforschung physikalischer Grundlagen angewandt. Erst 1937 wurde dann die Elektrophorese als Trennmethode von Tiselius [55] eingeführt. Für seine Arbeiten über die Analysen mittels Elektrophorese und Absorption, insbesondere für die Entdeckung der komplexen Natur von Serumproteinen, erhielt Tiselius den Nobelpreis für Chemie im Jahre 1948 [56]. Er entdeckte, dass ein Proteingemisch in einem mit Pufferlösung gefüllten Rohr, bei Anlegen einer Spannung in eine Richtung wandert und dass die Wandergeschwindigkeit von der Ladung und der Mobilität der einzelnen Proteine abhängt. Die Trennleistung war aber durch die thermische Diffusion und die Konvektion eingeschränkt. Um diese

Effekte zu vermeiden, wurden stabilisierte Gele verwendet, die auf eine Glasplatte gegossen wurden. Die Gelelektrophorese ist die meistverwendete analytische Methode in der Biochemie. Die Plattentechnik hat als Nachteil die lange Analysezeit, die schwierige Vorbereitung der Platten in der Detektion. Die erste Trennung in einer offenen 3 mm Glassröhre wurde von Hjerten [57], ohne stabilisierendes Medium, beschrieben. Er liess die Röhren um die eigene Achse rotieren und konnte dadurch die störenden Konvektionseffekte reduzieren. Durch die Reduzierung des Innendurchmessers der Trennkapillare im Jahr 1979 durch Mikkers und Mitarbeiter [58], begann die eigentliche Entwicklung. Es wurden erstmals Kapillare mit 200 μm Innendurchmessern verwendet. Die Theorie wurde erstmals detailliert erklärt und durch die Verwendung von Kapillaren mit 75 μm I.D. durch Jorgenson und Lukàcs [59,60], wurden auch bessere Resultate erzielt. Das günstigere Oberfläche-Volumen-Verhältnis bei den Kapillaren verminderte den störenden Einfluss der thermisch induzierten Konvektion stark. In den Jahren 1988/89 erschienen die ersten kommerziell erhältlichen Kapillarelektrophoresegeräte auf dem Markt. Mit den schnellen Fortschritten, die gegenwärtig gemacht werden, gewinnt die Kapillarelektrophorese an Popularität als ein alternatives analytisches Werkzeug für einige routinemäßige analytische Anwendungen. Die Elektrophorese mit planaren Chips wurde 1992 erstmals auf ein Glas-Substrat vorgeführt [61]. In den folgenden Jahren wurden die beiden Systeme, mit Kapillaren und mit Chips, weiterentwickelt. Das Chip-System wurde auch kommerzialisiert. Die Aufmerksamkeit wurde immer mehr auf das Chip-System gerichtet, wegen den sehr kurzen Analysenzeiten, die durch die kleinere Trennstrecke gegeben sind [62-65].

Diese neuen elektrophoretischen Techniken, sowohl die mit der Kapillare als auch die mit dem Chip, werden heute als Kapillarelektrophorese (CE) bezeichnet. Unter diesem Begriff fasst man verschiedene Trenntechniken zusammen.

- *Kapillarzonenelektrophorese (CZE)*: In Umgangssprache auch als Kapillarelektrophorese (CE) bezeichnet. Wegen der einfachen Handhabung und Vielseitigkeit ist die CZE die meistgenutzte Methode. Die CZE ist die einfachste Form der CE, da die Kapillare nur mit Pufferlösung gefüllt ist. Die Trennung

erfolgt durch Migration in definierten Zonen mit verschiedenen Geschwindigkeiten. Sie wird später noch detaillierter diskutiert [66].

- *Kapillargelelektrophorese (CGE)*: Wurde prinzipiell zur Molekulargewichtsbestimmung von biologischen Makromolekülen, wie Proteinen und Nukleinsäuren, eingeführt. Die Kapillare ist mit einer Polymerlösung oder einem Gel gefüllt. Die Trennung erfolgt durch Elektrophorese. Geladene Moleküle werden durch das Gel gebremst, wobei grössere Moleküle stärker gebremst werden als kleinere [66,67].
- *Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)*: Dies ist die einzige Technik, um neutrale Moleküle wie auch geladene Teilchen zu trennen. Es ist ein Spezialfall von CZE. Dem Puffer werden Tenside zugesetzt. Die neutralen Moleküle verteilen sich zwischen dem Puffer und den Mizellen nach ihrer Hydrophobie [66,68,69].
- *Isoelektrische Fokussierung (IEF)*: Wird zur Trennung von Peptiden und Proteinen verwendet, auf Basis des isoelektrischen Punktes. Die Trennung erfolgt in einem pH-Gradienten, der sich durch Zusatz von Ampholyten zum Puffer im elektrischen Feld ausbildet. Durch das angelegte elektrische Feld wandern die geladenen Ampholyte und Proteine durch das Medium, bis sie die Zone mit dem pH-Wert erreichen, wo sie ungeladen sind. Sobald der Gleichgewichtszustand erreicht ist, fließt kein Strom mehr und die getrennten Proteine werden durch Druck zum Detektor transportiert [66,67].
- *Elektrochromatographie (CEC)*: Es wird die stationäre Phase des HPLC verwendet und die Strömung des Eluenten und der Transport der Probe wird durch elektroosmotischen Fluss (EOF) erzielt [70].
- *Isotachophorese (ITP)*: Im Gegensatz zur Kapillarzonenelektrophorese wird hierbei ein diskontinuierliches Elektrolytssystem verwendet. Nach der Einstellung eines stationären Zustands bilden sich Zonen aus, die alle mit der gleichen Geschwindigkeit wandern. Die Zonen, die eine einzelne Komponente

enthalten, befinden sich sandwichartig zwischen dem vorlaufenden und dem abschliessenden Elektrolyten. Man erhält nur ein Stufendiagramm und keine Peaks [66,71-73].

In dieser Dissertation wird als Trennmethode die Kapillaronenelektrophorese (CZE) benutzt. Sie wird im Folgenden, wie auch in der Praxis, nur Kapillarelektrophorese (CE) genannt. Verschiedene Reviews sind in der letzten Zeit erschienen. Diese geben einen Überblick über die Entwicklung der CE. Zum Beispiel Publikationen über klinische und gerichtliche Analysen [74], therapeutische Proteine [75], Schadstoffe [76], Pflanzenschutzmittel [77], Giftstoffe [78], Metallionen [79], Lebensmittel [80-82], inorganische Ionen [83-85], Arzneimittel [86], organische Anionen [87], Kohlenhydrate [88,89], Aminosäuren [90], Peptide [91].

2.2.2 Physikalische Grundlagen und Trennprinzipien der Kapillarelektrophorese

Der prinzipielle Aufbau einer CE-Apparatur ist sehr einfach und ist in Abbildung 2.5 gezeigt.

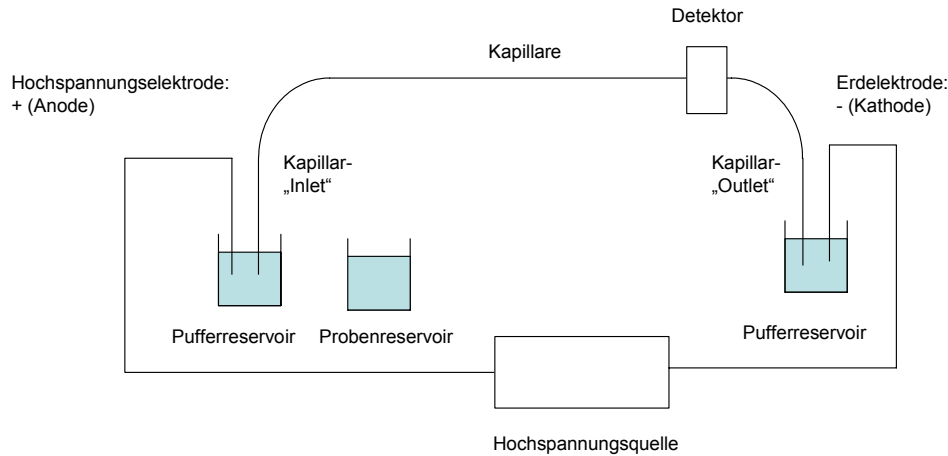


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Systems.

Die Trennung findet in einer mit Puffer gefüllten Glaskapillare statt. Bei den meisten Applikationen verwendet man eine 30 bis 100 cm lange, mit Polyimid beschichtete, Quarzglaskapillare mit einem Innendurchmesser von 25 bis 100 μm . Nach der Probenaufgabe am Kapillarinlet (Einlauf), werden beide Kapillarenden in die Puffergefäße eingetaucht. Zwischen den Kapillarenden wird dann eine Spannung bis zu 30000 V angelegt. Die Probenkomponenten migrieren im elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung Kapillaroutlet (Abfluss) und durchqueren dabei einen Detektor, mit dem eine qualitative und quantitative Auswertung erfolgen kann.

Wie schon in dem historischen Überblick erwähnt, wird die Kapillare in letzter Zeit teilweise durch einen Chip ersetzt. Dieses planare miniaturisierte CE-System wurde mit dem photolithographischen Ätzprozess aus der Halbleiterindustrie aus Glas, Silikon

oder Polymer hergestellt. Ein Trennkanal und ein Injektionskanal, die meistens senkrecht zueinander stehen (kreuzförmig), wurden auf die Platte geätzt. Eine andere Platte wurde als Deckel gebraucht, um den Kanal zu schliessen [65,92].

2.2.2.1 *Elektrophoretische Mobilität*

Die Trennungen durch Elektrophorese beruhen auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von Ionen in einem elektrischen Feld, wobei die elektrophoretische Ionengeschwindigkeit v_e durch das Produkt aus seiner elektrophoretischen Mobilität μ_e und dem angelegten elektrischen Feld E gegeben ist:

$$v_e = \mu_e \cdot E \quad (6)$$

Teilchen, die in dem Puffer (Elektrolytlösung) als Ionen vorliegen, sind im elektrischen Feld verschiedenen Kräften ausgesetzt. Die Beschleunigungskraft F_B berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$F_B = q \cdot E \quad (7)$$

wobei q die Ladung und E das angelegte elektrische Feld ist. Die Ladung ist

$$q = z \cdot e = z \frac{F}{N_A} \quad (8)$$

wobei e die elementare Ladung, F die Faradaykonstante (96500 C Mol^{-1}), N_A die Avogadrozahl und z die effektive Ladung des Ions ist. Durch Ersetzen von q in Gleichung 7 mit dem q in der Gleichung 8 erhält man:

$$F_B = \frac{z \cdot F \cdot E}{N_A} \quad (9)$$

Die auf die bewegten Teilchen ausgeübte Reibungskraft F_R kann unter der Annahme von kugelförmigen Ionen näherungsweise durch das Stokessche Gesetz beschrieben werden:

$$F_R = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (10)$$

wobei η die dynamische Viskosität [Pa s], r Stokesscher Radius [cm] (der auch die Solvatationshülle mit beinhaltet) und v die Ionengeschwindigkeit ist.

Das Ion wird solange beschleunigt, bis es zu einem Kräftegleichgewicht zwischen der Beschleunigungskraft F_B und der Reibungskraft F_R kommt.

$$F_B = F_R \quad (11)$$

Durch Einsetzen von F_B und F_R in Gleichung 11 und unter Berücksichtigung von Gleichung 6 erhält man:

$$v_e = \mu_e E = \frac{z \cdot F \cdot E}{6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot N_A} \quad (12)$$

Konventionsgemäss haben Kationen positive und Anionen negative Mobilitäten.

Eine direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität μ_e ist aufgrund der molekül- und pufferspezifischen Grössen nicht möglich, da der Stokessche Radius meist nicht bekannt ist und mit dem messbaren Ionenradius in Kristallgittern nicht korreliert.

2.2.2.2 *Elektroosmotischer Fluss (EOF)*

Die Anlegung eines elektrischen Feldes an eine Quarzkapillare, die mit einer elektrolytischen Lösung gefüllt ist, verursacht nicht nur elektrophoretische Wanderung, sondern auch eine Elektroosmose, die man elektroosmotischen Fluss (EOF) nennt [93]. Der EOF ist, im normalen Fall, eine kathodengerichtete Strömung des Puffers. Die am häufigsten verwendeten Kapillaren in der CE sind die aus der Gas-Chromatographie (GC) bekannten fused-silica Kapillaren, an deren Oberfläche Sinalolgruppen vorliegen.

Diese liegen teilweise in deprotonierter Form vor und bilden so eine negativ geladene Oberfläche. Zum Ladungsausgleich lagern sich Gegenionen nahe der Oberfläche an und bilden die elektrische Doppelschicht, die eine Potentialdifferenz, das ζ -Potential [94], verursacht. In der ersten Schicht werden Kationen an der Oberfläche festgehalten (starre Grenzschicht) und in der zweiten Schicht können sich die Kationen frei bewegen (diffuse Grenzschicht).

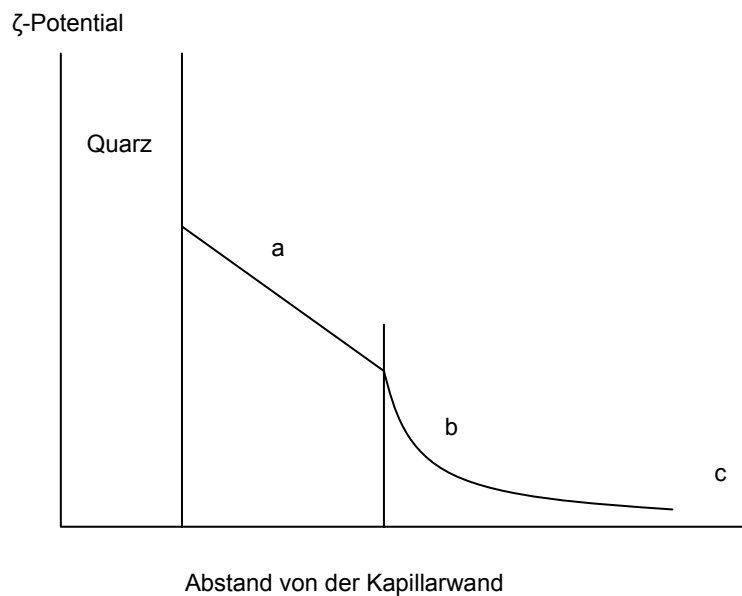


Abbildung 2.6: Verlauf des ζ -Potentials an der Grenzfläche Puffer/Quarz. a) starre Grenzschicht mit absorbierten Kationen. b) diffuse Grenzschicht. c) Elektrolyt (Puffer).

Wenn Spannung angelegt wird, wandern die Kationen der diffusen Doppelschicht in Richtung Kathode. Da die Kationen solvatisiert sind, wird die umgebende Lösung in Richtung Kathode bewegt. Es bildet sich ein extrem flaches (stempelförmiges) Strömungsprofil aus. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Bandverbreiterung als bei hydrodynamischen Flüssen, wo das stark vom Kapillarradius und Strömgeschwindigkeit abhängige parabolische Profil auftritt, wie bei HPLC oder FIA (s. Kap. 2.1.4).

Die Geschwindigkeit des EOF v_{EOF} ist gegeben durch

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta} \quad (13)$$

wobei ε die Dielektrizitätskonstante, E die angelegte Feldstärke, ζ das ζ -Potential und η die Viskosität des Puffers ist.

Dazu kann man auch die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} ausrechnen:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta} \quad (14)$$

2.2.2.3 Messung der elektrophoretischen Mobilität

Die beobachtete Geschwindigkeit eines Ions ergibt sich aus der Summe von elektrophoretischer Geschwindigkeit v_e (Kap 2.2.2.1) und EOF Geschwindigkeit v_{EOF} (Kap 2.2.2.2)

$$v_{beo} = v_e + v_{EOF} \quad (15)$$

Die beobachtete Geschwindigkeit eines Ions v_{beo} wird bestimmt, indem man die zurückgelegte Weglänge L_{eff} (effektive Kapillarlänge vom Inlet bis zum Detektor) durch die Migrationszeit t_m des Peaks teilt.

$$v_{beo} = \frac{L_{eff}}{t_m} = E \cdot (\mu_e + \mu_{EOF}) \quad (16)$$

wobei E das angelegte elektrische Feld ist. Mit ein wenig Mathematikeinsatz folgt

$$\mu_e = \left(\frac{L_{eff}}{t_m} - \frac{L_{eff}}{t_{nm}} \right) \cdot \left(\frac{L_{ges}}{U} \right) \quad (17)$$

wobei L_{eff} die effektive Kapillarlänge, L_{ges} gesamte Kapillarlänge und U die angelegte Spannung ist. t_{nm} ist die Migrationzeit eines neutralen Markers. Normalerweise wird ein neutraler detektierbarer Analyt, der mit dem EOF transportiert wird, injiziert.

Unter normalen Bedingungen, dank dem EOF, wandern die meisten Teilchen, unabhängig von der Ladung, in dieselbe Richtung. Kationen wandern am schnellsten, da die elektrophoretische Anziehung zur Kathode und der EOF gleichgerichtet sind. Neutrale Moleküle werden mit der Geschwindigkeit des EOF transportiert, aber nicht voneinander getrennt. Anionen wandern am langsamsten, da sie von der Anode zwar angezogen, aber von dem überlagerten EOF zur Kathode bewegt werden. Nur die schnellsten Anionen werden zur Anode bewegt, und zwar nur dann wenn die elektrophoretische Geschwindigkeit stärker als die EOF-Geschwindigkeit ist.

2.2.2.4 Beeinflussung des EOF

Mit der Änderung von verschiedenen experimentellen Parametern kann man den EOF gezielt verändern, um erwünschte Effekte zu erzielen. (s. Gleichungen 13, 14)

- *Angelegte Hochspannung bzw. elektrische Feldstärke:* Die Geschwindigkeit der EOF ist proportional zu der Feldstärke E und folglich zur angelegten Hochspannung U .
- *pH-Wert des Puffers:* Der EOF nimmt mit steigendem pH zu. Bei hohen pH-Werten sind mehr Silanolgruppen der Kapillare dissoziiert, das heisst, dass das ζ -Potential zunimmt und der EOF demzufolge auch zunimmt. Unter pH 2 ist der EOF Null. Man muss auch noch berücksichtigen, dass eine pH-Änderung die Ladung des Analyten beeinflussen könnte.
- *Pufferkonzentration:* Das ζ -Potential ist proportional zu der Dicke der diffusen Grenzschicht. Eine grössere Pufferkonzentration bedeutet auch eine grössere Konzentration von Kationen, welche die Dicke der diffusen Grenzschicht verkleinert, was zu einem kleineren ζ -Potential führt, das folglich den EOF verringert.

- *Temperatur:* Bei einer Temperaturerhöhung nimmt die Viskosität η ab. Die EOF-Geschwindigkeit nimmt zu.
- *Organische Lösungsmittel:* Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln zum Puffer verändern die Viskosität η und die Dielektrizitätskonstante ϵ . Die dadurch erzielten Effekte sind schwierig vorherzusagen.
- *Beschichtung der Kapillaroberfläche:* Der EOF kann durch eine dynamische oder eine permanente Beschichtung der Kapillaroberfläche sehr gezielt verändert, sogar fast eliminiert oder umgekehrt werden. Mit einer gewissen Zugabe von kationischen Tensiden [95] (z. B. Cetyltrimethylammoniumbromid CTAB) entsteht eine Doppelschicht an der Innenwand der Kapillare. Die negative Oberfläche der Kapillare wird in positiv umgewandelt, mit dem Resultat, dass der EOF umgekehrt wird. Dieser Effekt ist sehr nützlich, zusammen mit einer Umpolung der Hochspannung, um alle Anionen zu detektieren und um die Analysenzeit zu verkürzen.

2.2.2.5 Bandenverbreiterung

Zur Beschreibung der Dispersion der Zonen in der CE wurden die in der Chromatographie bekannten Größen, Bodenhöhe H und theoretische Bodenzahl N , angewendet, obwohl die CE eigentlich kein chromatographisches Verfahren ist. Wenn der CE-Peak eine Gausssche Form mit w als Basisbreite hat, wird die Effizienz eines CE-Trennsystems, wie in der HPLC berechnet, und zwar durch:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \text{ bzw. } N = 5.54 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (18)$$

wobei t_m die Migrationszeit des Peaks, w die Basisbreite, die 4 Mal die Standardabweichung τ des Gaussschen Peaks ist und $w_{1/2}$ die Peakbreite auf halber Höhe ist.

Für die quantitative Beschreibung der Trennung zweier Analyte wird die Auflösung R und die Peakkapazität verwendet. Die Auflösung R ist definiert durch:

$$R = \frac{2(t_{m2} - t_{m1})}{w_1 + w_2} \quad (19)$$

wobei t_m die Migrationszeit des i -ten Peaks und w die Basisbreite des i -ten Peaks, die 4 Mal die Standardabweichung τ des Gaussschen Peaks.

Die Peakkapazität (PK) ist die Anzahl möglicher Peaks zwischen dem schnellsten und dem EOF-Peak. PK ist folgendermassen definiert:

$$PK = \frac{t_{EOF} - t_{k^+}}{w_m} \quad (20)$$

wobei t_{EOF} die Migrationszeit des EOF Peaks, t_k die Migrationszeit von Potassium (K^+) und w_m die durchschnittliche Peakbreite an der Basislinie ist.

Eine Bandverbreiterung kann in der CE verschiedene Ursachen haben:

- *Effizienzverlust durch Diffusion:* Durch die Kombination der Bodenzahl (Gleichung 21) und des Einsteinschen Diffusionsgesetzes (Gleichung 22) erhält man eine Beziehung zwischen Bodenzahl N , Feldstärke E , Mobilität μ und dem Diffusionskoeffizienten D .

$$N = \frac{L^2}{\sigma_{LD}^2} \quad (21)$$

$$\sigma_{LD}^2 = 2D \cdot t_m = \frac{2D \cdot L_{eff} \cdot L_{ges}}{\mu \cdot U} \quad (22)$$

$$N = \frac{\mu \cdot U}{2D} \quad (23)$$

wobei L_{eff} die effektive Kapillarlänge (bis zum Detektor), L_{ges} die gesamte Kapillarlänge, t_m die Migrationszeit, U die angelegte Spannung, σ die Varianz der Peakbreite der longitudinalen Diffusion bei dem Gausssförmigen Peak und D der Diffusionskoeffizient der Probe im Trennpuffer ist. So erreicht man die grösste Bodenzahl bei Verwendung hoher Trennspannungen. Analyte mit hoher Mobilität erzeugen hohe Bodenzahlen, da sie aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit nur eine minimale Zeit zum Diffundieren in der Kapillare zur Verfügung haben. Die Bodenzahl wird grösser, wenn der Diffusionskoeffizient kleiner wird. Der Diffusionskoeffizient korreliert mit der Molmasse. Mit zunehmender Molmasse werden der Stofftransport und die Diffusion im Konzentrationsgefälle verzögert. Folglich nehmen die Diffusionskoeffizienten mit steigender Molmasse ab. Die reale gemessene Bodenzahl ist üblicherweise niedriger als der theoretische Wert, da neben der Diffusion der Probenzone in Längsrichtung noch andere Effekte zur Bandverbreiterung beitragen.

- *Effizienzverlust durch Temperatureffekte:* Durch das Anlegen des elektrischen Feldes wird in der Kapillare ein Stromfluss erzeugt. Durch das Zusammenstossen der mobilen Ionen mit den Puffermolekülen wird Wärme erzeugt, die Joulesche Wärme genannt wird. Diese Wärme wird über die Kapillarwand abtransportiert, so dass im Puffer ein radialer Temperatur- und damit Viskositätsgradient senkrecht zur elektrophoretischen Wanderung entsteht. Dadurch wandern die Substanzonen in Bereichen mit höherer Viskosität (Kapillarwand) langsamer als in den Bereichen mit geringerer Viskosität (Kapillarmitte). Viskositätsunterschiede zwischen Kapillarmitte und Wand führen zu Migrationsunterschieden, die ihrerseits das Flussprofil ändern und damit zu einer Bandverbreiterung führen. Wenn die Temperatur in der Kapillare zu hoch ansteigt, verringert sich die Löslichkeit von Gasen in der Elektrolytlösung, was zur Bildung von Blasen führt, die den Strom unterbrechen [96-98].

- *Effizienzverlust durch Elektrodispersion:* Durch starke Unterschiede in den Leitfähigkeiten zwischen der Probe und dem Trennpuffer wird Elektrodispersion verursacht. Wenn die Probenzone eine höhere Mobilität als der Trennpuffer hat, wird die Frontzone diffus und die Endzone scharf (frontende Peaks). Umgekehrt erhält man bei kleinerer Mobilität der Probenzone gegenüber dem Trennpuffer eine scharf ausgebildete Frontzone und eine diffus ausgebildete Endzone (tailende Peaks). Nur wenn beide Leitfähigkeiten identisch sind, gibt es symmetrische Peaks [99].
- *Effizienzverlust durch Wandadsorption:* Eine starke Adsorption von Probenmolekülen an der Kapillarwand vermindert die Peakeffizienz und führt im Extremfall zu asymmetrischen Peaks mit starkem Tailing und schlecht reproduzierbarer Migrationszeit [66].
- *Effizienzverlust durch Überladung des Trennsystems:* Wenn zu grosse Probemengen (Volumenüberladung) oder zu hohe Probekonzentrationen (Massenüberladung) in das Trennsystem injiziert werden, sind Überladungsphänomene zu beobachten [66].
- *Effizienzverlust durch Überlagerung von Strömungsprofilen:* Die beiden Puffergefäße müssen auf gleicher Höhe sein. Eine Differenz führt zur Ausbildung eines parabolischen Strömungsprofils in der Kapillare. Dieser Effekt ist vom Kapillarradius abhängig [100].

2.2.3 Probenaufgabe

Voraussetzung für eine effektive Analysetechnik ist eine quantitative und reproduzierbare Probenaufgabe. In der CE werden nur winzige Probenvolumina im Nanoliterbereich benötigt um eine hohe Effektivität der Trennung zu erhalten.

Die Aufgabe der Probe könnte in drei Injektionsarten erfolgen:

- *Druck-Injektion* wird durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß und Kapillarende erreicht, wobei entweder beim Probengefäß der

Druck erhöht oder am Kapillarende der Druck verringert wird. Nachteilig bei der Vakuumtechnik ist zum einen, dass nur ein begrenztes Druckdifferential erzeugt werden kann, zum anderen können durch das Vakuum Blasen in der Kapillare gebildet werden.

- *Hydrostatische Injektion* wird durch Anheben des Probengefäßes an der Injektionsseite erzeugt. Durch den Siphoneffekt wird die Probelösung in die Kapillare gesaugt. Nachteilig bei der Höhendifferenz-Injektion ist, dass während der Zeit, in der das Probengefäß angehoben und wieder abgesenkt wird, ein Teil der Probe in die Kapillare fließt. Bei kurzen Injektionszeiten (1s bis 5 s) ist dieser Effekt nicht vernachlässigbar.
- *Elektrokinetische Injektion*: Wird durch Anlegen eines kurzen Spannungsintervalls zwischen dem Probengefäß und dem Puffergefäß, in denen die Kapillare eingetaucht ist, erzeugt. Die Probe wandert sowohl durch Migration als auch durch den EOF, in die Trennkapillare. Die injizierte Menge Q errechnet sich aus:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) \cdot U \cdot \pi \cdot r^2 \cdot c \cdot t_i}{L_{ges}} \quad (24)$$

wobei μ_e die elektrophoretische Mobilität der Probe, μ_{EOF} Mobilität des EOF, U die angelegte Spannung, c die Konzentration der Probe, t_i die Injektionszeit und L_{ges} die Gesamtlänge der Kapillare ist. Aus dieser Gleichung ist das Problem dieser Injektionsmethode, die Diskriminierung der Probenkomponenten unterschiedlicher Mobilität, ersichtlich [101].

2.2.4 Detektion

Die Detektion in der CE stellt eine besondere Herausforderung dar, bedingt durch die kleinen Dimensionen der Kapillaren und den damit verbundenen geringen

Probenmengen. Die meisten Detektionsmethoden sind denen der HPLC sehr ähnlich. Wie in der HPLC ist die UV-Vis-Detektion die meistverwendete.

2.2.4.1 UV-Vis -Detektion

Die Detektion basiert auf der Absorption eines Lichtes im ultravioletten oder sichtbaren Bereich (UV-Vis) „on-capillary“. Ein Licht mit einer bestimmten Wellenlänge und Intensität I_0 wird durch ein Fenster in der Kapillare gestrahlt. Die Probe absorbiert einen Teil des gestrahlten Lichtes und der restliche Teil, mit Intensität I , wird durch eine Photodiode detektiert. Die Absorption A ist durch das Lambert-Beersche Gesetz definiert:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (25)$$

wobei I_0 die Anfangsintensität des Lichtes, I die durchgelassene Intensität, ε der molare Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$], c die Konzentration der Probe und d der Lichtweg in der Probe, bei der CE also der Innendurchmesser der Kapillare ist. Das Lambert-Beersche Gesetz ist nur für verdünnte Lösungen gültig, weil der molare Extinktionskoeffizient ε einer Substanz bei einer Wellenlänge nur bei tiefen Konzentrationen konzentrationsunabhängig ist. Die strikte Einhaltung dieses Gesetzes wird auch nur mit monochromatischem Licht beobachtet.

Die kurze Weglänge des Lichtes durch die Kapillare limitiert die Empfindlichkeit in der CE. Der Lichtstrahl muss senkrecht in die Kapillare eingestrahlt werden und fokussiert sein, um die maximale Lichtausbeute zu erhalten und das Streulicht zu minimieren. In den meisten kommerziellen Geräten werden entweder Linsensysteme oder Spalten verwendet, um den Lichtstrahl zu fokussieren und es werden Kapillare ab einem Innendurchmesser von mindestens 50 μm verwendet.

Als Lichtquelle werden im UV-Vis-Bereich entweder kontinuierliche Strahler oder Linienstrahler eingesetzt. Kontinuierliche Strahler benötigen auch noch einen Interferenzfilter oder einen Monochromator, der das weiße Licht im Spektralbereich

spaltet, um eine bestimmte Wellenlänge zu wählen. Die Interferenzfilter haben normalerweise eine Bandbreite von 10 bis 15 nm, d. h. kein reines monochromatisches Licht. In diesem Fall muss die Absorption am Absorptionsmaximum des Analyten gemessen werden, um die Abweichung des Gesetzes so klein wie möglich zu halten. Als kontinuierliche Strahler werden Deuteriumlampen (190-400 nm), Halogenlampen (400-800 nm) oder Xenonlampen (250-700 nm) eingesetzt [102]. Als Einwellenlängenlichtquellen werden Quecksilberdampflampen (185 nm und 254 nm) oder Zinklampen (214 nm) eingesetzt. Die Lichtmenge kann bei diesen Lampen um das 50fache höher liegen als bei den sonst üblichen Deuteriumlampen. Darüber hinaus treten dann keine Verluste durch den Monochromator (durch Beugung am Gitter) oder den Interferenzfilter auf [66]. Seit einiger Zeit werden Leuchtdioden (LED), die einen geringeren Energieverbrauch haben und kleiner und robuster sind als die oben genannten Lampen, als Lichtquellen verwendet [103-109].

Als Empfänger dienen entweder Photodioden oder Photomultiplier. Die teuersten und empfindlichsten Photomultiplier sind Vakuumphotozellen, die über Dynoden (10-14) kaskadenförmig die Elektronen verstärken, die durch die Photonen wegen des Photoeffektes aus der Photokathode entfernt werden. Ihre Anzahl ist in einem weiten Bereich proportional zur Anzahl der auftreffenden Photonen. Diese vervielfachte Anzahl von Elektronen erzeugt an der Anode ein Signal. Die Photomultiplier sind für die Messung von schwächsten Lichtimpulsen hervorragend geeignet. Sie sind wegen des geringen Grundrauschens, der hohen Verstärkung und wegen des grossen Linearitätsbereichs die geeignetesten und meistverwendeten Detektoren für spektraloptische Analysengeräte und Lichtmessgeräte [102].

2.2.4.2 Leitfähigkeitsdetektion

Durch das Ohmsche Gesetz kann man, in guter Näherung, den elektrischen Strom in einer Elektrolytlösung berechnen:

$$I = \frac{U}{R} = U \cdot G \quad (26)$$

wobei I der Strom, U die angelegte Spannung, R der Widerstand und G die Leitfähigkeit der Lösung ist. Der Widerstand R einer Probe nimmt mit der Länge l des Leiters in der Kapillare zu und sinkt, wenn ihre Querschnittsfläche A vergrößert wird. Der Proportionalitätsfaktor wird spezifischer Widerstand ρ genannt

$$R = \frac{\rho \cdot l}{A} \quad (27)$$

Die spezifische Leitfähigkeit κ ist das Reziproke des spezifischen Widerstandes ρ , und ist gegeben durch

$$\kappa = \frac{l}{RA} = \frac{G \cdot l}{A} = \frac{I}{E \cdot A} \quad (28)$$

wobei E die elektrische Feldstärke $E=U/l$ ist. Zur Leitfähigkeit einer Lösung tragen sowohl die Kationen als auch die Anionen bei; sie hängt von der Anzahl der vorhandenen Ionen ab, und man führt deshalb die molare Leitfähigkeit Λ_m über die Beziehung

$$\Lambda_m = \frac{\kappa}{c} \quad (29)$$

ein, wobei c die molare Konzentration des gelösten Elektrolyten ist. Legt man zwischen zwei Elektroden, die in einer Salzlösung eingetaucht sind, eine Spannung U an, so wandern die Kationen zur Kathode und die Anionen zur Anode. Der Gesamtstrom ergibt sich aus der Summe dieser beiden Teilströme. Kohlrausch beschreibt dies in seinem „Gesetz von unabhängiger Ionenwanderung“ [110]:

$$\Lambda_m^0 = \nu_+ \lambda_+ + \nu_- \lambda_- \quad (30)$$

wobei Λ_m^0 für die molare Grenzleitfähigkeit (d. h. bei unendlicher Verdünnung), ν_i für die Anzahl des Kations bzw. Anions pro Formeleinheit des Salzes und λ_i für die molare Leitfähigkeit des jeweiligen Ions, die gleich $\lambda_i = F \cdot z_i \cdot \mu_i$, steht. Bei Kenntnis der

Mobilität μ_j der Ionen kann aus ihrer Konzentration c_j mit der Faraday Konstante F und der Ladung z der Ionen, die spezifische Leitfähigkeit des Elektrolyten κ berechnet werden.

$$\kappa = F \cdot \sum_{j=1}^n c_j \cdot z_j \cdot \mu_j \quad (31)$$

Bei Verwendung einer Messzelle mit zwei Elektroden mit Fläche A im Abstand l voneinander wird unter Verwendung der spezifischen Leitfähigkeit des Elektrolyten κ , die Leitfähigkeit G durch

$$G = \kappa \cdot \frac{A}{l} \quad (32)$$

gemessen.

Gemäss dem Ohmschen Gesetz (s. Gleichung 26) ist die Leitfähigkeit bei konstant angelegter Spannung proportional zum fließenden Strom. Um Elektrolysenreaktionen an den Elektroden und Potentialunterschiede an der Phasengrenzfläche zwischen Elektrode und Lösung zu vermeiden, werden die Messungen nicht bei Gleichspannung, sondern bei Wechselspannung durchgeführt. Die Differenz zwischen der Leitfähigkeit des Analyten und des Puffers wird gemessen. Je grösser diese Differenz ist, desto empfindlicher die Messung. Gleichzeitig, je grösser diese Differenz, desto schlechter die Bedingungen für die CE-Trennung, denn die maximale Peaksymmetrie ist nur dann gegeben, wenn die Leitfähigkeit von Analyt und Puffer gleich sind. Somit ist es notwendig einen Kompromiss zwischen ausreichender Empfindlichkeit und der Symmetrie des Peaks zu schliessen.

Die ersten Versuche mit Leitfähigkeitsdetektoren in der CE wurden von Mikkers [58] beschrieben. Es wurde ein Leitfähigkeitsdetektor aus der Ionenchromatographie mit einer Kapillare mit 200 μm I. D. verwendet und dem Zweck angepasst. Normalerweise wurden die Elektroden On-Column oder in End-Column-wall-jet arrangement positioniert. Für das erste System wurde mit einem Laser ein Loch durch

die Kapillare gebohrt und die zwei Elektroden wurden eine gegenüber der anderen senkrecht in der Kapillare fixiert, mit der Lösung dazwischen [111]. In der End-Column Methode wurde eine Elektrode teilweise noch in der Kapillare am Outlet positioniert und die andere Elektrode neben dem Kapillar-Outlet [112,113]. Ein Nachteil der Kontaktleitfähigkeit ist der, dass sie auf elektrophoretische Spannungen empfindlich ist. 1998 wurde eine grosse Verbesserung durch die kapazitiv gekoppelte kontaklose Leitfähigkeit (C^4D) erreicht. Zemann und Mitarbeiter [9], Fracassi da Silva und do Lago [10] positionierten, beide Gruppen unabhängig voneinander, die Elektroden nicht mehr in Kontakt mit dem Lösungen sondern auf der Kapillare. Die Kapillare wurde in zwei kurzen metallischen Rohren eingefädelt. Die Distanz zwischen den Elektroden war einige Millimeter und dazwischen befand sich eine geerdete metallische Platte, um das Rauschen und die kapazitiven Verluste zu verkleinern. Jede Elektrode verhält sich als Kondensator mit der internen Elektrolytlösung, wenn an der Anregungselektrode ein Frequenzoszillatorsignal grösser als 20 kHz angelegt wird. Die Leitfähigkeitszelle verhält sich als Kondensator-Widerstand-Kondensator (s. Abb. 2.7) [114] und wird in einem metallischen geerdeten Behälter positioniert, um das externe Rauschen zu vermeiden.

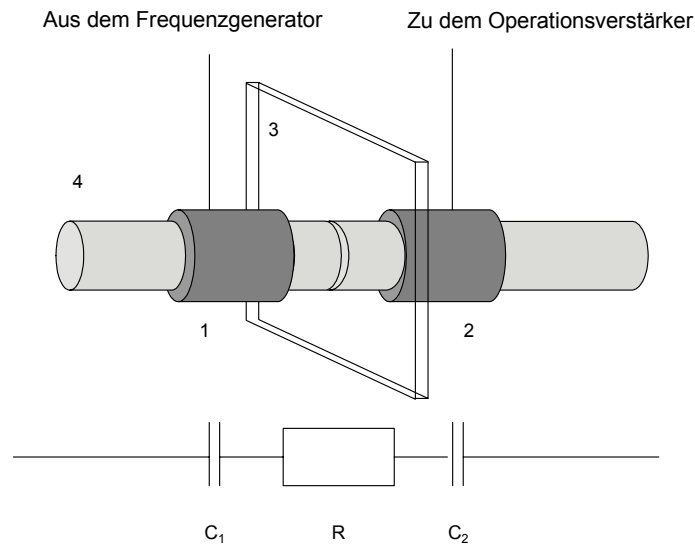


Abbildung 2.7: Die C⁴D Zelle. 1) Anregungselektrode, 2) Empfangselektrode, 3) geerdete Metallplatte 4) Kapillare.

Die Leitfähigkeitsänderung in der Innenkapillarzone zwischen den zwei Elektroden wurde gemessen. Der Aufbau dieser Leitfähigkeitszelle vereinfacht den Austausch der Kapillare. Zusätzlich kann auch die Position des Detektors sehr leicht variiert werden, weil die Polyimidbeschichtung der Kapillare nicht entfernt werden muss, wie das bei der UV-Vis-Detektion der Fall ist. In der letzten Zeit verbesserten Tanyanyiwa und Mitarbeiter die Nachweisgrenze dank der Hochspannungsverstärkung des Frequenzsignals an der Anregungselektrode [114,115]. Ein Grundstudium über den C⁴D wurde von Kuban und Hauser ausgeführt [116,117].

Ausführliche Beschreibungen über die kontaktlose Leitfähigkeit erschienen in verschiedenen Publikationen [118-120]. Die kontaktlose Leitfähigkeit wurde in der CE

schon für die Detektion z. B. von kleinen anorganischen Kationen [121,122], kleinen anorganischen Anionen [9,123,124], derivatisierten Carbonsäuren [125], Sulfonaten [114,126], Aminen [114], organischen Anionen und Kationen von Arzneimitteln [127], Aminosäuren [115,128], Kohlenhydraten (pH 13) [129] verwendet.

2.2.4.3 Andere Detektionsmethoden

- **Fluoreszenz**

Die Fluoreszenzeigenschaften von einigen Molekülen, die in der Regel mehrere konjugierte Doppelbindungen oder aromatische Gruppen enthalten, können als Detektionsmethode verwendet werden. Die fluoreszierenden Moleküle absorbieren Licht einer gewissen Wellenlänge und reemittieren in sehr kurzer Zeit Licht mit geringerer Energie, d.h. mit grösserer Wellenlänge. Grundsätzlich ist der Fluoreszenzdetektor dem UV-Vis-Detektor ähnlich, nur dass die resultierende Fluoreszenzstrahlung mit einem Winkel von 90° gemessen wird. Als Lichtquelle könnte auch ein Laser verwendet werden, um ein besser fokussiertes Licht und eine höhere Energieausbeute zu erreichen. Die laserinduzierte Fluoreszenz ist eine sehr empfindliche Detektionsmethode (bis zu 10⁻¹³ M) [64,130-132]. Nur wenige Moleküle fluoreszieren, so dass die Proben derivatisiert werden müssen.

- **Amperometrie**

Die amperometrische Detektion basiert auf der Anlegung eines konstanten Potentials an eine Elektrode. Elektroaktive Analyte erhalten (Reduktion) oder verlieren (Oxidation) Elektronen an der Elektrode und der resultierende Strom hängt von der Konzentration des Analyten in der Lösung ab. Generell hat die Amperometrie eine gute Nachweisgrenze, aber sie ist nur für elektroaktive Analyte verwendbar. Ausführliche Publikationen über die amperometrische Detektion sind in der Literatur zu finden [93,133-135].

- **Potentiometrie**

Potentiometrische Detektion basiert auf Potentialmessungen an den elektrochemischen Zellen ohne nennenswerten Stromfluss. Aus den gemessenen Spannungen, die der Nernstschen Gleichung folgen, lassen sich Aussagen über die Aktivität, und folglich über die Konzentration eines gesuchten Analyten machen. Generell verwendet man in der potentiometrischen Detektion ionenselektive Mikroelektroden, die den Nachteil haben, dass die Herstellung der Membran sehr schwierig und ihre Lebenszeit sehr begrenzt ist [130]. Ausführliche Publikationen über die potentiometrische Detektion sind in der Literatur zu finden [119,135,136].

3 Experimenteller Teil

3.1 Miniaturisiertes Fliessinjektionsanalysensystem (s. KAP. 4)

3.1.1 Hauptteil des Fliessinjektionsanalysensystems

In eine Polymethylmethacrylat-Platte (PMMA) von 50 x 110 mm (Irlen, Barcelona, Spanien) wurden Kanäle mit einer hohen Frequenzspindel (55 000 U/min) mechanisch eingefräst (V-förmiges Fräselement, R30 von Ray, Nänikon, Schweiz). Der Querschnitt des Kanals hatte eine Trapezform von ungefähr 150 μm Tiefe und eine Breite von 180 und 360 μm . Die Kanäle wurden mit einer zweiten PMMA-Platte mit Hilfe mehrerer Schrauben versiegelt. Dieses System hatte den Vorteil, dass man es öffnen konnte, um die Kanäle bei einer eventuellen Verstopfung zu spülen. Ein Schema ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

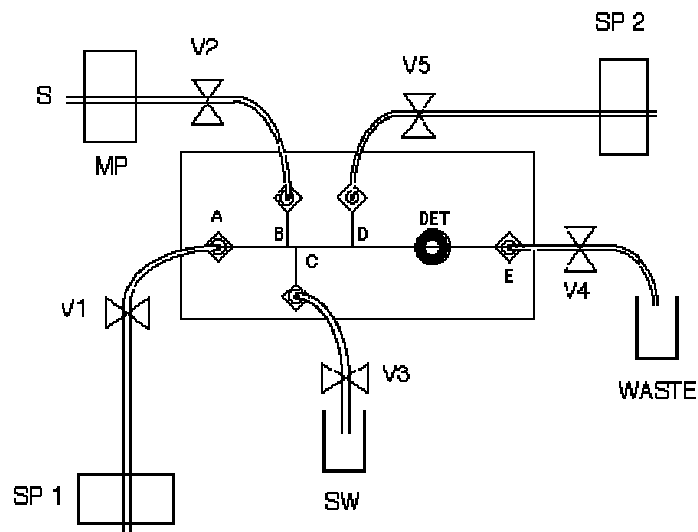


Abbildung 3.1: Schematischer Überblick von der PMMA Einheit mit optischer Detektion. DET: optische Zellen für zwei SMA Stecker Fasern; SP 1 Spritzenpumpe für den Hauptkanal; SP 2, Spritzenpumpe für den Seitenkanal; V1-V5, Ventile; S, Probe; SW, Probenabfall; MP,

Magnetpumpe für die Injektion der Probe. Abstand zwischen den markierten Punkten: A-B, 2 cm; B-C, 0.3 cm; B-D, 2 cm; D-E, 5 cm; D-DET, 2.5 cm; A-E, 9.3 cm.

Der Anschluss zum Kanalsystem wurde durch sechs ¼“-28 UNF Gewinde (A-E in Abb. 3.1) gegeben. Um die Reagenzien zu pumpen wurde ein BAS Bee-Hive Spritzenpumpensystem (BAS, West Lafayette, IN, USA) mit zwei 5 ml Kunststoffspritzen (Cosanum, Zürich, Schweiz) benutzt (SP 1 und SP 2 in Abb. 3.1). Fünf Magnetventile (LFVA 1230113H, V1-V5 in Abb. 3.1) wurden benutzt, um die Flüsse zu steuern und eine Magnetpumpe (LPLA 1230350L, MP in Abb. 3.1) (alles von LEE, Westbrook, CT, USA), um die Doppel-T-Sektion der Einheit (V2-B-C-V3 in Abb. 3.1) mit der Probe zu füllen und hydrodynamisch zu injizieren [54]. Dies erfolgte durch die Schliessung der Ventile V1, V4 und V5 während der Öffnung der Ventile V2 und V3. Durch die Magnetpumpe (MP) floss die Probe durch die Doppel-T-Sektion bis zum Probenabfall (SW). Zur Bestimmung selbst wurden die Ventile V2 und V3 geschlossen, gleichzeitig wurden die Ventile V1, V4 und V5 geöffnet und die Spritzenpumpen SP 1 und SP 2 aktiviert. Alle Ventile und Pumpen wurden durch ein Interface mit einem in FORTH (UR/FORTH, Laboratory Microsystems Inc., Marina del Rey, CA) geschriebenen Computerprogramm gesteuert.

Zur Detektion wurde die optische Absorption durch den Kanal gemessen. Als Lichtquelle wurde eine starke und helle grüne Leuchtdiode (LED) (Type NSPG500S; λ_{\max} : 500 nm, Halbwertsbreite: 30 nm) benutzt. Sie wurde bei Nichia Chemical Industries (Tokushima, Japan) erworben. Der Kunststoffdom der LED wurde geschnitten und die resultierende Fläche mit feinen Polierblättern poliert, um die Distanz zwischen Lichtquelle und Faser zu minimieren. Die LED wurde auf einen dreiachsigen Mikromanipulator (N. A38528 von Edmund Scientific, Barrington, NJ, USA), montiert um die Kopplung zwischen LED und den Fasern zu optimieren. Es wurden zwei 100 μm optische Fasern (FG-100-GLA von Thorlabs, Newton, NJ, USA) ohne fokussierende Elemente benutzt. Die anderen Enden der Fasern wurden mit

direkt einem Log-Verhältnis-Verstärker angeschlossen waren. Ein Schema des Log-Verhältnis-Verstärkers ist in der Abbildung 3.3 dargestellt. Der Verstärker wurde auch in der Literatur detailliert beschrieben [104,105,137,138]. Im Anhang 10.1 sind das Layout der Leiterplatte und dessen Komponenten gezeigt.

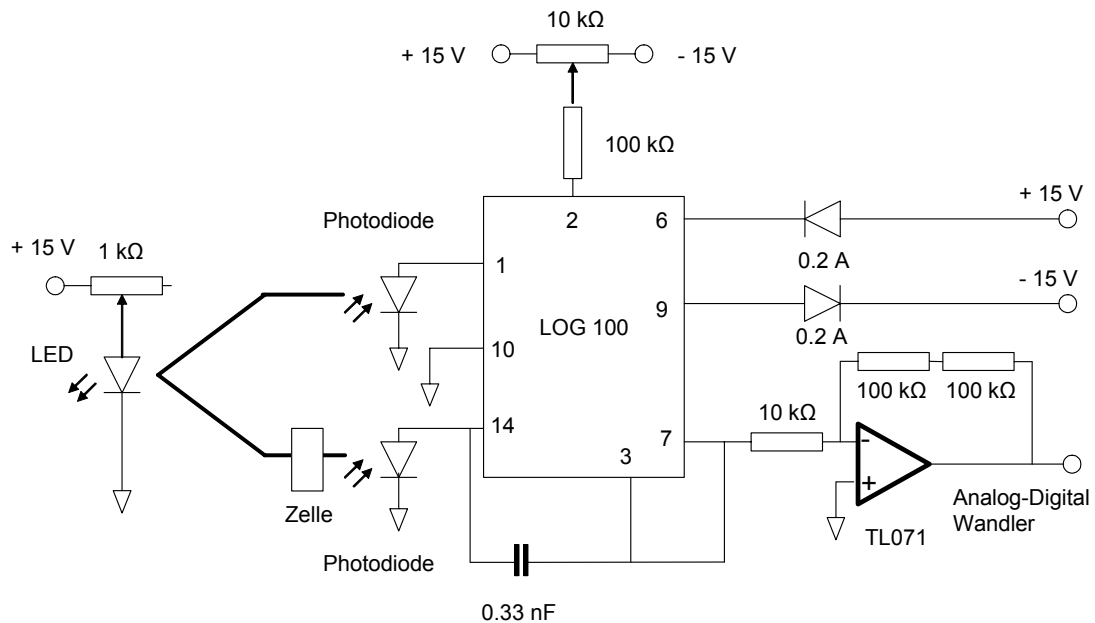


Abbildung 3.3: Schaltung für Absorptionsmessung.

Die Datenaufnahmen wurden mit einem MacLab System (ADInstruments, Hastings, UK) mit einem 7300/166 Power Macintosh Computer (Apple, Cupertino, CA, USA) aufgenommen. Abbildung 3.3 zeigt ein Foto des Gerätes.

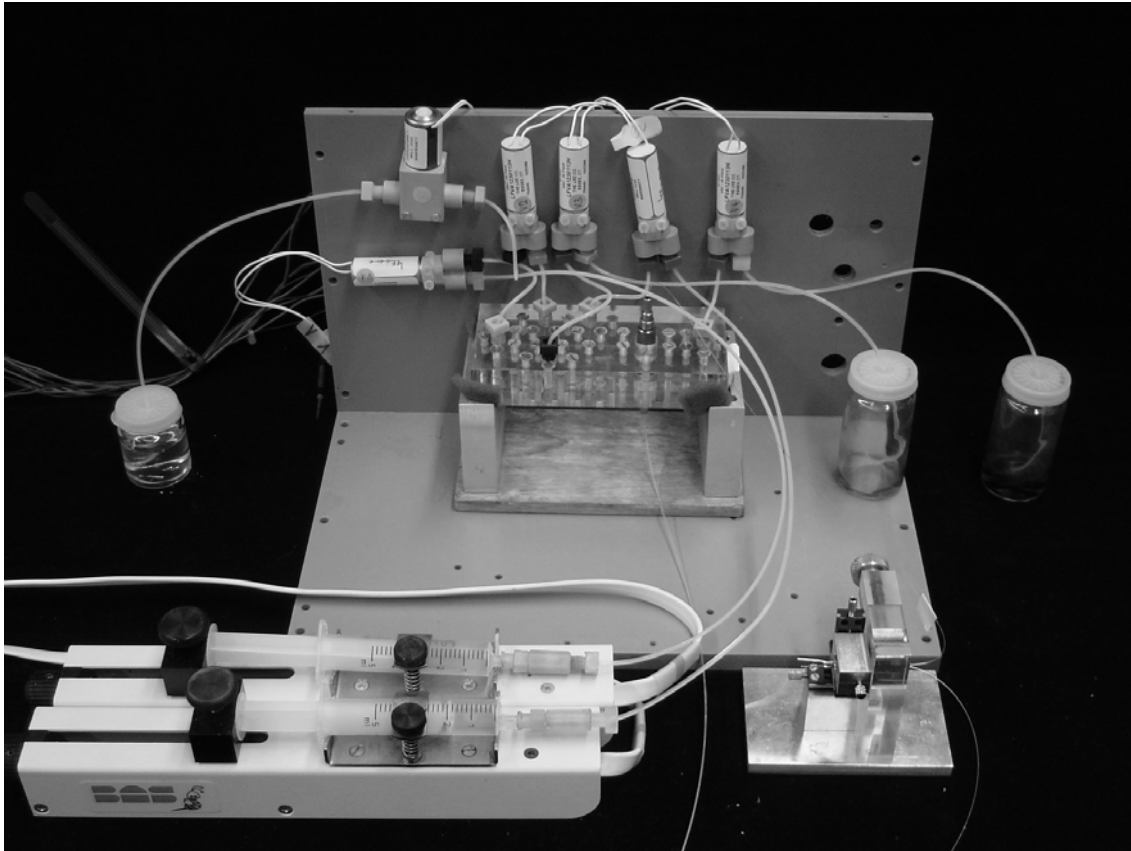


Abbildung 3.4: Fotografie des μ -FIA-Gerätes bestehend aus dem Plexiglas mit den Kanälen, einer Membranpumpe, zwei Spritzenpumpen, einer LED-Lichtquelle und fünf Ventilen.

3.1.2 Das Interface für die automatisierten Ventile und Pumpen

Zwischen Computer, Ventilen und Pumpen wurde ein kleines Interface gebaut. In einer Box (Breite: 20 cm, Höhe: 7 und Tiefe: 16 cm) wurden alle elektronischen Teile eingebaut. Der Computer sendete via Parallelport ein 8 Bit Signal (0 oder 1 für jedes Bit), d.h. den Pins 2-9 des DB 25 Steckers wurde ein oder kein Spannungssignal geliefert. Typischerweise sind 0 V für 0 (oder tiefes Signal) und 2.4 V- 5 V für 1 (oder hohes Signal). Mit 8 Kanälen konnte jedes Ventil und jede Pumpe separat gesteuert werden. Jedes Ventil und die Magnetpumpe hatten den gleichen Schaltkreis. Die Spritzenpumpen hatten einen anderen. Zur einfacheren Anschauung wurden nur der Teil

des Schaltkreises für ein Ventil (Abb. 3.5) und der Teil des Schaltkreises für eine Spritzenpumpe (Abb. 3.6) gezeichnet. In den Abbildungen ist immer eine DB 25 Buchse und ein Puffer, in diesem Fall eine integrierte Schaltung (IC). Der Puffer ist der gleiche für alle Ventile und Pumpen. Es ändert sich nur an welchem Pin der Puffer dem Schaltungskreis angeschlossen ist (s. Tabelle 3.1). Der gesamte Schaltungskreis beinhaltet einen Puffer-IC (SN74HCT244, Texas Instruments Incorporated, Dallas, TX, USA), eine Hauptschaltung, sechs Mal den Ventilschaltkreis und zwei Mal den Spritzenpumpenschaltkreis.

Bit	Pin Parallele Port	Eingang Puffer (Pin) → Ausgang Puffer (Pin)	Bestandteil	Dezimale Werte (Wenn Werte Bit = 1)
0	2	2 → 18	SP 1	1
1	3	4 → 16	MP	2
2	4	6 → 14	V1	4
3	5	8 → 12	V2	8
4	6	11 → 9	V3	16
5	7	13 → 7	V4	32
6	8	15 → 5	V5	64
7	9	17 → 3	SP 2	128

Tabelle 3.1: Verbindungen zwischen Parallelport, Puffer und Bestandteile.

Im Fall der Ventile und der Magnetpumpen wurde das elektrische Signal vom Puffer zu einem Optokoppler (PVA1354, International Rectifier, El Segundo, CA, USA) weitergeleitet. Ein Optokoppler ist eine LED und eine Photodiode im gleichen IC. Bei hohen elektrischen Signalen floss durch Pin 2 und 3 des Optokopplers (s. Abb. 3.5) Strom, demzufolge leuchtet die interne LED. Bei diesem Licht floss der Strom durch die Photodiode. Pin 5 und 8 verbanden sich, demzufolge wurde das Ventil an die 12V Leitung und die Erde-Leitung gekoppelt und so geöffnet. Wenn ein tieferes Signal

an den Optokoppler gelänge, würden sich die zwei Leitungen nicht verbinden und demzufolge würde das Ventil geschlossen bleiben.

Der Optokoppler wurde auch als Isolierung zwischen dem Computer und den Ventilen und Pumpen benutzt.

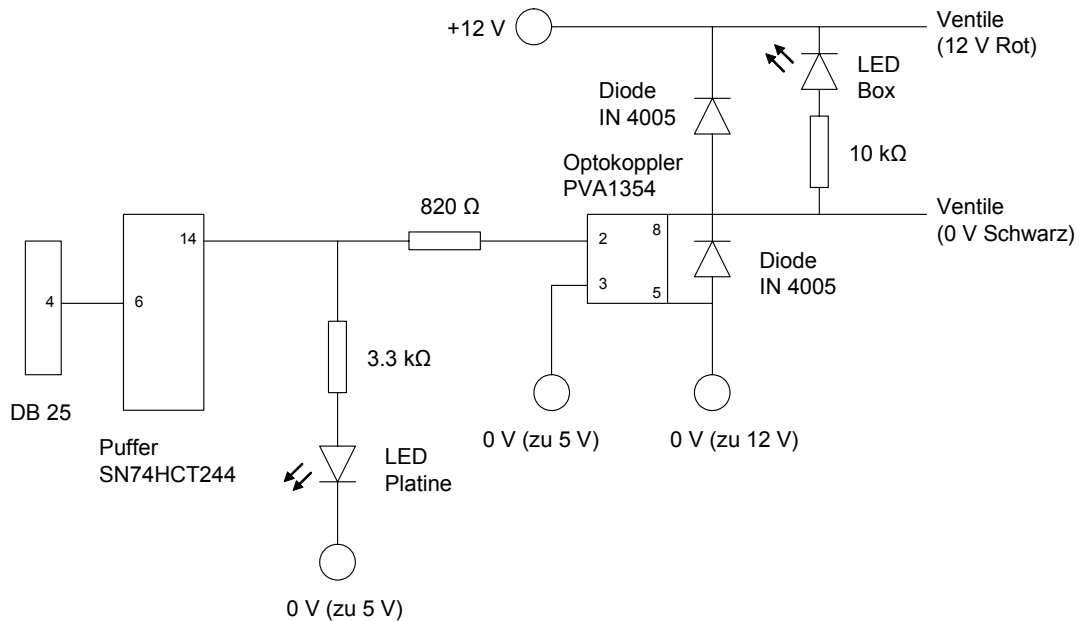


Abbildung 3.5: Schaltkreis des Interface: Teil Ventile oder Magnetpumpe.

Im Fall der Spritzenpumpen war die Schaltung komplizierter. Die mechanische dreipolige Schaltung der Bee-Hive Steuerung wurde durch eine elektronische ersetzt, um automatisch steuern zu können (s. Abb 3.6). Die elektronische Schaltung wurde von zwei Optokopplern und einem Transistor (BC237, ON Semiconductor, Phoenix, Arizona, USA) gebildet. Der Transistor wandelt das Signal von tief in hoch oder umgekehrt um, d. h. mit dem gleichem Signal verhalten sich die Optokoppler A und B komplementär, wie in Tabelle 3.2 gezeigt ist.

Elektrische Signale vom Computer	LED vom Optokoppler A	LED vom Optokoppler B	Bee Hive Schaltung : Verbindung zwischen Kabel	Spritzenpumpe Status
0	angeschaltet	ausgeschaltet	Gelb - Orange	Off
1	ausgeschaltet	angeschaltet	Blau - Orange	On

Tabelle 3.2: Elektrische Schaltung mit zwei Optokopplern.

Wenn die Spannung in Pin 18 des Puffers 5 V war, waren Pin 5 und 8 des Optokopplers B verbunden und folglich auch das blaue und orange Kabel des Bee Hives Kontrollers und folglich war SP1 angeschaltet (s. Abb. 3.6). Im Gegenteil, wenn die Spannung in Pin 18 des Puffers 0 V war, waren Pin 5 und 8 des Optokopplers A verbunden und folglich auch das gelbe und orange Kabel und somit war SP1 ausgeschaltet.

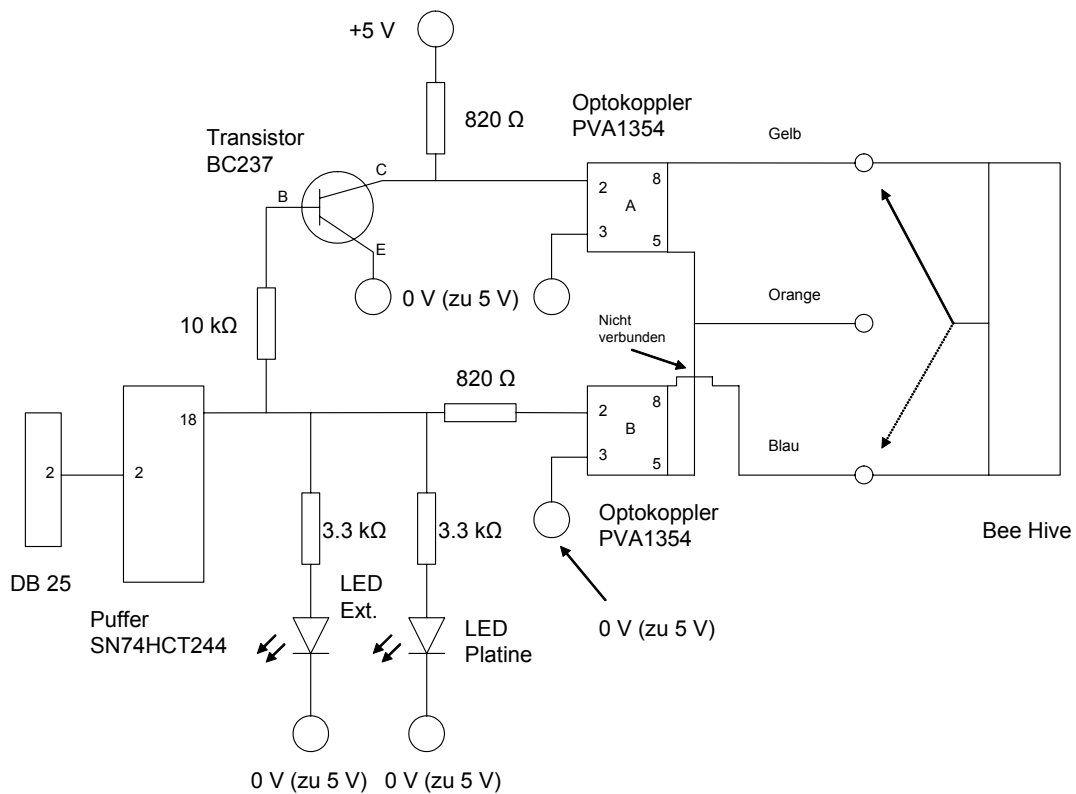


Abbildung 3.6: Schaltkreis des Interface: Spritzenpumpen Teil.

Zur Steuerung wurde ein einfaches Programm in FORTH geschrieben (s. Anhang 10.2). Es war eine Sequenz von zeitabhängigen Befehlen. Jeder Befehl sagte, welches Ventil zu öffnen war.

3.1.3 Methoden und Reagenzien

Zur Eisenbestimmung wurde die Methode von Mortatti und Mitarbeitern [139] angewendet. Die Reagenzlösung enthielt 12.3 mM 1,10-Phenanthrolin Monohydrat und 0.1 M Ammoniumacetat in deionisiertem Wasser. Der pH wurde mit Essigsäure bis 4.5 adjustiert. Die 200 ppm Eisenstandardlösung wurde durch die Auflösung von 1.404 g Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat in 50 ml Wasser und 20 ml konz. H_2SO_4 hergestellt und die anschließende Verdünnung auf 1 l. Die verschiedenen

Eisenkonzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungen der Stammlösung mit deionisiertem Wasser hergestellt.

Zur Bestimmung der gesamten Konzentration der Schwermetalle wurde die Methode von Regan und Mitarbeitern und Engström und Mitarbeitern [140,141] verwendet. Als Reagenz wurde eine Lösung von 2 mM 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR) und 10 mM Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure (TAPS) in deionisiertem Wasser mit pH 8.5 (mit NaOH adjustiert) verwendet. Die Schwermetallstammlösung bestand aus 1 mM ZnSO₄ und 1 mM CuSO₄.

Zur Nitritbestimmung wurde die zweistufige Methode von Anderson verwendet [17] (Abb. 3.7). Als Reaktionsmedium wurde eine Lösung mit 0.4 M Ammoniumchlorid und 0.3 M Natriumchlorid verwendet. Das Sulphanilamidreagenz (SP1 Spritze) bestand aus 1 g Sulfanilamid und 5 ml konz. HCl in 100 ml Reaktionsmedium gelöst. Als Reagenz (SP2 Spritze) wurde eine Lösung aus 0.1 g N-(1-Naphthyl)ethylendiamin und 4 g NaCl in 100 ml Reaktionsmedium verwendet. Als Stammlösung wurde 1 mM NaNO₂ Lösung in 0.7 M NaCl Lösung verwendet. Die verschiedenen Nitritkonzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungen der Stammlösung mit einer 0.7 M NaCl Lösung hergestellt.

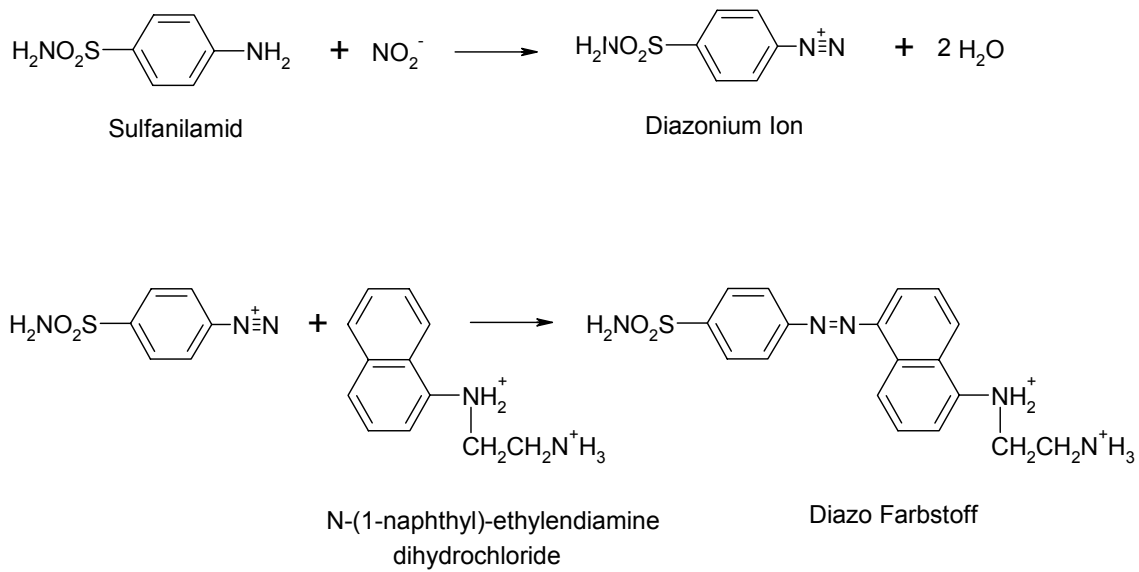


Abbildung 3.7: Zweistufige Reaktion zur Nitritbestimmung.

3.2 Tragbares Kapillarelektrophoresegerät (s. KAP. 5)

3.2.1 Geräteaufbau

Das Gehäuse (Breite: 419 mm, Höhe: 260 und Tiefe: 366 cm) wurde aus Plexiglas gebaut und in drei voneinander getrennte Kammern unterteilt; vorne links das Injektionsabteil, vorne rechts das Detektionsabteil und dahinter das Hochspannungs und Batterieabteil (s. Abb 3.8). An den beiden Seiten der Plexiglasbox sind zwei Aluminiumboxen angeschlossen; die linke mit der Steuerelektronik und die rechte mit der Detektorelektronik (s. Abb. 3.8) Das Gehäuse lässt sich an der Vorderseite mit zwei getrennten Klappen öffnen. Die Klappe an dem Injektionsabteil wurde mit einem Sicherheitsschalter versehen, so dass beim Öffnen der Klappe die Stromversorgung des Hochspannungsnetzteils unterbrochen wurde.

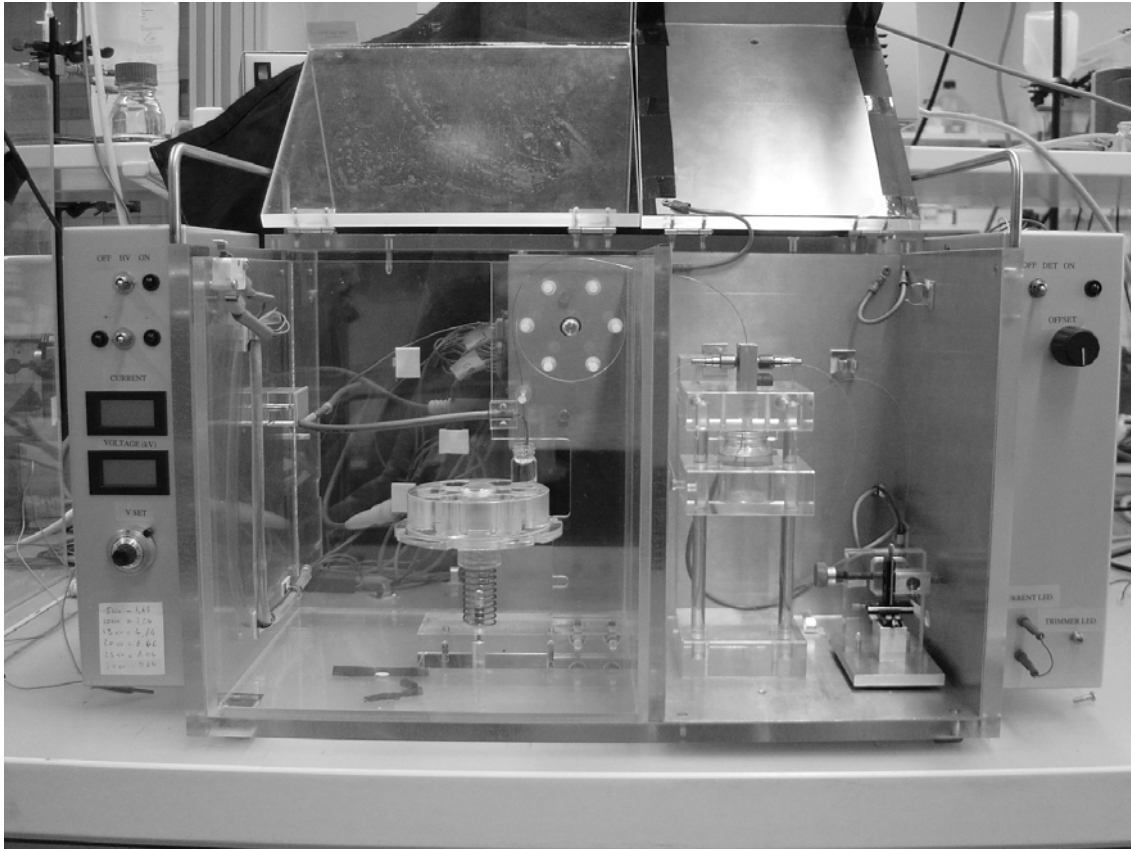


Abbildung 3.8: Fotografie des tragbaren Kapillarelektrophoresegerätes mit optischer Detektion.

Das Injektionsabteil enthält ein Karussell für 6 Proben- bzw. Puffergefäße und eine Vorrichtung zur Befestigung der Kapillare an der Hochspannungselektrode. Das Karussell wird durch eine Feder und einen Anschlag in konstanter Höhe gehalten und manuell bedient. Zum Gefäßwechsel wird es nach unten gedrückt und in die gewünschte Position gebracht. Die Hochspannungselektrode aus Platin und der Kapillaranfang sind an der Karussellhalterung festgeklemmt. Um ein Überspringen der Hochspannung zu vermeiden, ist die Elektrode bis auf 1 cm mit Schrumpfschlauch isoliert. Alle Befestigungen sind aus Kunststoff. Die Kapillare ist an sechs kreisförmig angebrachten Kunststoffstiften aufgewickelt, und das Kapillarende führt durch ein kleines Loch in das Detektionsabteil.

Das Detektionsabteil enthält eine Plexiglashalterung für die Zelle und das Gefäß, die LED Halterung und die Erdelektrode. Um die von aussen stammenden elektromagnetischen Interferenzen abzuschirmen, wurde das ganze Detektionsabteil mit geerdetem Aluminiumblech als Faraday-Käfig ausgekleidet. Die Zelle und LED-Halterung stammen von meinem Vorgänger. Eine detaillierte Beschreibung der Zelle ist auf Seite 83 [142] und diejenige der LED-Halterung ist auf Seite 52 [142] zu finden. Die Zelle und die Gefäßshalterung sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

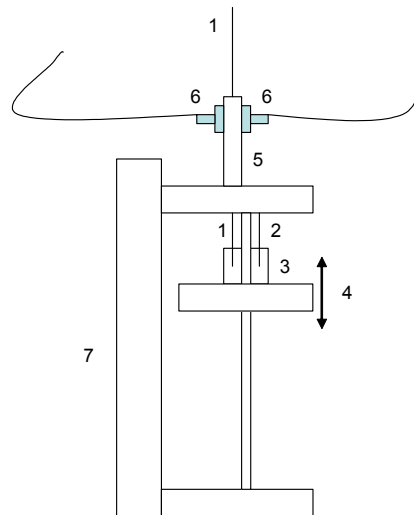


Abbildung 3.9: Zelle und Gefäßshalterung. (1) Kapillare. (2) Erdelektrode, (3) Puffergefäß, (4) verstellbare Gefäßshalterung, (5) Zelle, (6) SMA-Konektoren mit optischen Fasern und (7) Plexiglashalterung.

Als Anregungsfaser wurde eine Glasfaser von 50 μm Kern (FT-050-GLA, Thorlabs, Newton, NJ, USA) und als Sammelfaser eine mit einem 100 μm Kern (FC-

UV 100-2, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) verwendet. Als Lichtquelle wurden die folgenden LED verwendet:

Typ	Hersteller	Farbe/ Wellenlänge (nm)	Luminosität/mCd	Methode
NSPG500S	Nichia Corporation, Tokushima, JAPAN	Blau-Grün /500	20800	FIA (Eisen, Schwermetalle und Nitrit)
HLMP DH08	Agilent, Palo Alto, CA, USA	Rot / 630	31000	Methylgrün
NSPB500S	Nichia Corporation, Tokushima, JAPAN	Blau / 476	4120	Naphtolgelb
NSHU550E	Nichia Corporation, Tokushima, JAPAN	UV/ 370		Chromat

Tabelle 3.3: Verschiedene verwendete LED.

Für das Heraeus-Modul (UV-Vis Light Source FiberLight von Heraeus, Hanau, Deutschland) wurde in eine Aluminiumbox eine eigengefertigte Speisung eingebaut. Für die Versuche mit der Photomultiplieröhre wurden optische Fasern (FC-UV 100-2 und FCB-UV050-2, Ocean Optics), ein Filterbehälter (FH-Inline-UV, Ocean Optics) und ein Filter (254FS10-12.5, LOT- ORIEL, Romanel sur Morges, Schweiz) verwendet.

Im dritten Abteil, hinter dem Detektorabteil, ist ein Hochspannungsmodul (CZE2000, Spellman, Hauppauge, NY, USA) oben angeschraubt. Seine Aussenabmessung beträgt 89x127x254 mm. Damit konnten Spannungen mit positiver sowie mit negativer Polarität bis zu 30 kV generiert werden. Der Wechsel zwischen

positiver und negativer Polarität erfolgte durch einfaches Umlegen eines Schalters. Das Hochspannungsmodul wurde von einer 24 V Eingangsspannung betrieben und konnte mit zwei Bleiakkumulatoren (Yuasa NP2.0-12. Yuasa Battery, UK Ltd., Swindon, Wiltshire, GB) in Reihe geschaltet werden. Diese haben jeweils eine Ausgangsspannung von 12 V, eine Kapazität von 2.0 Ah, ein Gewicht von 700 g und Abmessungen von 150x84x20 mm. Sie sind unter dem Hochspannungsgerät in einem 1 cm Rahmen positioniert, um sie zu befestigen.

Das Aluminiumgehäuse für die Steuerelektronik wurde an der vorderen Wand mit den folgenden Elementen gebaut: Schalter HV ein/aus mit LED, Schalter Polarität mit respektiven LEDs, Stromanzeige, Spannungsanzeige (beide OEM33 von Anders Electronics, London, GB) und ein 10Gang Potentiometer für angelegte Hochspannung. Die hintere Wand wurde mit einer Buchse für die externe 24 V Spannung und einer Bananenbuchse für die Erde ausgerüstet.

Das Aluminiumgehäuse für die Detektorelektronik wurde an der vorderen Wand mit den folgenden Elementen gebaut: Schalter Detektor ein/aus mit LED, 10Gang Potentiometer für Log 100 Offset, 2 Buchsen für LED-Test Punkte und ein Trimmer für LED Strom. Die hintere Wand wurde mit einer LEMO Buchse und einer DB 9 Buchse für den Anschluss des Computers ausgerüstet. Im Aluminiumgehäuse wurde die Elektronik für die LOG 100 (Burr Brown, Tucson, AZ, USA) und für das Analog-Digital-Wandler-System (ADC 16 von Pico Technology Ltd., Cambridge, GB) untergebracht. In der Detektorelektronik wurde durch ein DC/DC Wandler (TED2422, Traco Electronic, Zürich, Schweiz) untergebracht, der die Spannung von 24 V auf ± 15 V reguliert, um die verschiedenen IC zu speisen. Die zwei Photoströme aus den Photodioden mit SMA-Buchse (N. 633-363 von RS Components, Corby, Northants, UK) wurden direkt mit der Log 100 angeschlossen um die Absorption direkt zu errechnen. Das Ausgangssignal der Log 100 wurde mit einer TL071 (Texas Instruments Incorporated, Dallas, TX, USA) zwanzig Mal verstärkt, d. h. 1 mV ist gleich 0.05 Absorptionseinheit (AU), bevor es mit dem Pico Datenerfassungssystem verbunden wird. Der Pico ADC 16 wurde über eine RS 232 Schnittstelle mit einem IBM-

kompatiblen Computer verbunden. Der Pico ADC 16 wurde aufgrund seiner geringen Grösse in das tragbare Kapillarelektrophoresegerät eingebaut. Es hat einen fixen Eingangsmessbereich von ± 2.5 V und die Auflösung kann zwischen 8 und 16 Bit eingestellt werden, wobei die maximale Messfrequenz mit der jeweiligen Auflösung gekoppelt ist. Die Belegung der Hardware-Verbindungen des Steuer- und Detektionsteils sind im Anhang 10.3 detaillierter beschrieben und das Layout des LOG 100 mit Photodiode im Anhang 10.1.

3.2.2 Photomultiplerröhre

Die Photomultiplerröhren (H5783-04, Hamamatsu Photonics K. K., Shimokanzo, Japan) wurden mit einer externen Spannung von +15 V gespeist. Durch einen kleinen elektrischen Schaltkreis wurde eine Spannung (max. 1 V) erzeugt, um die elektronische Verstärkung in der Röhre zu steuern (s. Abb. 3.10). Mit einem Trimmer und mit der Hilfe eines Multimeters konnte man die erwünschte Spannung des Vielfachers einstellen.

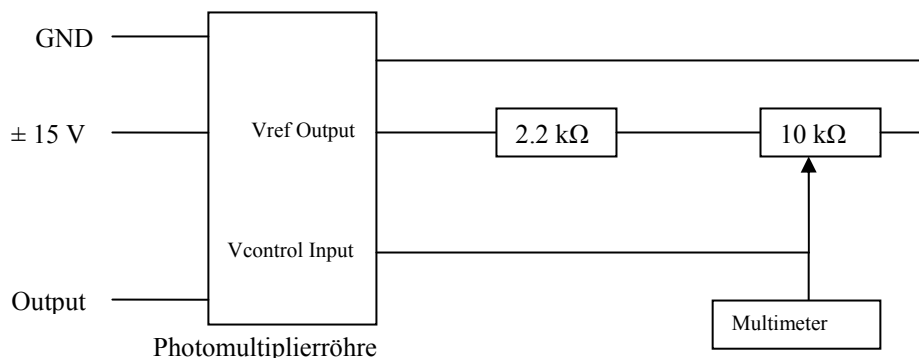


Abbildung 3.10: Schaltkreis für die Kontrolle der elektrischen Verstärkung.

Bei den Versuchen mit nur einer Photomultiplerröhre (PMT) wurde der Ausgang des PMT nicht direkt mit dem Analog-Digital-Wandler verbunden. Der Ausgang der PMT wurde zuerst in Spannung konvertiert, auf Null abgeglichen und mit einem Tiefpassfilter filtriert. Die Schaltung ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

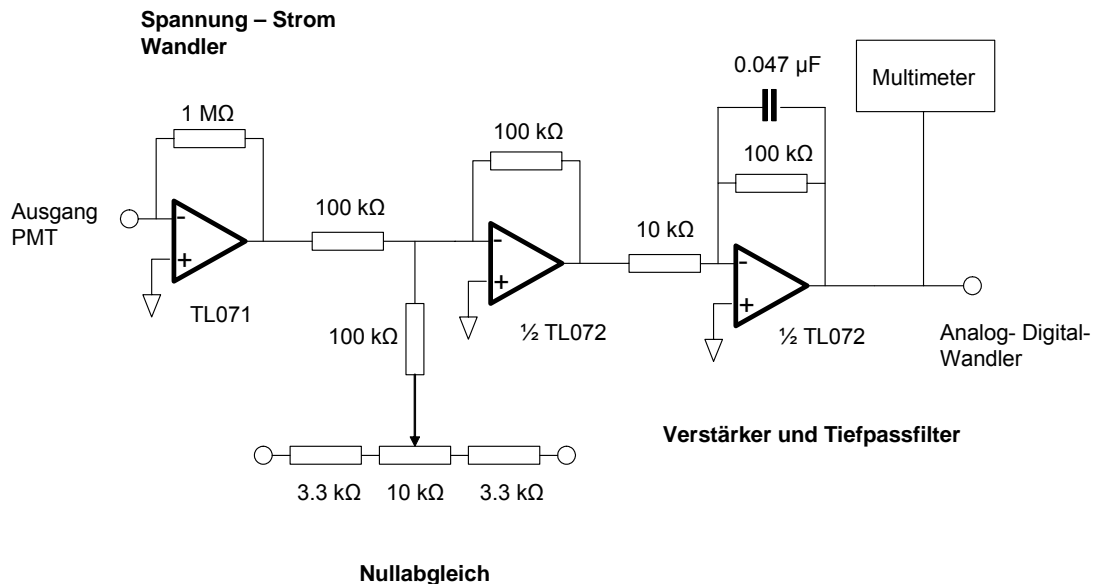


Abbildung 3.11: Schaltkreis von Nullabgleich und Tiefpassfilter.

Für die Versuche mit einer zweiten Photomultiplieröhre als Referenz wurde ein anderer Schaltkreis als die Log 100 IC hergestellt. Die Log 100 misst nur positive Ströme, aber der Ausgang der Photomultiplieröhre liefert einen negativen Strom, d. h. den PMT kann man nicht direkt anschliessen. Also musste man einen Operationsverstärker mit einem Rückwiderstand dazwischen schalten, um den Strom in Spannung umzuwandeln und das Vorzeichen zu wechseln ($V_o = -IR$). Dann brauchte man noch einen Widerstand mit dem gleichen Wert wie der Rückwiderstand, um die Spannung in Strom zurück umzuwandeln. Der Nachwiderstand und der Rückwiderstand mussten gleich sein, um keine Verstärkung zu erzeugen. In diesem Fall wurde ein Wert von 100 kΩ gewählt (s. Anhang 10.4). Als Lichtquelle wurde eine Hg-Lampe (HG-1. Ocean Optics) mit optischer Faser, für UV geeignet, verwendet.

3.2.3 Methoden und Reagenzien

Für die Elektrophoreseversuche wurden die Puffer und die Proben-komposition und -konzentration immer bei den dazugehörigen Abbildungen aufgeführt. Alle Substanzen stammen von verschiedenen Herstellern und wurden mit der analytischen Reinheitsklasse hergestellt. Alle Probelösungen wurden mit Puffer verdünnt, um einen Aufkonzentrierungsprozess zu vermeiden. Alle Lösungen wurden 15 Minuten in einem Ultraschallbad entgast und mit einem 0.45 μm Nylon Filter (BGB Analytik, Böckten, Schweiz) filtriert. Für die Vorbereitung aller Lösungen wurde deionisiertes Wasser (Millipore, Bedford, MA, USA) mit einer Leitfähigkeit von 18.2 mS cm^{-1} verwendet. Dank einer Spritze mit speziellem Kapillaradapter (Supelco, Buchs, Schweiz) wurde das System vor Gebrauch und nach dem Wechsel der Methode zuerst mit 0.1 M Natronlauge, dann mit Wasser gespült und mit dem Puffer gefüllt, um die Kapillare zu konditionieren. Für die Analysen mit dem UV-Detektor wurde ein Fenster in die Kapillare eingebracht. Die Polyimidschicht wurde 1 cm abgebrannt und bleibende gebrannte Reste wurden vorsichtig mit einem Papiertuch und ein bisschen Methanol entfernt.

Um Naphtholgelb S zu reinigen, wurde zuerst der Farbstoff in der kleinstmöglichen Menge warmen deionisierten Wassers gelöst. Dann wurde es filtriert, um die unlöslichen Teile zu trennen. Danach liess man es kristallisieren, filtrierte nochmals und trocknete es zuletzt in einem Exsikkator.

3.2.4 Herstellung der elektronischen Schaltung

Als erstes wurden der Schaltkreis und die Platine mit dem Programm EAGLE (Cadsoft, Pleiskirchen, Deutschland) gezeichnet. Eine Ätzvorlage wurde auf Spezialfolie (Farnell AG, Zürich, Schweiz) gedruckt und nebenbei wurde für den späteren Gebrauch ein Bohrfile erzeugt, immer mit EAGLE. Die Folie wurde in ein UV-Belichtungsgerät (UV2M, Farnell AG, Zürich, Schweiz) gelegt. Die photoresistente beschichtete Leiterplatte ohne Schutzfolie (Bungard Elektronik GmbH Windeck, Deutschland) wurde mit der aktiven Seite auf die gedruckte Folie positioniert und für

drei Minuten belichtet. Die belichtete Platte wurde zur Entwicklung in ein Bad (RP25 (1:4), Relamatic, Glattbrugg, Schweiz) eingetaucht. Nach einigen Minuten sah man das Layout auf der Platte. Mit einem ca. 50°C warmen Gemisch, bestehend aus 1540 ml Wasser mit 400 ml konz. HCl (35%) und 60 ml H₂O₂, wurde die Platte geätzt. Nach einigen Minuten blieben nur die erwünschten Kupferbahnen übrig. Mit einer automatischen Bohrmaschine (Diadrive 2000, MUTRONIC Präzisionsgerätebau GmbH & Co., Rieden am Forggensee, Deutschland) wurde mit Hilfe der Software Cenon PCB (vhf camfacture GmbH, Ammerbuch-Altingen, Deutschland), EdiTask (Trimeta Software, Weil der Stadt, Deutschland) und des zuvor entwickelten Bohrfiles, die Platine fertig gebohrt. Als Letztes wurde die Platine mit den elektrischen Komponenten ergänzt.

3.3 Automatischer Injektor für die Kapillarelektrophorese (s.KAP.6,7,8)

3.3.1 Geräteaufbau

Der Injektorhauptteil basierte auf einer Kopplung zwischen μ -HPLC und CE, wie von Hooker und Mitarbeitern [143] beschrieben, und wurde aus einer Polycarbonat-Scheibe mit 4 cm Durchmesser und 1.2 cm Dicke gefertigt, auf der zwei 1/16 Zoll senkrechte Kanäle gebohrt wurden. An jedem Kanalende wurden vier 1/4"-28 Gewinde zur Verschraubung (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA) eingedreht. Der Pufferfluss wurde in das Kreuz durch ein PEEK-Rohr mit 1/16 Zoll Aussendurchmesser und 0.5 mm Innendurchmesser eingefügt. Die Kapillare für die Analyteinführung (75 μ m) und die Trennkapillare (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA; 15, 25, 50, 75 μ m I. D., 360 μ m O.D.) wurden in einem Kunststoffrohr von 395 μ m I. D. und 1/16 Zoll O.D. (F 242, Upchurch) mit Fitting befestigt. Der Abfallfluss fließt durch ein geerdetes Edelstahlrohr (U 116, Upchurch; 0.75 mm I.D. und 1/16 O.D.) weg. Die Kreuzscheibe wurde senkrecht aufgestellt, mit dem Abfallrohr ganz oben positioniert, um eventuelle Luftblasen besser zu evakuieren. Während der Entwicklung des Injektors

wurden verschiedene Pumpen und Ventile verwendet, die in folgender Tabelle zusammengefasst sind:

Kapitel	Analytpumpe	Pufferpumpe	Ventil Typ	ø Analytrohr
6.2 HPLC Pumpe	DXPSI, (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA)	Model 2200 (Bischoff, Leonberg, Deutschland)		0.125 mm
6.3.1 Vier 2- Weg Ventile	Bee-Hive, (BAS, West Lafayette, IN, USA)	Bee-Hive, (BAS, West Lafayette, IN, USA)	LFVA 1230113H (LEE, Westbrook, CT, USA)	0.125 mm
6.3.2 Zwei 3- Weg Ventile	Bee-Hive, (BAS, West Lafayette, IN, USA)	Bee-Hive, (BAS, West Lafayette, IN, USA)	MAT031 (NResearch, West Caldwell, NJ, USA)	0.125 mm
6.3.3 Hydrostatische Pumpe	10 ml Spritze, 40 cm über dem Kreuz	500 ml Flasche, 84 cm über dem Kreuz	225P091-21 (NResearch, West Caldwell, NJ, USA)	0.250 mm
6.3.4 4-Offene 4-Geschlossene Pinch Ventil	Bee-Hive, (BAS, West Lafayette, IN, USA)	Bee-Hive, (BAS, West Lafayette, IN, USA)	225P081-11 (NResearch, West Caldwell, NJ, USA)	75 µm Kapillare

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der verwendeten Ventile und Pumpen.

Zum Anschluss von Pumpen, Ventilen und Kreuz wurden Teflonschläuche mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm verwendet. Für die Spritzenpumpen wurden eine 5 ml Hamiltonspritze für den Analyten und eine 10 ml Hamiltonspritze (1000Series GASTHIGHT, TTL; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) für den Puffer verwendet. Am Injektionsende der Trennkapillare wurde, wie schon oben erwähnt, der Abfluss aus Edelstahlrohr als Erdelektrode verwendet und am Detektionsende der Kapillare wurde ein Platindraht als Hochspannungselektrode verwendet. Wegen dieser umgekehrten Positionierung der Elektroden; musste man auch die Polarität der Hochspannung umkehren. Für das bessere Verständnis, wurde in den Abbildungen der nächsten Kapitel immer die Polarität gezeigt, die die Elektroden in der normalen Position haben würde. Der gleiche Gefässbehälter, wie in Abbildung 3.9 dargestellt, wurde mit einer kleinen Veränderung verwendet, um die Hochspannungselektrode und die Kapillare besser zu befestigen (s. Abb. 3.12). Dieser Behälter wurde auf einen Laborboy positioniert, um die gleiche Höhe des Kreuzes zu erreichen und zusätzlich in eine Plexiglasbox gestellt, welche mit einer Sicherheitsschaltung versehen ist, die das Spannungsgerät bei Öffnen der Klappe abschaltet.

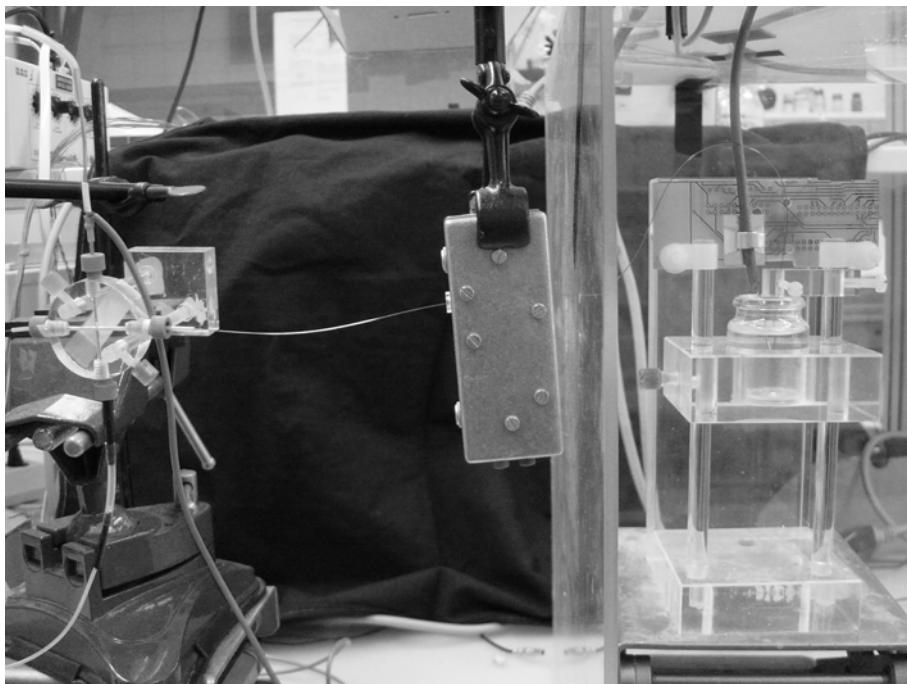
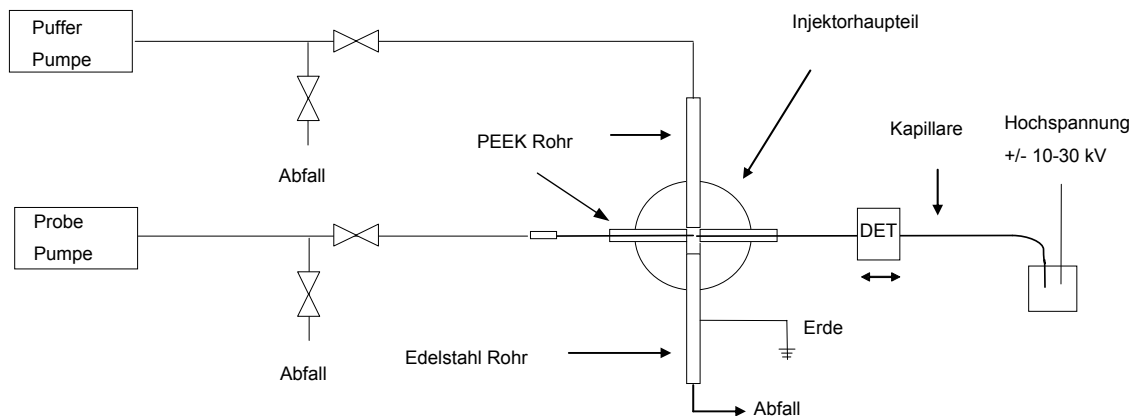


Abbildung 3.12: Oben: Schematischer Überblick des CE-Systems mit der Schnellinjektion. Unten: Fotografie eines Teils des CE-Gerätes mit der Schnellinjektion, bestehend aus einem Kreuzteil für die Injektion, der Kapillare, der Zelle des Leitfähigkeitsdetektors und der „Outlet“ Seite der Kapillare mit dem Puffergefäß und der Hochspannungselektrode.

Es wurden das Hochspannungsgerät und der Steuerteil der gebauten tragbaren Kapillarelektrophorese (s. Kap 3.2.1) verwendet. Um die Injektion zu automatisieren,

wurde in den FIA-Versuchen (s. Kap 3.1.2) das Interface mit einigen Modifikationen (s. Anhang 10.5) verwendet. Spritzenpumpen, Ventile und das Hochspannungsgerät wurden mit einem LabVIEW-Programm (LabVIEW, National Instruments, Austin, TX, USA) (s. Anhang 10.6) für IBM-kompatiblen Personal Computer mittels einer Multifunktions-Datenerfassungskarte (DAQCARD-6024-E, National Instruments, Austin, TX, USA) und einem selbstgemachten SCSI 2 (854-013, Farnell AG, Zürich, Schweiz)-parallel Kabel gesteuert (s. Anhang 10.5). Mit Windows 2000 und Windows XP mussten die Driver AccessHW installiert werden, um den Parallelport mit dem digitalen Output von LabVIEW zu benutzen. Diese Driver konnten von der National Instrument Webseite (www.ni.com) heruntergeladen werden. Zum Testen des Programms, ohne den Computer an das Interface anzuschliessen, musste ein DB 25 Stecker an der parallelen Port des Computers angeschlossen werden. Dieser Stecker wurde mit dem Pin 11 (Busy) und 12 (Paper Error) und mit dem Pin 25 (die Erde) verbunden. Als Datenerfassungssystem wurde Maclab/4e System (AD Instruments, Castle Hill, Australien) mit einem Macintosh Computer (Apple, Cupertino, CA, USA) verwendet.

Die Detektion wurde mit einem kommerziellen UV- Detektor (Spectra 100. Thermo Separation Product, San Jose, CA, USA), einem kommerziellen Optischen-Faser-UV-Detektor (Filterphotometer K-2001, Knauer, Berlin, Deutschland) mit einer Kapillarzelle (CE1-Js, J&M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen, Deutschland) oder mit einem selbstgebauten kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor (s. Kap 3.3.3) durchgeführt. Die minimale effektive Kapillarlänge ist 4 cm und die minimale totale Länge hängt vom Detektor ab. Bei dem UV-Detektor von Knauer und dem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor ist sie ca. 20 cm und bei dem UV-Detektor von Spektrophoresis ca. 39 cm.

3.3.2 Injektionsmethode

Die Injektion wurde in folgenden Schritten ausgeführt. Zuerst wurde der Analyt in den Raum vor der Trennkapillare gepumpt, während der Pufferfluss gestoppt wurde.

Gleichzeitig wurde die Hochspannung für eine gewisse Zeit angeschaltet, um den Analyten elektrokinetisch zu injizieren. Dann wurden die Hochspannung und die Analytpumpe ausgeschaltet und die Pufferpumpe eingeschaltet. Am Ende, um das Kreuz zu spülen, wurde einige Sekunden gewartet, bevor man die Trennungsspannung anschaltete. Zur Vermeidung der pH-Änderung durch die Elektrophorese blieb die Pufferpumpe während der ganzen Analysenzeit angeschaltet.

3.3.3 Kontaktloser Leitfähigkeitsdetektor

Der kontaktlose Leitfähigkeitsdetektor bestand aus einem Frequenzgenerator, einem Spannungsverstärker, einer Zelle und einem Detektorteil. In ein Aluminiumgehäuse (Breite: 20 cm, Höhe: 7 und Tiefe: 16 cm) wurden die drei Platinen des Leitfähigkeitsdetektors eingebaut. In den Schaltkreisen in Abbildung 3.13 sind die drei Platinen mit gepunkteten Linien aufgezeigt. Der Stromspannungswandler OPA606 (Burr Brown, Tucson, AZ, USA) wurde in ein separates Metallgehäuse eingebaut, um ihn vor Umgebungsstörungen zu schützen. Der Leitfähigkeitsdetektor wurde mit ± 15 V gespeist. Die Schaltung wurde in folgende Bereiche aufgeteilt: Ein Frequenzgenerator, der eine Sinusspannung erzeugt, einen Hochspannungsverstärker, der die Amplitude verstärkt, die dann an die Anregungselektrode angelegt wird. Die Empfangselektrode wurde über einen Stromspannungswandler mit einem Synchrondetektor verbunden, der das Signal von Störfrequenzen befreit und gleichrichtet. Danach geht das Signal durch einen Tiefpassfilter 2ter Ordnung, einen Nullabgleich, einen Verstärker und noch einen Tiefpassfilter 2ter Ordnung (s. Abb. 3.13).

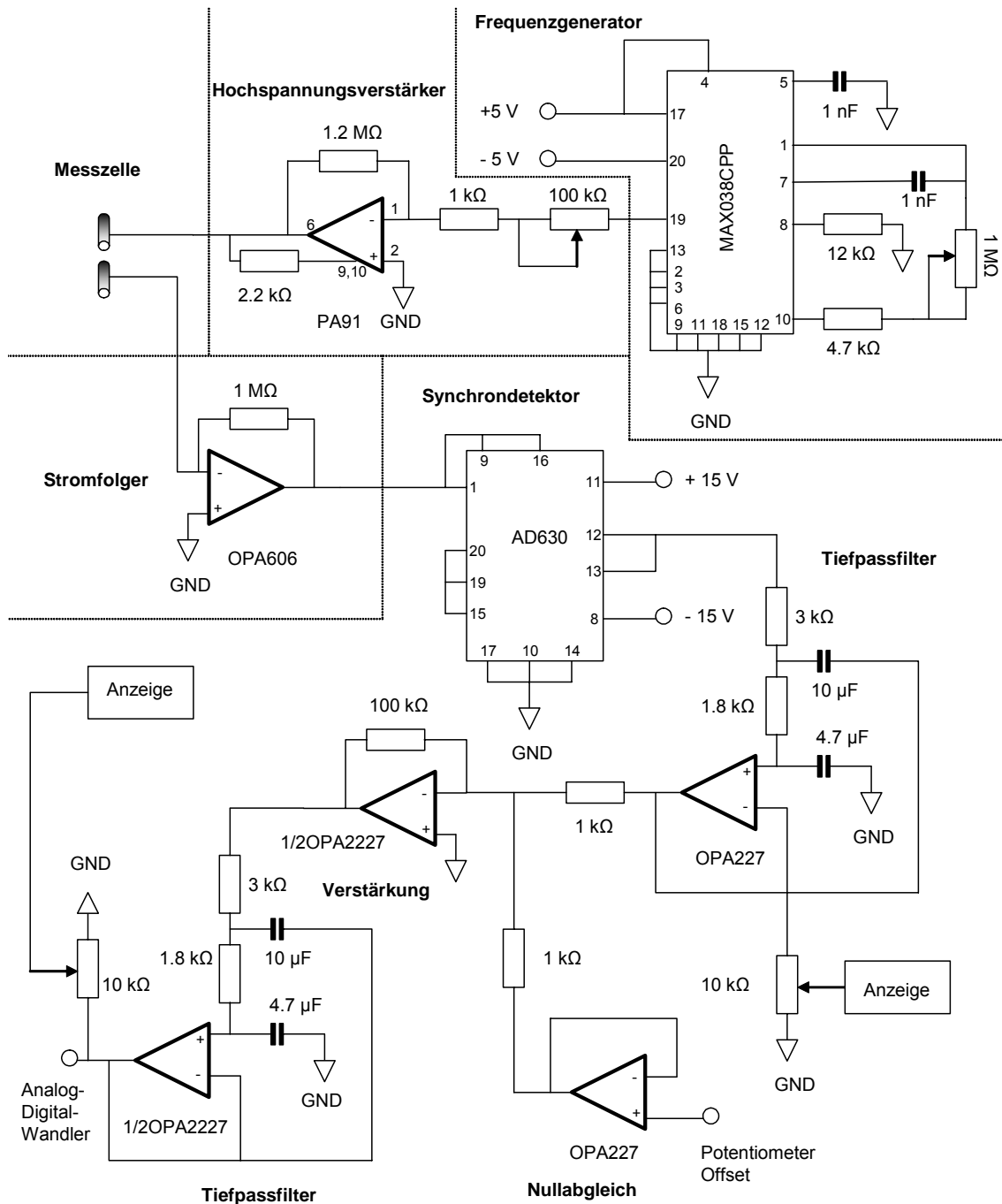


Abbildung 3.13: Schaltkreis des kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektors.

Als Frequenzgenerator wurde ein MAX038CPP (Maxim Integrated Products, Sunnyvale, CA, USA) verwendet, der, dank den zwei Spannungswandlern (LM7905CT und LM7805, Fairchild Semiconductor Corporation, South Portland, ME, USA), mit ± 5 V gespeist wurde. Mit einem $1\text{ M}\Omega$ Trimmer konnte die Frequenz der Sinuswelle zwischen 10 und 100 kHz eingestellt werden. Mit Hilfe eines Hochspannungsverstärkers (PA91, Apex Microtechnology, Tucson, Arizona, USA) mit einem passiven Kühlkörper (Distrelec AG, Nänikon, Schweiz), konnte die Amplitude bis 450 V eingestellt werden. Eine externe + 12 V Spannung wurde durch einen Hochspannungswandler (F04CT, EMCO High Voltage Corporation, Sutter Creek, CA, USA) in 450 V (± 225 V) umgewandelt, um dem Hochspannungsverstärker zu speisen. Die Zelle besteht aus zwei geschnittenen Nadeln (0.4 mm I.D., 0.6 mm O.D, Terumo europe, Leuven, Belgien) von 4 mm Länge, die an einen Kanal mit zwei Klammern befestigt wurden. Zwischen den Klammern und den Nadeln wurde ein Stück Kupferfolie (Bungard Elektronik GmbH Windeck, Deutschland) gelegt, um die Elektrode und die elektrische Schaltung zu verbinden. Um die Elektroden elektrisch zu trennen, wurde eine einseitig geerdete Kupferwand (0.5 mm, Bungard Elektronik GmbH, Windeck, Deutschland) eingefügt. Die Anregungselektrode wurde mit der isolierten Seite der Wand in Kontakt gebracht und die Empfangselektrode wurde 1,5 mm von der Kupferwand entfernt positioniert (s. Abb. 3.14). Für die Verbindungsleitung von und zu der Messzelle wurden via Lemo- Anschlüsse (Typ 00, LEMO S.A., Ecublens, Switzerland) abgeschirmte Kabel verwendet.

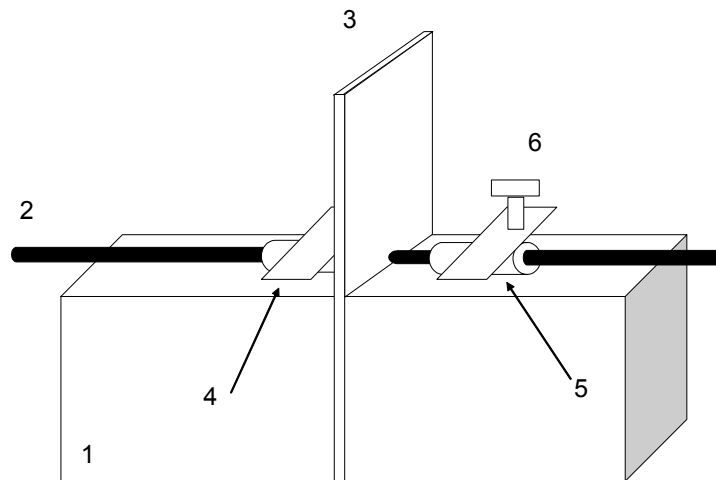


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Leitfähigkeitszelle.

- 1) Plexiglashalterung mit einem Kanal für die Kapillare. 2) Kapillare. 3) Kupferwand. 4) Anregungselektrode. 5) Empfangselektrode. 6) Befestigung der Elektrode mit einer Kupferfolie als Kontaktbrücke (nicht gezeichnet)

Die Empfangselektrode wurde mit einem Operationsverstärker verbunden, der den Ausgangswechselstrom der Messzelle in Wechselspannung umwandelt. Ein Synchrondetektor (AD630, Analog Devices, Norwood, MA, USA) filterte aus dem Signal die gewünschte Frequenz, nämlich die Anregungsfrequenz, und unterdrückte alle anderen Frequenzen. Gleichzeitig wurde das Signal gleichgerichtet. Danach folgte ein Tiefpassfilter 2ter Ordnung mit einer Grenzfrequenz von 10 Hz. Danach folgten ein Nullabgleich und ein Verstärkungsschritt. Die Ausgangsspannung des Tiefpassfilters 2ter Ordnung wurde dank eines Widerstands in Strom umgewandelt und mit einem externen kompensierenden Strom addiert, um das Signal auf Null abzugleichen. Dann wurde das Signal 100 Mal verstärkt und vor dem Analog-Digital-Wandler (MacLab, ADInstruments, Castle Hill, Australien) nochmals durch einen Tiefpassfilter 2ter

Ordnung gesendet, der der gleiche wie der erste war. Nach jedem Tiefpassfilter 2ter Ordnung wurde die Spannung an eine Anzeige (OEM33, Anders Electronics, London, UK) angeschlossen. Als Erstes wurde die Pick-up Spannung angezeigt und als Zweites die Ausgangsspannung des Leitfähigkeitsdetektors. Im Anhang 10.7 sind das Layout der Leiterplatte und dessen Komponenten gezeigt.

4 Automatisierte hydrodynamische Injektion für ein Fliessinjektionsanalyzesystem im Mikromassstab

4.1 Hintergrund

Das erste Projekt war das Automatisieren der Injektion eines Fliessinjektionsanalyzesystems im Mikromassstab (μ FIA), die von meinem Vorgänger (Richard Stratz) gebaut war. Die Injektion der miniaturisierten Fliessinjektionsanalyse wurde ohne grossen apparativen Aufwand gebaut. Die Probe wurde hydrodynamisch injiziert. Die Spritzen und die Ventile waren früher manuell betrieben und jetzt wurden sie mit Computer gesteuert. Das Ziel war es, das Injektionssystem zu automatisieren, um die Präzision zu verbessern.

4.2 Charakterisierung der μ -FIA-Einheit

Wie schon in der Theorie erwähnt, waren laminare Strömungsbedingungen notwendig, um einen reproduzierbaren Probentransport in dem Kanal zu erzeugen. Um die Reynoldszahlen zu bestimmen, wurde zuerst die Fläche des trapezoidalen Kanals (Basis: 0.36 mm und 0.18 mm und Höhe: 0.15 mm) berechnet. Danach wurde der Durchmesser eines kreisförmigen Kanals mit der gleichen Fläche des trapezoidalen Kanals bestimmt. Das entsprach einem Durchmesser von ca. 0.2 mm. Mit diesem Durchmesser konnte man nun die Reynoldszahl berechnen. Bei schnelleren Strömungen war die Wahrscheinlichkeit grösser, einen turbulenten Strom zu erzeugen. Die grösste erzeugbare Flussgeschwindigkeit mit der benutzten Spritzenpumpe war 100 μ l/min, was einer Geschwindigkeit von $4 \cdot 10^{-2}$ m/s entspricht. Die kinematische Viskosität ν_k für Wasser ist 10^{-6} m²/s [144]. Mit diesen Parametern war die Reynoldszahl (s. Gleichung 3) gleich 8. Diese R_e -Zahl ist sehr klein gegenüber der kritischen R_e -Zahl von 2100 [14]. Man kann also von einer laminaren Strömung ausgehen.

Das Resultat der Berechnung des Dispersionskoeffizienten (s. Gleichung 5) war 1.5, d. h. es bestand eine begrenzte Dispersion. Mit dem Wert 1 besteht keine merkliche Vermischung von Reagenz und Probe. Bei den meisten Fliessinjektionsanalysen müssen das Reagenz und die Probe reagieren, um detektiert zu werden, deswegen ist es notwendig, dass der Dispersionskoeffizient grösser als eins ist. Das gebaute μ FIA-System besteht aus einem Seitenkanal, der sich nach der Injektionszone mit dem Hauptkanal verbindet (s. Abb. 3.1). Bei einer einfachen Reaktion wurde der Seitenkanal mit dem gleichen Reagenz des Hauptkanals befüllt, um eine zusätzliche Durchmischung zu erzeugen. Bei einer zweistufigen Reaktion, wie bei der Nitritbestimmung (s. Abb. 3.7), konnte der Seitenkanal mit einem zusätzlichen Reagenz befüllt werden. Somit konnte das System sowohl bei einstufigen wie auch bei zweistufigen Reaktionen benutzt werden.

4.3 Resultate

Um die Automatisierung des Injektionssystems zu testen, wurden drei Bestimmungen durchgeführt.

Die erste Bestimmung war die Eisen mit der Phenanthrolinmethode: Das Eisen (II) komplexiert mit dem Phenanthrolin und ergibt einen roten Farbstoff. In einer Minute wurden fünf Analysen durchgeführt (s. Abbildung 4.1). Die Flussgeschwindigkeit der Spritzenpumpen betrug $10 \mu\text{l min}^{-1}$. Da für die Probemessung nur $10 \mu\text{l}$ benutzt wurden und die Spritzenpumpen eine Kapazität von 5 ml hatten, konnten mehr als 500 Injektionen durchgeführt werden, ohne die Spritzenpumpen neu zu befüllen, was einer Messzeit von ca. 4 Stunden entsprach.

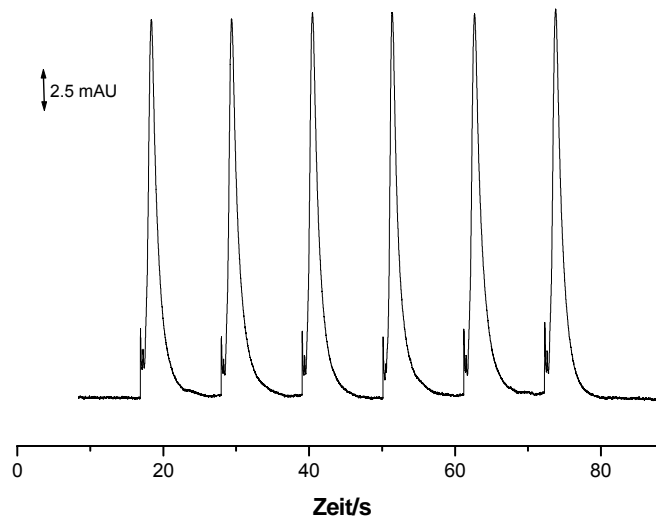


Abbildung 4.1: Wiederholte Injektion von 1.79 mM Fe^{2+} . Reagenzlösung: 12.3 mM Phenanthrolin in 0.1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 4.5. Flussrate der Pufferpumpe: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. LED: Grün, 500 nm.

In Abbildung 4.1 kann man jeweils einen kleinen Peak vor dem Analytpeak sehen. Dieser wurde durch einen Druckpuls der Ventile erzeugt. Zur Bestimmung der kleineren Konzentrationen hätte dieser Systempeak stören können, aber mit einer Zeitverzögerung (5 s) zwischen Injektion und dem Start der Analyse wurde der Systempeak von den anderen getrennt. In der folgenden Abbildung wird diese Messung gezeigt.

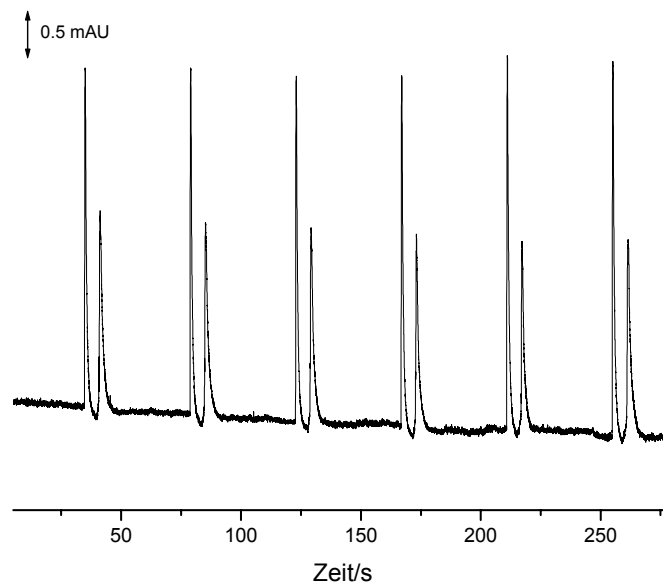


Abbildung 4.2: Wiederholte Injektion von 0.18 mM Fe²⁺. Reagenzlösung: 12.3 mM Phenantrolin in 0.1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 4.5. Flussrate der Pufferpumpe: 10 µl/min. Flussrate der Analytpumpe: 10 µl/min. LED: Grün, 500 nm.

In Abbildung 4.2 kann man zwei getrennte Peaks durch diese Pause zwischen der Injektion und der Analyse sehen. Der erste ist der Systempeak und der zweite ist der Analytpeak. Die Resultate sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Als zweite Bestimmung wurde die gesamte Schwermetallkonzentration mit der PAR-Methode gemessen. 4-(2'-Pyridylazo)resocinol (PAR) ist ein hochempfindliches und nicht selektives Reagenz, das z. B. in den Industrien zur Bestimmung der gesamten Schwermetallkonzentration der Abwässer benutzt wird. Das Vorgehen der FIA war das gleiche wie bei der Eisenbestimmung, nur dass die Reagenz- und Flussgeschwindigkeit verschieden waren.

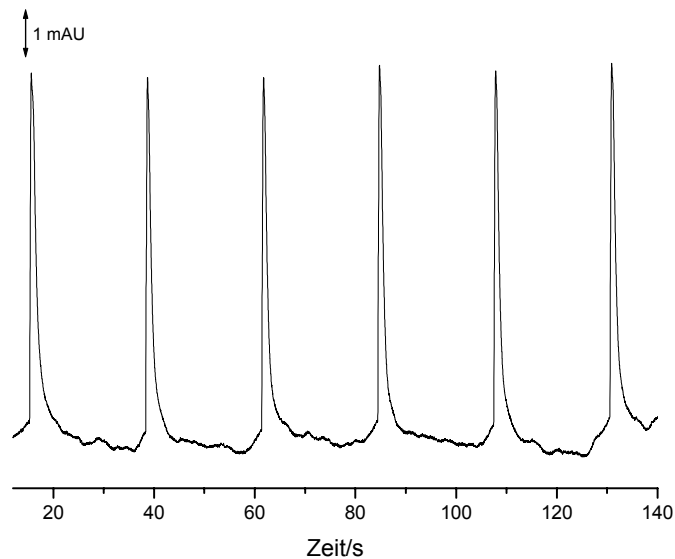


Abbildung 4.3: Wiederholte Injektion von 150 μM Schwermetalle (Zn^{2+} und Cu^{2+}). Reagenzlösung: 2 mM 4-(2'-Pyridylazo)resorcinol (PAR) in 10 mM Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure (TAPS), pH 8.5. Flussrate der Pufferpumpe: 8 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 8 $\mu\text{l}/\text{min}$. LED: Grün, 500 nm.

Bei der Schwermetallbestimmung war der Systempeak nicht vorhanden. Es könnte sein, dass mit diesem Puffer der Druckpuls das Absorptionssignal in der Messzelle oder den Brechungsindex nicht ändert. Die Resultate sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Als letztes wurde Nitrit bestimmt. Die Nitritbestimmung war schwieriger als die anderen Bestimmungen, weil eine zwei stufige Reaktion daran beteiligt war. Nitrit reagierte zuerst mit Sulphanilamid, das Produkt wurde mit Diamin zum Azofarbstoff, der dann detektiert wurde. In diesem Fall waren Hauptspritze (SP1) und Seitenspritze (SP2 in Abb. 3.1) mit verschiedenen Reagenzien gefüllt. Um die Reaktion vollständig ablaufen zu lassen, wurde die Flussgeschwindigkeit verlangsamt.

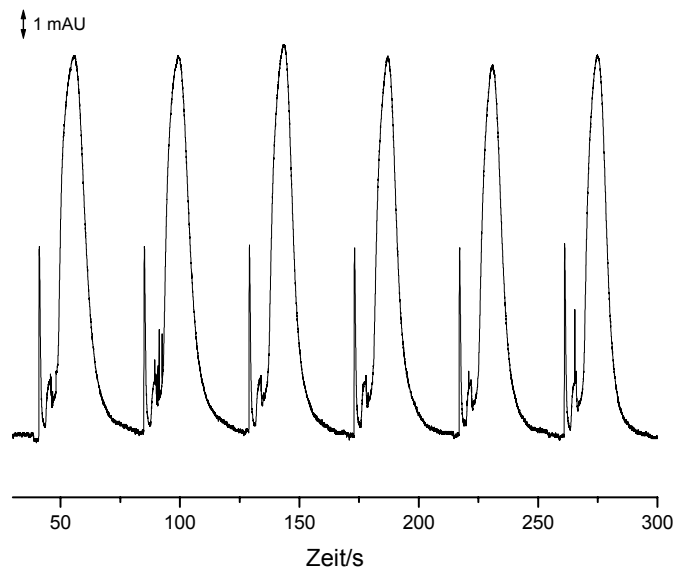


Abbildung 4.4: Wiederholte Injektion von 100 μM Nitrit. Reaktionsmedium: 0.4 M Ammoniumchlorid und 0.3 M Natriumchlorid Reagenzlösung (SP1 Spritze): 1 g Sulfanilamid und 5 ml konz. HCl in 100 ml Reaktionsmedium. Reagenzlösung (SP2 Spritze): 0.1 g N-(1-Naphthyl)ethyldiamin und 4 g NaCl in 100 ml Reaktionsmedium Flussrate der Pufferpumpe: 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. LED: Grün 500 nm.

Bei der Nitritbestimmung ist der Systempeak wieder vorhanden. Die Resultate sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst.

	Eisen	Gesamte Schwermetalle (PAR)	Nitrit
Flussgeschwindigkeit ($\mu\text{l min}^{-1}$)	SP1 = 10 SP2 = 10	SP1 = 8 SP2 = 8	SP1 = 1 SP2 = 1
Empfindlichkeit ($\text{mAU } \mu\text{M}^{-1}$)	0.18139	0.13216	0.11262
Korrelationskoeffizient (R^2) (Lineareregression)	0.995	0.9945	0.9995
Nachweisgrenze ($3 \times S/N$) (μM)	33	7	4
Linearbereich (μM)	35-1800	10-200	5-150

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Versuchsparameter und der Resultate.

Die Nachweisgrenzwerte der Literatur [17,139,141] lagen 10-100 Mal tiefer als die gemessenen Werte. Verschiedene Faktoren könnten diese Resultate erklären. Der Lichtweg des benutzten μ -FIA-Detektors, betrug ein Zehntel eines normalen Detektors, was eine kleinere Empfindlichkeit verursacht haben könnte. Auch das kleinere Injektionsvolumen ($3.75 \mu\text{l}$) als dessen der Literatur ($100\text{-}500 \mu\text{l}$) könnte einen Einfluss gehabt haben. Dazu kommt noch, dass nicht bei optimaler Wellenlänge gemessen werden konnte, da man mit der LED in der Wahl der Wellenlänge beschränkt ist. Zur Messung wurde eine grüne LED mit 500 nm gewählt, das Absorptionsmaximum des Eisen-Phenanthrolin-Komplexes liegt aber bei 512 nm , das des 4-(2-Pyridylazo)resorcinol bei 520 nm und das des Azofarbstoffs (Nitrit) bei 540 nm .

Bei der Eisenbestimmung lag die Reproduzierbarkeit bei der manuellen Injektion bei 8.6% (Resultat von meinem Vorgänger) und bei der automatischen Injektion bei 5.7% für die gleiche Konzentration (1 ppm). Bei einer Konzentration von 100 ppm Eisen erreichte die Reproduzierbarkeit einen Wert von 1.1% (s. Abb. 4.1), dies

entspricht der in Literatur (1%) [139] zitierten Reproduzierbarkeit. Für die Nitritbestimmung wurde die Reproduzierbarkeit von 4.3% (Manuell, Resultat von meinem Vorgänger) zu 4.1% (automatisiert) verbessert. Die PAR-Methode erreichte eine Reproduzierbarkeit von 4.0%. Sie wurde von meinem Vorgänger nicht angewendet und deswegen lagen keine Resultate zum Vergleich vor.

4.4 Schlussfolgerung

Eine automatische Injektion wurde auf einem Fliessinjektionsanalyse-System im Mikromassstab gebaut, um mehrere Messungen ohne Handeingriffe durchführen zu können. Durch diesen Vorteil wurde auch die Reproduzierbarkeit verbessert. Mit der schnellen Flussrate (Eisenbestimmung) wurde der Vorteil grösser als mit der langsamen Flussrate (Nitritbestimmung). Der Reagenzienverbrauch ist im Vergleich zu den üblichen FIA-Systemen wesentlich geringer. Diese hat nicht nur einen ökonomischen, sondern auch einen ökologischen Vorteil durch die Verminderung der Abfallprodukte.

5 Optische Detektion für ein tragbares Kapillarelektrophoresegerät basierend auf optischen Fasern

5.1 Photodioden

5.1.1 Einleitung

Um das tragbare Kapillarelektrophoresegerät (CE) mit einer einfachen Detektionszelle zu testen, wurden Trennverfahren aus der Literatur [145-147] angewendet und verglichen. Das CE Gerät muss batteriefähig sein, um an Ort und Stelle messen zu können. Als Lichtquelle wurde eine Leuchtdiode (LED) verwendet, wegen des geringeren Energieverbrauchs als bei normalen UV- oder VIS-Lampen. Andere Vorteile der LED sind die stabile Strahlungsquelle, bei einigen hohe Intensität, geringe Wärmeentwicklung und wegen des begrenzten Emissionsspektrums der LED wird die Verwendung eines Monochromators oder optischen Filters überflüssig.

Die einfachste Methode ist die bei welcher der Analyt direkt das bestrahlte Licht absorbiert. Der Analyt, der ein oder mehrere chromophore Systeme enthält, absorbiert im UV-VIS-Bereich (180-800 nm), d. h. dass der Analyt aromatische Systeme (mit π -Elektronen), Carbonyl- und Amino-Gruppen (mit n-Elektronen des Sauerstoffs bzw. Stickstoffs) enthält. Für die Messung der anorganischen Ionen, die im UV-VIS-Bereich kein Licht absorbieren, muss die indirekte Methode angewendet werden. Der Trennpuffer muss dazu eine absorbierende Substanz, die die gleiche Ladung wie der Analyt hat, enthalten, damit der Analyt die Absorption des Puffers schwächt und somit detektiert werden kann.

Das Ziel von diesem Teil der Arbeit war eine einfache optische Zelle (ohne fokussierende Hilfsmittel) mit einer Kapillare von 75 μm Innendurchmesser zu testen.

Danach wurden auch die erste kommerzielle UV-Leuchtdiode und eine neue kleine batteriebetriebene UV-Lampe verwendet. Um die Kationen zu bestimmen, wurde zuerst Methylgrün als Farbstoff benutzt. Als Lichtquelle wurde eine rote Leuchtdiode verwendet. Danach wurden verschiedene Anionen mit Naphtolgelb S (mit einer grünen LED) und mit der Chromat-Methode (UV-Leuchtdiode: 370 nm) bestimmt.

5.1.2 Kerngrößen der Glasfaser

Im ersten Versuch wurde die Intensität des Lichts für verschiedene Glasfasern mit unterschiedlichen Kerngrößen gemessen, um die Intensivsten zu finden. Die Kapillare war mit Wasser gefüllt. Mit verschiedenen Kerngrößen der Anregungsfasern wurde der Photostrom der Photodiode mit einer Sammelfaser von 100 μm Kerngröße gemessen. Resultate sind am Teile a) der Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Im zweiten Versuch wurde der Anteil an Streulicht bestimmt. Die Kapillare war mit schwarzer Tinte gefüllt, welche praktisch alle Wellenlängen im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums absorbiert. Der Photostrom der Photodiode wurde mit dem indirekten Licht, das durch die Kapillarewand reflektiert war, gemessen.

	50 μm	100 μm	125 μm
a) Photostrom/ nA	102	71	89
b) Photostrom/ nA	21	51	67
c) Streulicht	20 %	56 %	75 %

Tabelle 5.1: Bestimmung der Photoströme mit verschiedenen Kerngrößen der Anregungsfasern. a) Kapillare mit Wasser gefüllt. Sammelfaser 100 μm .
b) Kapillare mit schwarzer Tinte gefüllt. Sammelfaser 100 μm .

Mit der Faser mit einer Kerngröße von 50 μm wurde der grösste Photostrom an der Photodiode gemessen und auch der kleinste Streulichtanteil. Mit einer kleineren

Sammelfaser (50 μm) könnte man das Streulicht reduzieren, aber dadurch würde auch das Signal reduziert. Das Photostromsignal mit der Wassergefüllten Kapillare (10 nA) ist zu nah dem Dunkelstrom der Photodiode (4 nA). So wurde es weiterhin mit der 100 μm Sammelfaser gemessen, obwohl diese ein grosses Streulicht erzeugt.

5.1.3 Kationen

Zur Bestimmung von Alkalimetallen wurden die Bedingungen von Malá [145] angewendet. Der 1 mM Tris-Puffer wurde mit Essigsäure auf pH 6.1 eingestellt. Eine Testlösung mit 1 mM K^+ und Na^+ wurde analysiert. Malá beschreibt, dass die Pufferkonzentration von 1 mM für höhere Empfindlichkeit optimal war, dass aber mit einer Konzentration von 10 mM keine Separation mehr zu beobachten war.

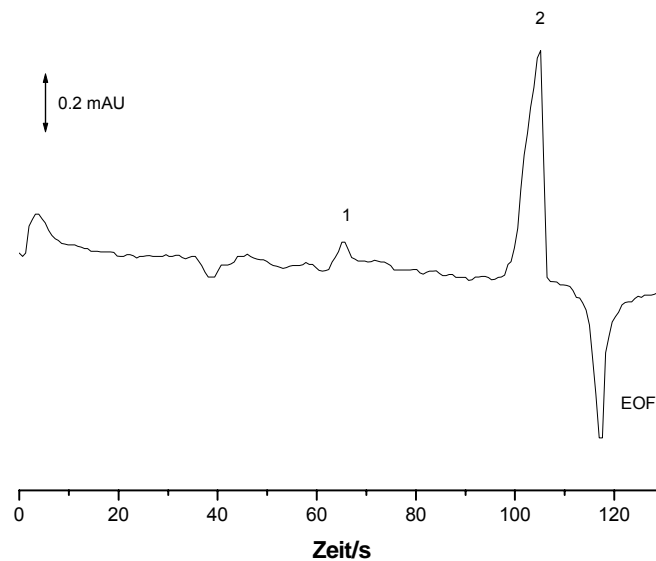


Abbildung 5.1: Elektropherogramm von 1 mM K^+ (1) und Na^+ (2) gelöst in Puffer. Trennpuffer: 1 mM Tris mit Essigsäure auf pH 6.1 eingestellt, 0.1 mM Methylgrün. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μm i.d. Injektion: 5 kV für 5 s. Trennungsspannung: 20 kV. Lichtquelle: rote LED, 630 nm.

Abbildung 5.1 zeigt eine nicht stabile Basislinie, obwohl die Analytkonzentration hoch war. Der Puffer und die Probe hatten die gleiche Konzentration, was die Pufferkapazität von Tris-Acetat beschränkt haben kann. Mit einem Zehntel der Konzentration der Probe wurde der Analytpeak nicht mehr von der Basislinie unterschieden.

Der pKa-Wert von Tris ist 8.06 und der pKa-Wert von Acetat ist 4.76. Eine Lösung puffert besser, wenn der pH der Lösung eine Einheit von dem pKa des Puffers differiert. Da es in dem oben erwähnten Beispiel (pH 6.1) nicht der Fall war, wurde ein neuer Puffer gewählt, ein MES/His Puffer (MES pKa-Wert 6.15).

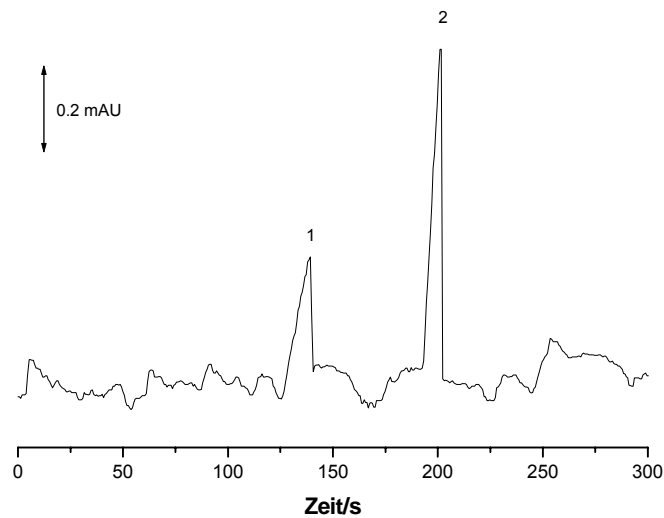


Abbildung 5.2: Elektropherogramm von 1 mM K^+ (1) und Li^+ (2) gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM MES/His pH 6.0, 0.1 mM Methylgrün. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μ m i.d. Injektion: 5 kV für 5 s. Trennungsspannung: 20 kV. Lichtquelle: rote LED 630 nm.

Das Elektropherogramm in Abbildung 5.2 zeigt, dass die Basislinie auch mit dem neuen Puffer nicht stabil war. Wenn ein Co-Kation in dem Puffer vorhanden ist und unfähig ist in dem Bereich des Hintergrundfarbstoffs zu absorbieren, könnte, in einer indirekten Detektion, dies zu einer Verringerung der Hintergrundabsorption führen, die ihrerseits eine Verringerung der Empfindlichkeit verursachen würde [146,148].

5.1.4 Anionen

Als Anionenbestimmung wurde die Methode mit Naphtholgelb S [146] als Hintergrundfarbstoff angewendet. Johns et al. wählte die indirekte Detektion im sichtbarem Bereich, weil die Wahrscheinlichkeit, dass die Matrix in dem UV-Bereich

absorbieren würde, am grössten war. So kann man auch erwarten, dass die Empfindlichkeit reduziert ist. Die Absorption, die Löslichkeit und die Mobilität des Farbstoffes waren weitere gute Voraussetzungen, um diesen Farbstoff zu wählen. Die ersten zwei sind intuitiv. Gemäss einer Studie von Foret et al. [149], wird die Empfindlichkeit erhöht, wenn die Mobilität der Probe der des absorbierenden Co-Ion (Farbstoff) ähnlich ist. In diesem Fall ist die Elektrodipersion vernachlässigbar.

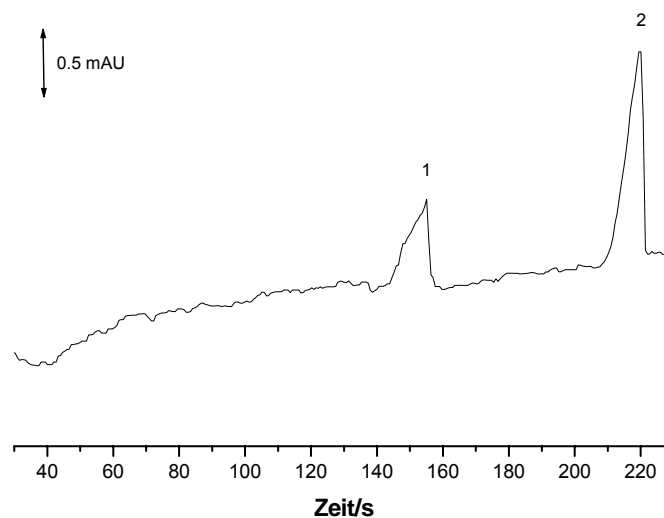


Abbildung 5.3: Elektropherogramm von 1 mM Chlorid (1) und Formiat (2) gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM His, 0.5 mM Naphtolgelb, 0.05% HPMC, pH 7.7. Kapillarlänge 50 cm, bis zum Detektor 56 cm, 75 μm i.d. Injektion: -10 kV für 10 s. Trennungsspannung: -30 kV. Lichtquelle: blaue LED 470 nm.

Abbildung 5.3 zeigt die Trennung von zwei Testanionen. Auch in diesem Elektropherogramm ist die Basislinie nicht stabil und die Empfindlichkeit nicht ausreichend. Bei einem weiteren nicht abgebildeten Elektropherogramm der 0.1 mM Testprobe wurden fast keine Peaks detektiert.

Die Nachweisgrenze ist auch für dieses Trennsystem sehr schlecht, im Gegensatz zu dem, was in der Literatur steht [146]. In diesem Fall hat man den Farbstoff mit der Filtrierung und mit der Kristallisierung gereinigt, um sicher zu sein, dass er keine Co-Ionen enthält, die die Empfindlichkeit verringern könnten.

5.1.5 Anionen mit UV-Leuchtdiode

In den letzten Jahren sind auch UV-LED auf dem Markt erschienen. Die ersten hatten eine Wellenlänge von 370 nm. Für diesen Bereich gibt es das Chromat, die Methode hat seine Maxima bei ca. 280 und 370 nm in alkalinen Bedingungen hat [107]. Dieses Trennsystem ist die meistbekannte Methode für die Bestimmung von Anionen mit der indirekten Detektion.

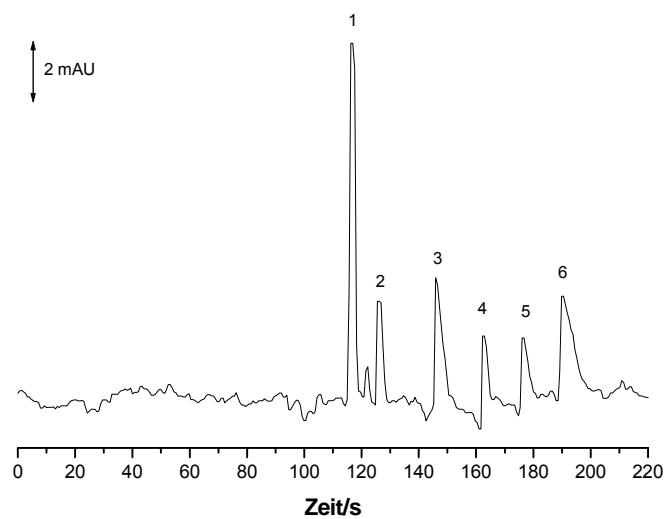


Abbildung 5.4: Elektropherogramm von 1 mM Cl⁻ (1), NO₂⁻ (2), NO₃⁻ (3), PO₄³⁻ (4), CO₃²⁻ (5) und CH₃COO⁻ (6) in Puffer gelöst. Trennpuffer: 20 mM Tris, 5 mM Na₂CrO₄, 0.5 mM CTAB, pH 9.1. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μm i.d. Injektion: -5 kV für 5 s. Trennungsspannung: -20 kV. Lichtquelle: UV-LED 370 nm.

Die Abbildung 5.4 zeigt die Trennung von verschiedenen Anionen mit der Chromat-Methode [147]. Die Basislinie ist auch in diesem Elektropherogramm unstabil.

5.1.6 Schlussfolgerung

Die Experimente mit diesen drei verschiedenen Trennsystemen (Kationen und Anionen im sichtbaren Bereich und Anionen im UV-Bereich) zeigen, dass diese ganz einfache Zelle mit einer Kapillare von 75 μm Innendurchmesser, mit optischen Fasern und einer Photodiode als Detektor, nicht genügend empfindlich ist. Verschiedene Gründe können diese Ergebnisse erklären. Die Lichtquelle könnte nicht genügend intensiv sein, die Photodiode ist an der Grenze ihrer Empfindlichkeit oder nur eine geringe Lichtmenge, wegen Streuung, erreicht die Photodiode.

5.2 *Eine Photomultiplieröhre*

Wegen der schlechten Empfindlichkeit und der Unstabilität der Basislinien der Messungen mit der Photodiode wurde eine Photomultiplieröhre, die empfindlicher als die Photodiode ist, benutzt. Zusammen mit der Photomultiplieröhre wurde auch eine kleine batteriebetriebene UV-Lichtquelle für Vor-Ort-Analysen getestet. Diese neu erhältliche UV-Lichtquelle ist klein und benutzt eine kapazitiv gekoppelte Wechselspannung, um die Deuteriumlampe anzuregen. Dieses System hat einen kleineren Stromfluss als die normalen Deuteriumlampen und kann also mit einer 12 V Bleibatterie betrieben werden.

Für die direkte Detektion im UV-Bereich wurden verschiedene Chlorphenole bestimmt. Chlorphenole sind bekannt für ihre Toxizität, besonders für aquatische Organismen, Karzinogenität und Bioakkumulation, gegeben durch ihre lipophilen Eigenschaften und daraus resultierende Fortsetzung in der Nahrungskette. Chlorphenole entstehen bei der Herstellung verschiedener chemischer Produkte, wie zum Beispiel Pestizide, Farbstoffe, Kunststoffe, Antioxidationsmittel, Drogen, usw. [150,151].

Zuerst wurde die tragbare UV-Lampe mit der Methode von Ong und Mitarbeitern [152] getestet. Der Puffer bestand aus 50 mM SDS in 100 mM Borat/50 mM Phosphat. Die Ionenstärke dieses Puffers schien zu gross zu sein, deswegen wurde eine Konzentration von 10 mM für alle Komponenten gewählt, vor allem, um den Strom kleiner zu halten, um die Joulesche Wärme zu vermeiden.

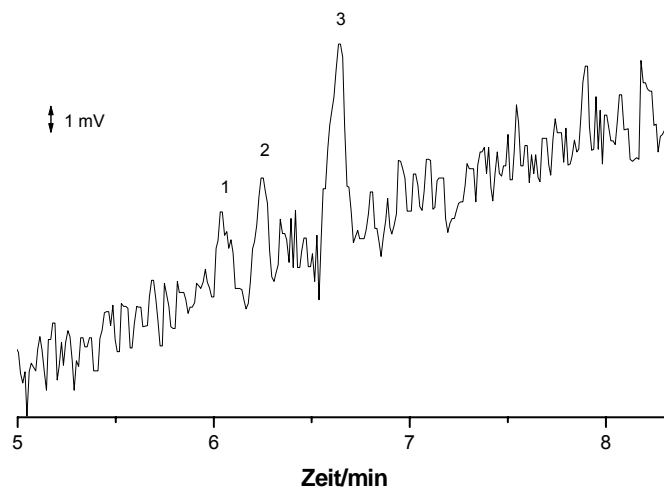


Abbildung 5.5: Elektropherogramm von 1 mM 2-Chlorphenol (1), 2,4-Dichlorphenol (2) und 2,4,6-Trichlorphenol (3), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Borat, 10 mM Phosphat, 10 mM SDS, pH 9.4. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μm i.d. Injektion: -10 kV für 10 s. Trennspannung: -15 kV. Lichtquelle: Heraeus UV-Licht. Photomultiplerröhre 0.9 V, 254 nm.

Trotz der Konzentration von 1 mM sind die Peaks nicht klar von der Basislinie unterscheidbar. Eine mögliche Begründung für dieses Resultat könnte sein, dass nur eine kleine Lichtmenge die Photomultiplerröhre erreicht hat. Die Heraeus UV-Lampe ist eine polychromatische UV-Quelle (200-400 nm). Zur Benutzung der UV-Lampe

braucht man einen Interferenzfilter, um die Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge messen zu können. Diese ist eine notwendige Voraussetzung, um das Lambert-Beersche Gesetz, Linearität zwischen Konzentration und optischem Signal, anzuwenden [153]. Der Interferenzfilter schränkt nicht nur die Bandbreite des Lichtes ein, sondern auch dessen Transmission und das führt zu einer Abschwächung der Lichtintensität.

Mit der Verwendung einer Quecksilberlampe, die wenige scharfe Linien und insbesondere eine sehr starke bei 254 nm erzeugt, wurde der Interferenzfilter unnötig.

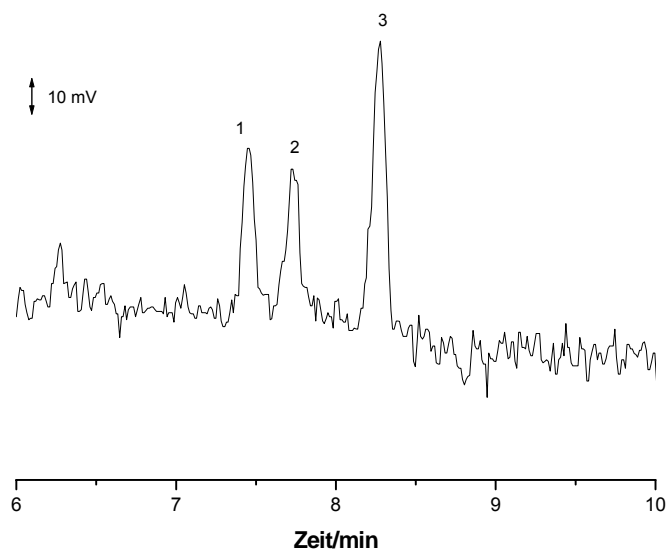


Abbildung 5.6: Elektropherogramm von 1 mM 2-Chlorphenol (1), 2,4-Dichlorphenol (2) und 2,4,6-Trichlorphenol (3), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Borat, 10 mM Phosphat, 10 mM SDS, pH 9.4. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μm i.d. Injektion: -10 kV für 10 s. Trennungsspannung: -10 kV. Lichtquelle: Hg-Lampe. Photomultiplieröhre 0.9 V, 254 nm.

Der Vergleich zwischen den Abbildungen 5.5 und 5.6 zeigt, dass das Signal mit der Hg-Lampe stärker als das mit der Heraeus-Lampe ist. Da das Signal noch nicht

genügend stark für eine normale Anwendung war und weil die Chorophenole sehr toxisch sind, wurde für weitere Tests eine andere Methode gewählt.

Zur Bestimmung der Kationen mit der indirekten Detektion gibt es verschiedene Methoden [79,154], wobei die meisten bei 214 nm detektieren. Shi und Fritz [155] massen diverse Kationen mit einem Nikotinamidpuffer bei 254 nm.

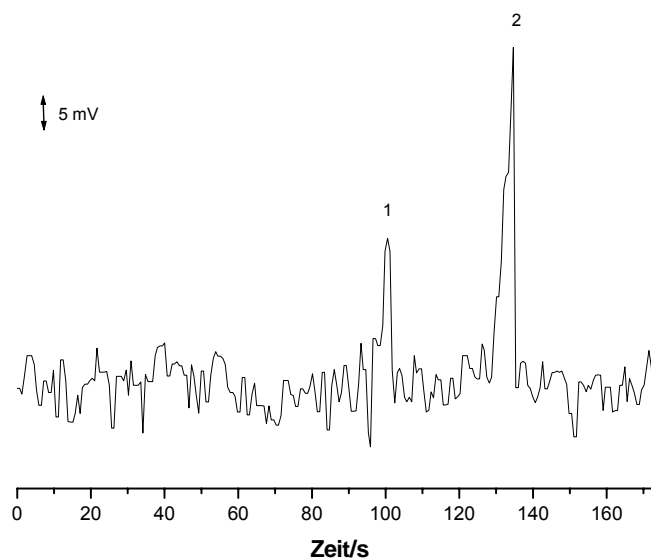


Abbildung 5.7: Elektropherogramm von 1 mM NaCl (1) und 1mM KCl (2), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 8 mM Nicotinamid, 0.6 mM 18-Crown-6-Ether, pH 3.4 mit Ameisensäure eingestellt. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μ m i.d. Injektion: 5 kV für 5 s. Trennungsspannung: 15 kV. Lichtquelle: Hg-Lampe. Photomultiplieröhre 0.9 V, 254 nm.

Das Elektropherogramm in Abbildung 5.7 zeigt, dass die Basislinie zu viel rauscht. Es gibt drei mögliche Gründe für dieses Rauschen. Die nicht optimale Trennmethode (nicht gepuffertes System, zu viele Joule-Wärmeentwicklung, usw.), die zu schwache Lichtintensität und die Abwesenheit einer Referenz, die Rauschen vermindern kann.

Um den ersten Grund für das Rauschen auszuschliessen wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kapillarelektrophoresegeräte getestet.

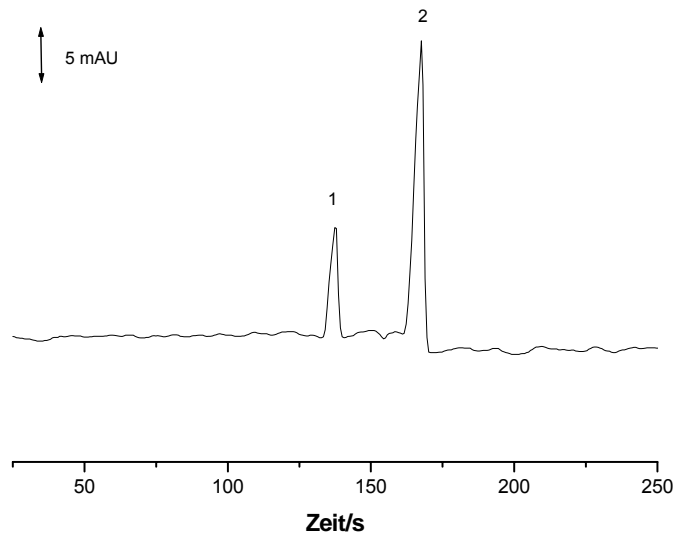


Abbildung 5.8: Elektropherogramm von 1 mM NaCl (1) und 1mM KCl (2), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 8 mM Nicotinamid, 0.6 mM 18-Crown-6-Ether, pH 3.4 mit Ameisensäure eingestellt. Kapillarlänge 50 cm, bis zum Detektor 80 cm, 75 μm i.d. Injektion: 5 kV für 5 s. Trennungsspannung: 25 kV. Lichtquelle: D-Lampe von Spectrophoresis 100. 254 nm

Die Trennmethode mit dem kommerziell erhältlichen Detektor war zufriedenstellend (s. Abbildung 5.8). Alle Parameter waren gleich und die Feldstärke war vergleichbar.

Der nächste Versuch um das Rauschen zu unterbinden, war der Einsatz einer zweiten Photomultiplerröhre als Referenz. Mit einer Referenz konnte die Absorption und nicht nur die Abschwächung des Lichtes durch die Lösung, die so genannte Transmission gemessen werden; Für die Absorption wurde die Intensität des austretenden Strahls durch diejenige des einfallenden Strahls (Referenz) dividiert und dann logarithmiert.

5.3 Zwei Photomultiplerröhren

Die nächste Abbildung zeigt das Elektropherogramm mit Nikotinamidmethode und Anwendung von zwei Photomultiplerröhren.

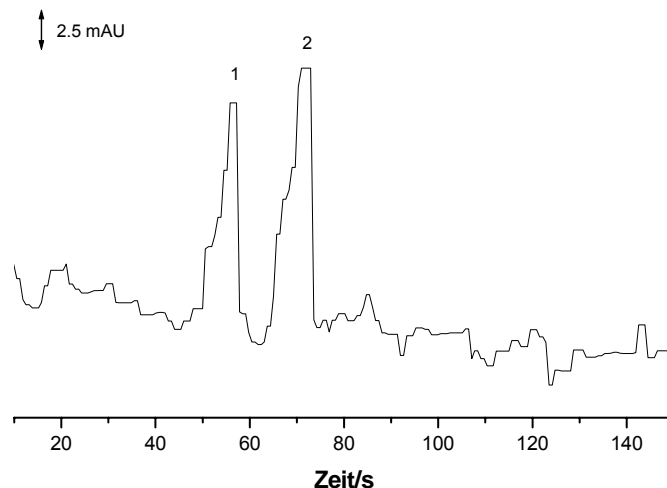


Abbildung 5.9: Elektropherogramm von 1 mM NaCl (1) und 1mM KCl (2), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 8 mM Nicotinamid, 0.6 mM 18-Crown-6-Ether, pH 3.4 mit Ameisensäure eingestellt. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μ m i.d. Injektion: 10 kV für 10 s. Trennspannung: 25 kV. Lichtquelle: Hg-Lampe 254 nm. Photomultiplerröhre 0.9 V.

Mit blossem Auge sieht man in Abbildung 5.9, dass das Datenerfassungssystem nicht mehr genügend schnell ist. Die Analog-Digitale-Wandlerkarte von Picolog hat mit 16 Bit das Maximum der Abtastfrequenz von 1.5 Hz (657 ms/Punkt) erreicht, d.h. ca. 2 Punkte pro Sekunde. Gleichzeitig wurden in der Abbildung 5.10, die gleichen Messungen mit dem Maclab Datenerfassungssystem, das mit einer maximalen Abtastfrequenz von 200 kHz messen kann, erfasst.

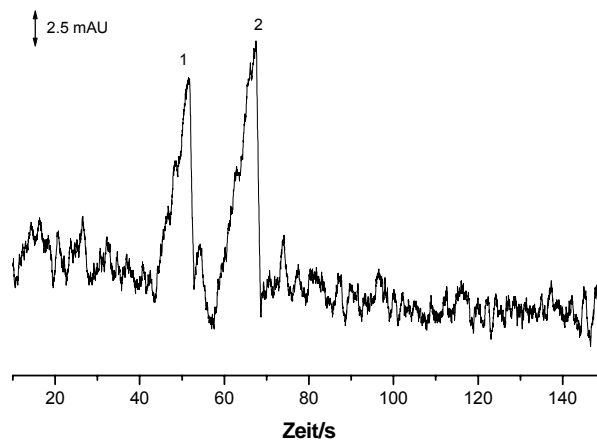


Abbildung 5.10: Elektropherogramm von 1 mM NaCl (1) und 1mM KCl (2), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 8 mM Nicotinamid, 0.6 mM 18-Crown-6-Ether, pH 3.4 mit Ameisensäure eingestellt. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 34 cm, 75 μm i.d. Injektion: 10 kV für 10 s. Trennspannung: 25 kV. Lichtquelle: Hg-Lampe 254 nm. Photomultiplerröhre 0.9 V Abtastfrequenz 40 Hz.

Die Benutzung einer zweiten Photomultiplerröhre hat keine sichtbaren Vorteile für die Stabilität der Basislinie hervorgebracht.

5.4 Schlussfolgerung

Das einfachste Detektorsystem des μ -FIA-Systems wurde für die tragbare Kapillarelektrophorese mit optischer Detektion adaptiert. Die LED-Halterung und die Photodiode des μ FIA-Gerätes wurden verwendet. Die CE-Zelle wurde ohne fokussierende Elemente (von meinem Vorgänger) gebaut. Die ersten Messungen zeigen, dass die neuen Detektorsysteme nicht genügend empfindlich sind. Stärkere Lichtquellen (Heraeus-Lampe und Hg-Lampe) und ein empfindlicher Detektor (Photomultiplerröhren) wurden getestet, um vernünftige Resultate zu erreichen. Auch

mit den neuen Teilen des Detektorsystems war die Empfindlichkeit nicht genügend, um das Detektorsystem für normale Anwendungen zu verwenden. Bei der μ FIA wurden grössere Anregungs- (100 μm) und Empfängerfasern (200 μm) benutzt und das Licht ging durch einen Kanal (150 μm tief und 180-360 μm breit). Eine kreisförmige Kapillare kann man nicht mit einem trapezoidalen Kanal vergleichen. Die Wand der Kapillare beugt das Licht und vergrössert das Streulicht. Um das Streulicht zu verringern, wurden die Glasfasern mit kleinerer Kerngrösse verwendet. So war aber die Lichtmenge am Detektor zu klein, um eine genügende Empfindlichkeit zu erreichen. Die CE-Zelle ohne fokussierende Elemente ist mit einem 75 μm Innendurchmesser nicht verwendbar. Diese Zelle könnte man nur mit dem 100 μm I.D. oder grösser verwenden. Um die 75 μm I.D. zu verwenden muss man eine neue Zelle mit fokussierenden Elementen entwickeln. Durch die Vergrösserung des Kerns der Glasfasern wird die Lichtmenge vergrössern.

6 Entwicklung eines automatischen Injektors für die Kapillarelektrophorese, um schnelle Messungen durchzuführen

6.1 Einleitung

Das Ziel des neuen Projektes war die Studie einer schnellen Trennung mit der konventionellen Kapillarelektrophorese, um eine billige Alternative für den Chip (s. Kap 2.2.1) zu finden. Normalerweise ist dies aus geometrischen Gründen mit kommerziellen Kapillarelektrophoresegeräten nicht möglich gewesen. So wurde ein neues Injektorsystem entwickelt, um schnelle Messungen durchführen zu können. Dieser Injektor sollte so einfach wie möglich sein um in Zukunft Teil eines völlig automatischen und tragbaren Kapillarelektrophoresegerätes für schnelle Messungen zu sein. Es wurde die elektrokinetische Injektion gewählt, weil sie den Vorteil eines geringeren technischen Aufwands als die hydrodynamische Injektion hat, was für ein automatisiertes Gerät von Bedeutung ist. Der Injektor basiert auf einer Kopplung zwischen einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Mikrokolonne (micro-HPLC) und einer Kapillarelektrophorese von Hooker und Mitarbeitern [143] (s. Kap.3.3.1.).

6.2 HPLC-Pumpen

Im ersten Versuch wurde der Injektionshauptteil an 2 HPLC-Pumpen angeschlossen. Im folgenden Schema wird der Injektionshauptteil mit den verschiedenen Anschlüssen gezeigt.

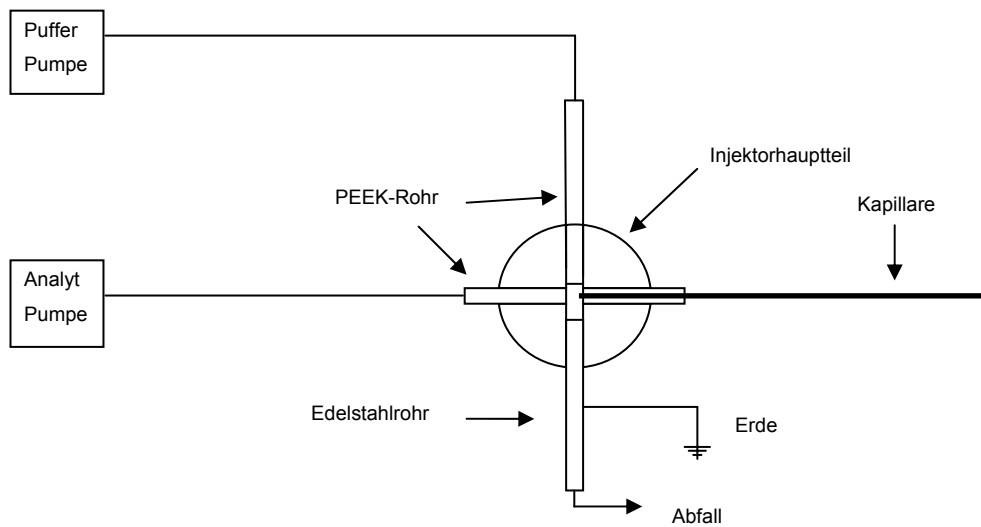


Abbildung 6.1 Skizze der Anordnung von HPLC-Pumpen.

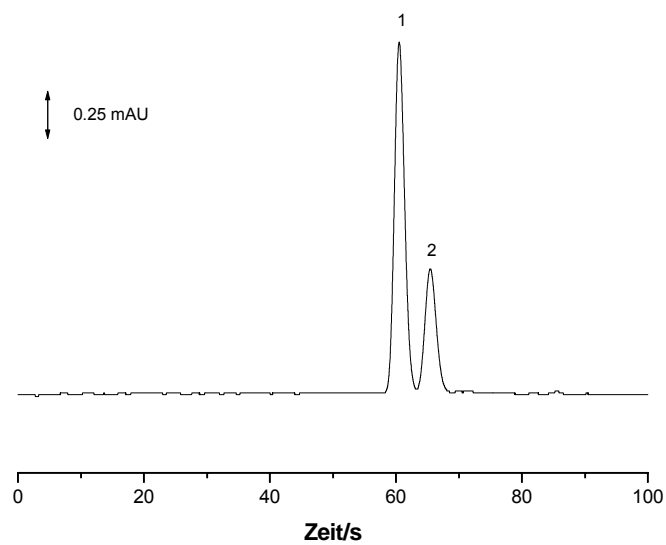


Abbildung 6.2: Elektropherogramm von 0.1 mM Propranolol (1) und 0.1 mM Labetalol (2), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 48 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Injektion: 15 kV für 1 s. Trennungsspannung: 15 kV. Detektor:

Spectrophoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 0.2 ml/min.
Flussrate der Analytpumpe: 83 μ l/min.

Das Elektropherogramm der Abbildung 6.2 zeigt eine gute und schnelle Trennung von Propranolol und Labetalol. In dieser Trennung war nicht nur die EOF als Pumpskraft vorhanden, sondern auch der Puffer, der mit der HPLC-Pumpe zusätzlich gepumpt war. Wenn die Kapillare an dem Detektionende aus dem Gefäss herausgezogen wurde und die HPLC-Pumpe des Puffers angeschaltet war, bildeten sich am Ende der Kapillare einige Tropfen. In 4 Stunden wurden 24,5 mg Wasser in einem Gefäss gesammelt, das entspricht 0.025 ml mit einer Geschwindigkeit von $4 \cdot 10^{-2}$ cm/s. Diese Geschwindigkeit war der Geschwindigkeit des EOF dieses Puffers vergleichbar. Zum Vermeiden dieses unerwünschten Pumpeffektes während der Analyse, wurde die Geschwindigkeit der Pufferpumpe verringert. Die kleinste Flussrate der Pufferpumpe ist nur 0.1 ml/min. Diese Pumpen waren zusätzlich für eine Automatisierung nicht geeignet.

6.3 Spritzenpumpen

6.3.1 Vier 2-Weg Ventile

Zur Verringerung des Flusses und zur Automatisierung der Injektion wurden die Spritzenpumpen und die Ventile benutzt, die auch für die FIA-Messung gebraucht wurden (Kapitel 4) und der Innendurchmesser der röhrenförmigen Erdelektrode, die alle Lösungen zum Abfall durchfliessen liess, wurde von 0.5 zu 0.75 mm vergrössert. Das nächste Schema zeigt die Anordnung der Ventile und Spritzenpumpen.

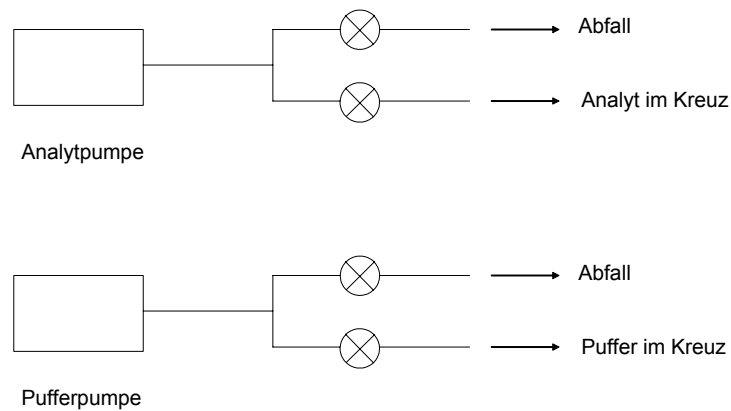


Abbildung 6.3: Skizze der Anordnung von Spritzenpumpen und Ventilen.

Für die FIA-Steuerung aller Ventile und Spritzenpumpen wurde ein einfaches FORTH-Programm geschrieben (siehe Anhang 10.2). Der Nachteil dieses Programms war die nicht einfache Änderung der Parameter (z.B. Injektionszeit). Man musste das Programm mit einem Editor öffnen, um die Änderungen durchzuführen. Das Programm musste dann kompiliert und neu geladen werden. Eine Verbesserung wurde mit LabVIEW, einer Programmiersprache mit graphischer Oberfläche, erreicht (siehe Anhang 10.6).

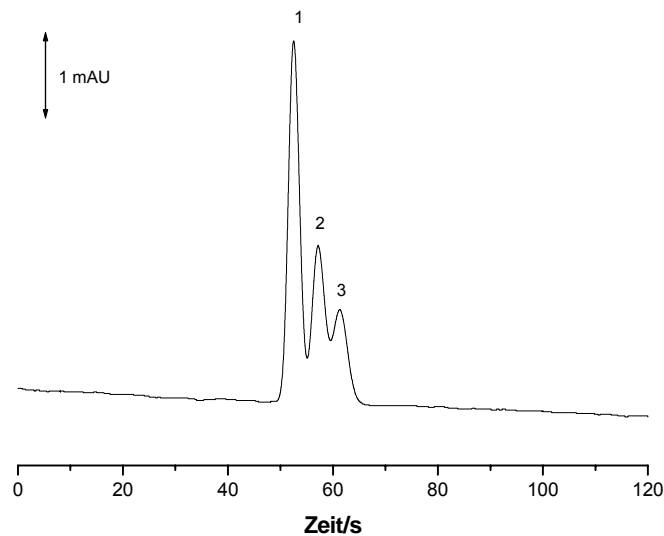


Abbildung 6.4: Elektropherogramm von 0.1 mM Propranolol (1), 0.1mM Labetalol (2) und 0.1 mM Metoprolol (3), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 48 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Injektion: 30 kV für 3 s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 8 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 8 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Wenn die Abbildungen 6.2 und 6.4 verglichen werden, sieht man, dass die Migrationszeiten fast gleich sind, obwohl in der Messung für Abbildung 6.4 mit der doppelten Feldstärke verwendet wurde. Mit dem gleichen Parameter (Puffer und Kapillarlänge) wurde die Analysenzeit umgekehrt proportional zur Trennungsspannung. Das ist ein klares Zeichen dafür, dass in der Messung in Abbildung 6.2 nicht nur der EOF beteiligt ist, sondern auch ein zusätzlicher Druckeffekt vorhanden ist.

Die Reproduzierbarkeit ist eine wichtige Eigenschaft eines Analysensystems. Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden 5 Injektionen von der gleichen Probe gemessen und die R.S.D.- Werte (Relative Standardabweichung) berechnet. Dieser Wert sollte für Peakflächen mit elektrokinetischer Injektion normalerweise

zwischen 2 -5 % liegen [101]. Der R.S.D.-Wert für Thiamin war 21%. Die möglichen Fehlerquellen für dieses Resultat könnten die Ventile oder ein nicht konstanter Fluss des Puffers sein. Wenn sich die Ventile nicht gleichzeitig schliessen und öffnen, könnte ein Überdruck im Schlauch entstehen. So würde eine unterschiedliche Probemenge injiziert. Wenn der Fluss nicht konstant oder zu langsam ist, könnten während der gleichen Spülphasenzeit, verschiedene Konzentrationen von Probenspuren im Kreuz bleiben. Z. B., mit einer bestimmten Fliessgeschwindigkeit und Spülzeit ist das Kreuz gespült. Wenn der Fluss bei der nächsten Injektion kleiner ist, könnten Spuren im Kreuz zurückbleiben und in der folgenden Messung zusätzliche Probemenge injiziert werden.

6.3.2 Zwei 3-Weg-Ventile

Die 2 2-Weg-Ventile an der Probenspritze wurden mit einem 3-Weg-Ventil ersetzt. Das gleiche wurde an der Pufferspritze gemacht (Abb. 6.5). Zusätzlich wurde der Pufferfluss erhöht. Fünf konsekutive Analysen wurden durchgeführt.

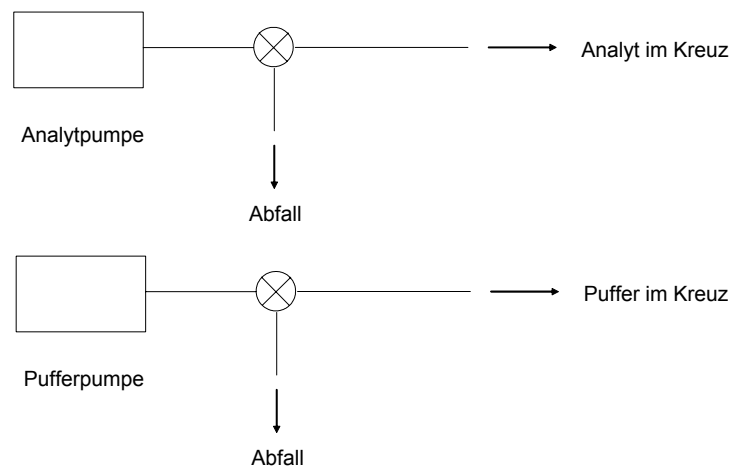


Abbildung 6.5 Skizze der Anordnung von Spritzenpumpen und Ventilen.

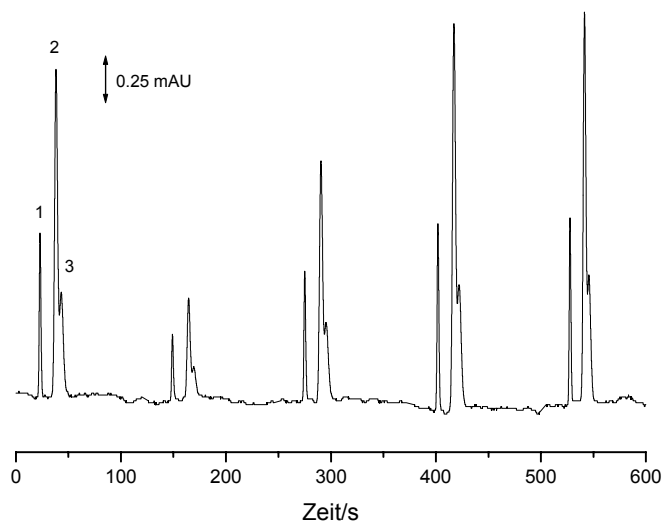


Abbildung 6.6: Elektropherogramm von 0.1 mM Thiamin (1), 0.1 mM Propranolol (2) und 0.1 mM Labetalol (3), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 48 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Wiederholte Injektionen: 30 kV für 3 s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Auch ohne die R.S.D. zu berechnen, sieht man (Abbildung 6.6), dass die Reproduzierbarkeit noch nicht genügend ist.

6.3.3 Hydrostatische Pumpe

Kuban und Mitarbeiter haben für ein FIA-CE-System eine einfache hydrostatische Pumpe entwickelt [156]. Die Pumpe besteht aus einer umgekehrten Flasche, die 40 cm über der FIA-CE Kopplung und dem Injektor platziert ist. Die Probenpumpe ist genau gleich aufgebaut. Die zwei Flaschen sind mit einem Schlauch an einem Injektionsventil angebracht. In einer späteren Publikation [157] wurde ein 2-

offene 2- geschlossenes Pinchventil benutzt. Dieses Ventil hat 4 Schläuche. Im geschlossenen Zustand sind 2 Schläuche "offen" und die anderen 2 "geschlossen" und umgekehrt sind im offenen Zustand die zwei vorher "geschlossen" Schläuche jetzt "geöffnet" und umgekehrt. Der Pufferschlauch wurde im geschlossenen Zustand des Ventils, an den "offenen" Schlauch angeschlossen und der Analytschlauch an den "geschlossenen" Schlauch. Mit dieser hydrostatischen Pumpe kann man testen, ob die Fehlerquelle am Kreuz oder an den Pumpen und Ventilen liegt.

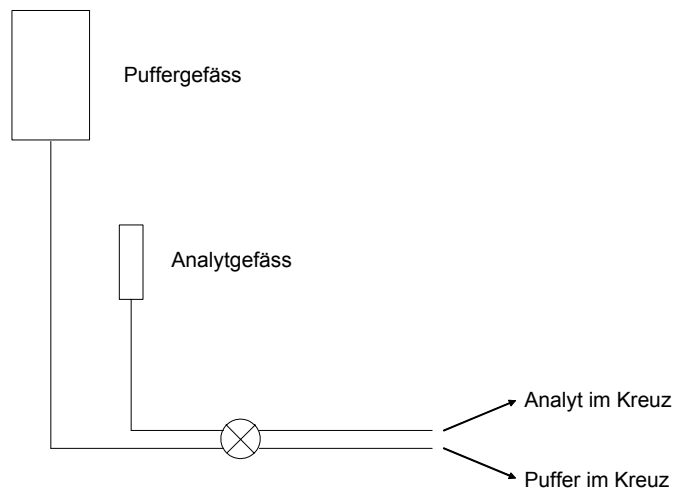


Abbildung 6.7 Skizze der hydrostatischen Pumpe mit den 2-offenen und 2-geschlossenen Pinchventilen.

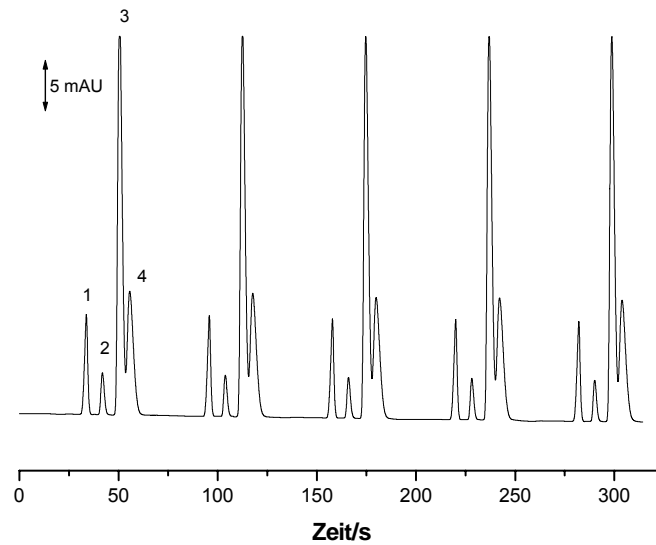


Abbildung 6.8: Elektropherogramm von 1 mM Thiamin (1), 1 mM Histidin (2), 1 mM Propranolol (3) und 1 mM Labetalol (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 48 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Wiederholte Injektionen: 25 kV für 2 s. Trennungsspannung: 25 kV. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Puffer Gefäß: 40 cm über dem Kreuz. Analytgefäß: 50 cm über dem Kreuz.

Die R.S.D.-Werte für Peakflächen sind für Thiamin 1.13% und für Histidin 3.01%. Die anderen 2 Substanzen hatten keine getrennten Peaks, so dass es schwierig war, die echten Peakflächen zu bestimmen. Man kann aber auch sehen, dass sie sich sehr wahrscheinlich im gleichen Bereich befinden. Mit dieser Messung wurde bestätigt, dass die Fehlerquelle im Pumpensystem und nicht im Kreuz liegt.

6.3.4 4-offenes 4-geschlossenes Pinchventil

Die hydrostatische Pumpe (siehe Kap. 6.3.3) hat gute Resultate gebracht und öffnet eine neue Möglichkeit, die Spritzenpumpen zu benutzen. Es wurde das Ventil des

oben erwähnten Versuches benutzt, aber mit einem 4-offenen 4-geschlossenen Ventil. Im dem geschlossenen Zustand des Ventils wurde der Analytabfallschlauch und Pufferschlauch an den "offenen" Schlauch des Ventils angeschlossen und der Probenabfallschlauch und Analytschlauch an den "geschlossenen" Schlauch des Ventils angeschlossen.

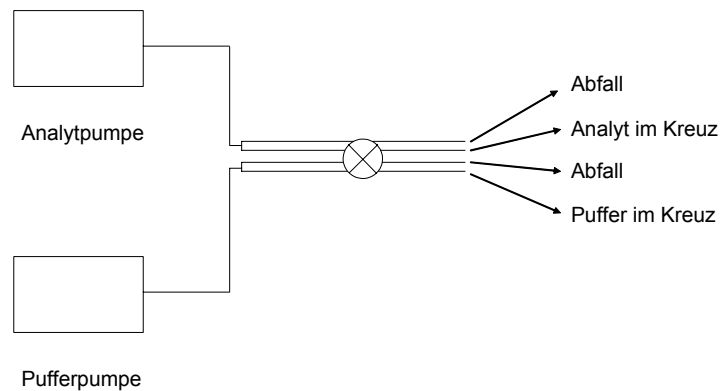


Abbildung 6.9 Skizze der Anordnung von Spritzenpumpen und dem 4-geschlossenen und 4-offenen Pinchventil.

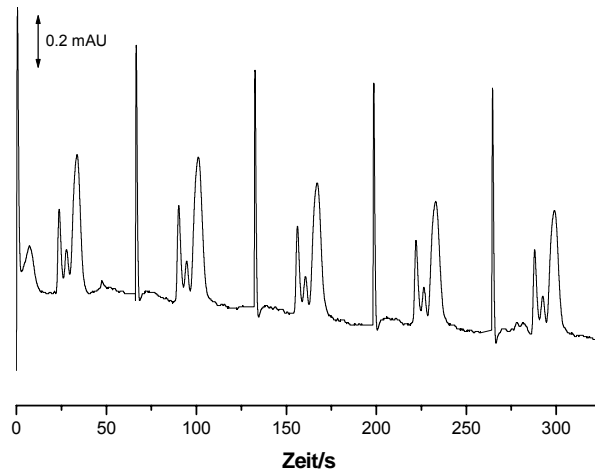


Abbildung 6.10: Elektropherogramm von 1 mM Thiamin (1), 1 mM Histidin (2), 1 mM Propranolol (3) und 1 mM Labetalol (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 48 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Wiederholte Injektionen: 10 kV für 2 s. Trennungsspannung: 25 kV. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 8 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die Reproduzierbarkeit wurde mit dieser Anordnung deutlich verbessert. Aber sie ist nicht so gut wie mit dem hydrostatischen System. Das hydrostatische System hat einen Nachteil: für Routineanwendung nicht praktikabel und für ein tragbares Kapillarelektrophoresegerät nicht geeignet. Im nächsten Schritt wurde die Injektion optimiert. Sowohl die Hochspannung für die Injektion wie auch die Trennung wurden gesteuert. Das bringt eine bessere Injektionskontrolle. Bis jetzt musste man die Hochspannung manuell regeln oder die Injektion und die Trennung mit der gleichen Spannung betreiben. Eine andere Verbesserung im Kreuz ergab der Ersatz der PEEK-Analyttröhr durch eine Kapillare.

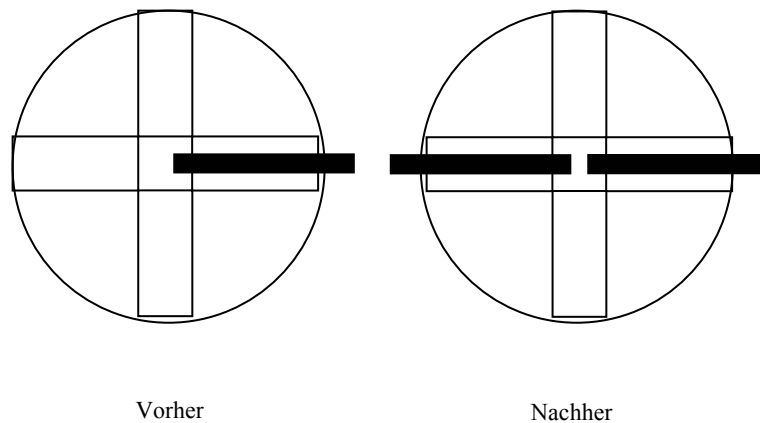


Abbildung 6.11: Inneres des Kreuzes ohne und mit der Kapillare (schwarz) im Proberohr des Kreuzes.

Mit der neuen Anordnung war der Abstand zwischen den Kapillaren weniger als der Abstand zwischen der Kapillare und dem Rohr. Man konnte weniger Probe injizieren und die Spülung war verbessert, weil der Fluss in der Mitte des Kreuzes, wo sich auch der Ausgang des Pufferrohrs befindet, stärker war. Die nächste Abbildung zeigt die gleiche Trennung von Abbildung 6.10 mit den neuen Verbesserungen und Optimierungen.

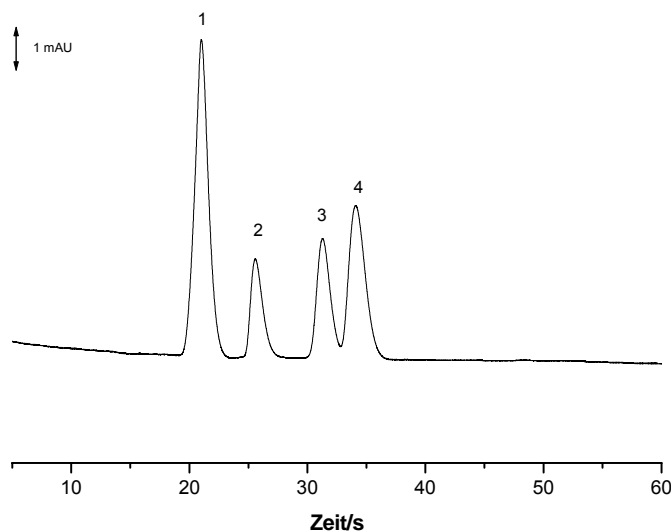


Abbildung 6.12: Elektropherogramm von 1 mM Thiamin (1), 1mM Histidin (2), 0.1 mM Propranolol (3) und 1 mM Labetalol (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 48 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Injektion: 25 kV für 1 s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die Optimierung in Abbildung 6.12 zeigt eine gute Trennung der vier Substanzen in weniger als 40 s. Der R.S.D.-Wert dieser Trennung liegt bei 5 % ($n = 5$), also noch im Bereich der Literatur [101], und die Nachweisgrenze liegt bei 3 μM .

6.4 Schlussfolgerung

Nach vielen Versuchen und Änderungen wurde ein Kompromiss gefunden. Die Reproduzierbarkeit mit dem HPLC Pumpen und den hydrostatischen Injektionen war besser als diejenige mit den Spritzenpumpen. Aber die HPLC Pumpen pumpten auch in die Kapillare und man erhielt keine reine Kapillarelektrophorese. Nur mit einem

verlangsamten Fluss, was mit einer HPLC Pumpe sehr schwierig ist, würden diese Effekte verschwinden. Zusätzlich waren die HPLC Pumpen nicht so gut für die Automation geeignet. Die hydrostatische Injektion ist für Routineanalysen nicht praktikabel. Mit den Spritzenpumpen und dem Pinchventil wurde ein komplett automatisches Injektionssystem für schnelle Analysen mit kurzer konventioneller Kapillare gebaut.

7 Einsatz des Injektors mit dem UV-Detektor

7.1 Einleitung

Zur Charakterisierung des neuen Injektors wurden verschiedene Grundexperimente mit einem kommerziellen UV-Detektor durchgeführt. Alle möglichen Kapillarelektrophoreseparameter wurden geprüft. Nur die verschiedenen Kapillarinne Durchmesser wurden wegen der Lichtwegstreckenbeschränkung des UV-Detektors nicht untersucht. Ein Parameter wurde geändert, während die anderen konstant gehalten wurden. Die Bodenzahl, der am häufigsten verwendete Parameter, wurde zur Quantifizierung der Trennungsleistung berechnet. Als Testsubstanz wurden die vier pharmazeutischen Verbindungen benutzt, die schon in Kap. 6 verwendet wird. Thiamin, auch bekannt als Vitamin B1, die Aminosäure Histidin, die zur Behandlung von Allergien dient, und zwei Beta-Rezeptorenblocker Labetalol und Propranolol, welche beim Puffer-pH kationisch sind. Alle vier Substanzen absorbieren direkt bei 220 nm.

7.2 Der Einfluss der Kapillarlängen

Die erste Abbildung (7.1) zeigt vier Trennungen mit der gleichen Feldstärke (300 V/cm) und mit unterschiedlicher effektiver Kapillarlänge von 8 cm bis 64 cm.

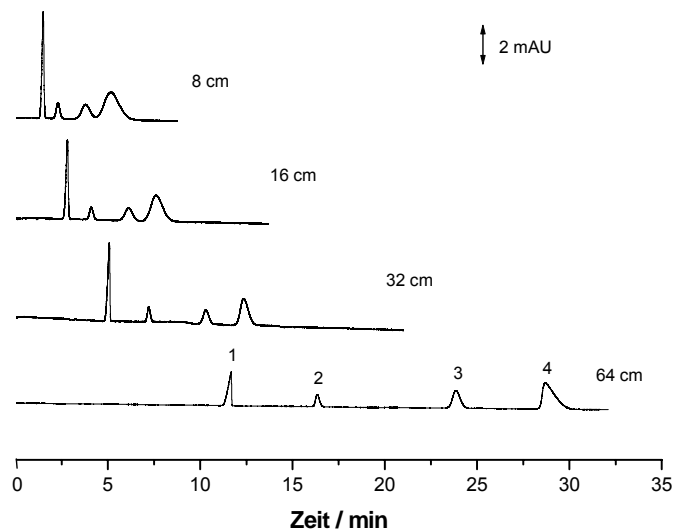


Abbildung 7.1: Vier Elektropherogramme von unterschiedlichen effektiven Kapillarlängen von 1 mM Thiamin (1), 1mM Histidin (2), 0.1 mM Propranolol (3) und 1 mM Labetalol (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Feldstärke 300 V/cm, 75 μm i.d. Injektion: 25 kV für 2 s. Trennungsspannung: angepasst zur Kapillarlänge um die Feldstärken auszugleichen. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die Abbildungen zeigen genau, was erwartet wurde, und zwar, dass die Analysenzeit und der Separationseffizient von der Trennstreckenlänge beeinflusst werden. Zur besseren Quantifizierung wurde die Bodenzahl berechnet und in Abbildung 7.2 gezeigt.

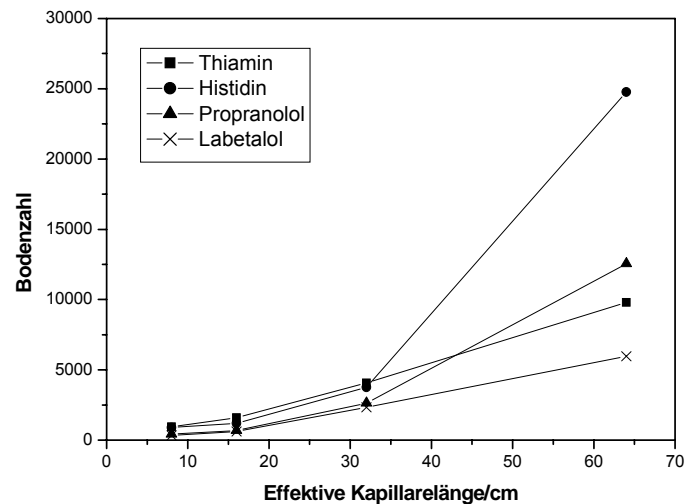


Abbildung 7.2: Bodenzahl in Funktion der effektiven Kapillarlänge für eine konstante elektrische Feldstärke von 300 V/cm. Bedingungen: 1 mM Thiamin (■), 1mM Histidin (●), 0.1 mM Propranolol (▲) und 1 mM Labetalol (▼), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt, 75 μm i.d. Injektion: 25 kV für 2 s. Trennungsspannung: angepasst zur Kapillarlänge, um die Feldstärke auszugleichen. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die Bodenzahlen sind höher für längeren Kapillare und hängen stark vom Analyten ab. Der Grund dafür könnte sein, dass die Bandverbreiterung durch Diffusion ausgeprägter ist für Analyten mit einer langen Migrationzeit. Wie man in Abbildung 7.1 bei der 64 cm Kapillare gut sehen kann, sind der erste und der letzte Peak nicht symmetrisch. Die "frontenden" und "tailenden" Peaks sind durch die verschiedenen Mobilitäten von Puffer und Analyten gegeben, das als Elektrodispersion bezeichnet wird [58,99]. Wenn dieser Effekt vermutlich einen grösseren Einfluss auf die Bandverbreiterung der nicht symmetrischen Peaks (1,4) hat, dann mit dem Resultat, dass der grosse Bodenzahlunterschied bei verschiedenen Analyten mit der längsten Kapillare

zu sehen ist. Um den Einfluss der Diffusion zu quantifizieren wurde ein Test durchgeführt. Mit der 8 cm effektive Kapillarlänge wurde 15 s nach der Injektion die Hochspannung während 30 s ausgeschaltet. Dann wurde die Bodenzahl berechnet und mit der Trennung ohne Abbruch der Hochspannung verglichen. Bei 8 cm ist die Diffusion vernachlässigbar, weil die Bodenzahlen für beiden Messungen vergleichbar sind.

Wenn die Hochspannung gleich nach der Injektion während 30 s abgebrochen wurde, zeigten sich nur die schnelleren Peaks auf dem Elektropherogramm. Nur wenn mehr injiziert wurde, wurden alle vier Peaks detektiert. Ein unerwünschter Effekt entsteht während des Injektionsvorgangs: Während der Spülung des Kreuzes und bei ausgeschaltetem Hochspannungsgerät, wurden der Puffer und die Probe ein bisschen aus der Trennkapillare gesaugt. Wurde zu lange gewartet, blieb nur das schnelle Ion (Thiamin) in der Kapillare und so war es das einzige, das injiziert wurde. Dieser Effekt könnte von Bernoulli entdeckt worden sein. Er fand heraus, dass der von einer Flüssigkeit ausgeübte Druck umgekehrt proportional zu seiner Fließgeschwindigkeit ist. Dieser Effekt könnte eine Bandverbreiterung bringen, weil mehr Probe injiziert werden muss (siehe Kap 7.6).

Die Bodenzahl ist nicht der einzige wichtige Parameter. Wichtig sind auch die Auflösung R (die Basislinienseparation von zwei Peaks) und die Peakkapazität einer Trennung (siehe Kap. 2.2.2.5). Diese Parameter wurden für die vier unterschiedlichen effektiven Längen berechnet. Die theoretische Peakkapazität wurde als die Anzahl Peaks definiert, die in dem Elektropherogramm zwischen dem Peak für das Kalium-Ion (eines der schnellsten Ionen) und dem System-Peak durch die EOF entsteht. Das Kaliumpeak wurde durch die Mobilität ($7.6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [66] berechnet, weil es unmöglich mit direkter UV- Detektion zu bestimmen ist. Die Resultate sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Effektive / gesamte Kapillarlänge (cm)	Berechnete K ⁺ Peak (s)	Migrationszeit des EOF Peaks (s)	Durchschnittliche Peak-Grösse (s)	Auflösung R für Propranolol und Labetalol	Peakkapazität
8 / 42	14	82	2.6	1.11	26
16 / 50	33	220	3.0	1.13	61
32 / 66	88	518	17.3	2.12	24
64 / 98	261	1538	56	4.16	22

Tabelle 7.1: Trennungparameter für verschiedene Kapillarlängen (Injektion: 2 s 25kV, Trennung: 30 kV)

Man sieht eindeutig, dass sich die Auflösung mit den längeren Kapillaren verbessert. Die Peakkapazität ist mit einer relativ kürzeren Kapillare (16 cm) besser, aber diese ist nicht immer die beste Wahl für eine gute Trennung. Manchmal sind die Peaks nicht genügend getrennt. Man muss einen Kompromiss zwischen den Auflösung und der Analysenzeit schliessen.

7.3 Der Einfluss der Geometrie des Detektors

In den ersten Versuchen wurde bewiesen, dass die Geometrie des Detektors die Trennparameter nicht einschränkt. Zuerst wurde der UV-Detektor, der für diesen Test gebraucht wurde, mit einem anderen UV-Detektor ersetzt. Der Aufbau des zweiten Detektors basierte auf einer optischen Faser, die senkrecht mit der Kapillare gekoppelt ist. Bei den Messungen mit den verschiedenen UV-Detektoren wurde kein Unterschied festgestellt.

In einem anderen Versuch wurde der Einfluss der Fenstergrösse der Kapillaren untersucht. Mit schwarzem Klebband wurde das Fenster der Kapillaren schrittweise von 1 cm auf 0.2 mm verkleinert. Auch hier konnte kein Unterschied von Bodenzahl festgestellt werden. Die Geometrie des Detektors verursachte also keine zusätzliche Bandverbreiterung.

7.4 Der Einfluss der Feldstärke

Es wurde eine effektive Länge von 8 cm gewählt, da dies der typischen Trennstreckenlänge eines Chips entspricht. Der Einfluss der Feldstärke wurde als anderer wichtige Parameter bestimmt. Je kürzer die gesamte Kapillarlänge, desto grösser die Feldstärke. Mit 40 cm Kapillarlänge und 30 kV Trennungsspannung, das normale Maximum der Spannungsversorgung, wurde eine Feldstärke von 700 V/cm erzeugt. Durch die geometrische Limitierung des UV-Detektors ist es nicht möglich eine kürzere Kapillare einzusetzen, um eine grössere Feldstärke zu erzeugen. Im nächsten Kapitel wurde mit einem Leitfähigkeitsdetektor gemessen, der kürzere Kapillarlängen zulässt.

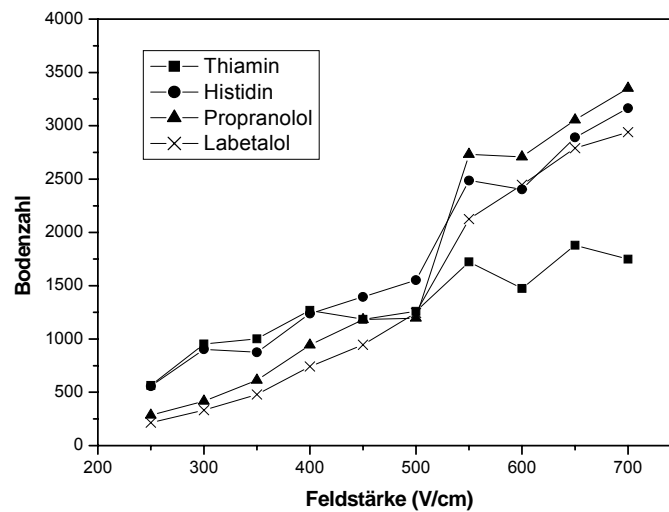


Abbildung 7.3: Bodenzahl in Funktion der verschiedenen Feldstärken. Bedingungen: 1 mM Thiamin (■), 1 mM Histidin (●), 0.1 mM Propranolol (▲) und 1 mM Labetalol (▼), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 42 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Injektion: 25 kV für 2 s. Trennungsspannung: angepasst zur Feldstärke. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die Abbildung 7.3 zeigt, dass je höher die Feldstärke desto schmalere Peaks sind. Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich durch die kleineren Migrationzeiten bei grösseren Feldstärken gegeben, und der dadurch limitierten Bandverbreiterung durch die Diffusion, da diese zeitabhängig ist. Die mit der 8 cm effektiven Kapillarlänge erhaltenen Bodenzahlen von 1500-3500 für die vier Moleküle, sind mit den Bodenzahlen vergleichbar, die mit dem Chip mit der ähnlichen Trennstrecke gemessen wurden. Die UV-Detektion ist mit dem Chip nicht üblich, aber Ludwig und Mitarbeiter [158] setzten ein neues kommerzielles Gerät mit UV-Absorption in einer ihrer Experimente ein. Für einen Peak eines Tocainidderivates wurde mit einer Trennstrecke

von 2.5 cm nach 23 s eine Bodenzahl von 3000 gemessen. Wang und Chen [159] zeigten eine schnelle Messung von aromatischen Aminosäuren mit einem amperometrischen Detektor. Die Bodenzahlen mit einem Kanal von 7.4 cm Länge erreichten Werte zwischen 400-1300. Tanyanyiwa und Mitarbeiter [126] bestimmten verschiedene organischen Ionen mit einem Chip mit einem 8 cm langen Trennkanaal. Dazu wurde ein kontaktloser Leitfähigkeitsdetektor benutzt. Die gemessenen Bodenzahlen lagen zwischen 2000 und 4000.

7.5 Der Einfluss der Konzentration

Als nächster Parameter wurde der Effekt der Konzentration der injizierten Probe auf die Bodenzahl studiert.

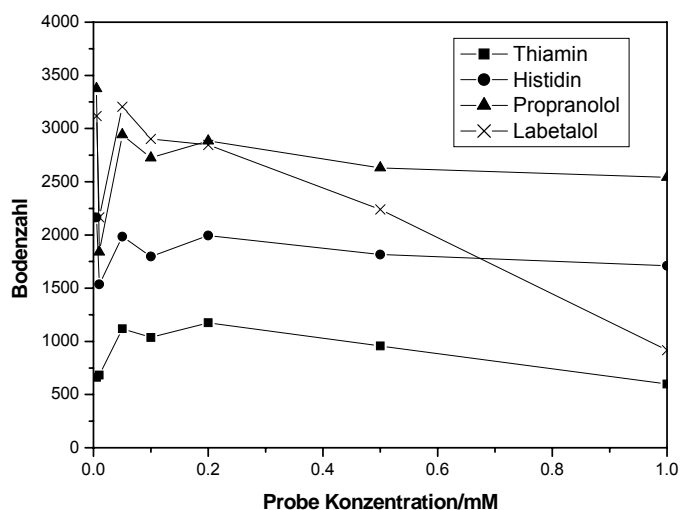


Abbildung 7.4: Bodenzahl in Funktion der verschiedenen Konzentrationen. Bedingungen: Thiamin (■), Histidin (●), Propranolol (▲) und Labetalol (X), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 42 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Injektion: 25 kV für 2 s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Wie in Abbildung 7.4 ersichtlich, ist der Einfluss der Konzentration limitiert. Nur bei dem Molekül mit der grössten Migrationszeit (Labetalol) sieht man einen anderen Trend. Labetalol hat einen grossen tailenden Peak (siehe Abb. 7.1). Der Grund ist die durch den Analyten hervorgerufene Inhomogenität des Feldes, und diese ist umso grösser, wenn die Differenz der Mobilitäten von Puffer und Probe auch grösser ist. Dieser Effekt ist, wie erwartet, wichtiger bei höheren Konzentrationen.

7.6 Der Einfluss der Injektionsmenge

Als letzter Parameter wurde der Einfluss der Injektionsmenge, gegeben durch die Injektionszeit, auf die Bodenzahl analysiert.

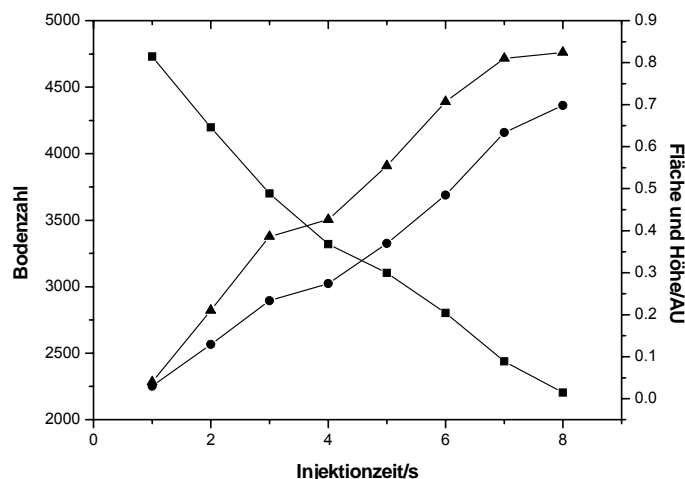


Abbildung 7.5: Bodenzahl (■), Peakfläche (●) und Peakhöhe (▲) in Funktion der verschiedenen Injektionszeiten. Bedingungen: 1 mM Thiamin (1), 1 mM Histidin (2), 1 mM Propranolol (3) und 1 mM Labetalol (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM Tris, pH 3.8 mit Essigsäure eingestellt. Kapillarlänge 42 cm, bis zum Detektor 8 cm, 75 μm i.d. Injektion: 10 kV für x s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Spectraphoresis 1000. 220 nm. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Abbildung 7.5 zeigt eine lineare Abhängigkeit zwischen Bodenzahl und Injektionszeit. Je kürzer die Injektionszeiten, desto höher sind die Bodenzahlen. Durch die kürzeren Injektionszeiten erhält man auch kleinere Peakfläche und Peakhöhe, da diese proportional zur Injektionszeit sind. Kleinere Peaks bedeuten einen Verlust an Empfindlichkeit und ein kleineres Verhältnis zwischen dem Signal und dem Rauschen, dass zu einer höheren Nachweisgrenze führen kann.

7.7 Schlussfolgerung

Ein Grundstudium wurde durchgeführt, um die Messung mit der kürzen Kapillare zu charakterisieren. Es wurde ein UV-Detektor gewählt, weil UV-Detektoren die meistverbreiteten Detektoren in der Kapillarelektrophorese sind. Für eine optimale Messung musste man einen Kompromiss zwischen der bestmöglichen Kapillarlänge, Auflösung und Analysenzeit finden. Die Feldstärke konnte nur so gross gewählt werden, wie die erzeugte Joule-Wärme keinen zu grossen Einfluss hatte. Ein weiterer Kompromiss musste zwischen der Injektionsmenge und der Empfindlichkeit gefunden werden. Die Bodenzahl und die Analysenzeit sind mit dem Chip vergleichbar. Aus diesem Grund wurde weiterhin mit dem Injektionskreuz gearbeitet.

8 Einsatz des Injektors mit dem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor

8.1 Einleitung

In den letzten Jahren ist der kontaktlose Leitfähigkeitsdetektor als Alternative zum UV-Vis-Detektor immer relevanter geworden [120]. Mit dem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor wurden die Einschränkungen des UV-Detektors, d.h. die Kapillarinne Durchmesserabhängigkeit, der Einfluss des Chromophors behoben. Auch die geometrischen Begrenzungen des Spectrophoresis-UV-Detektors sind irrelevant geworden.

Unterschiedliche Kapillarinne Durchmesser und verschiedene Feldstärken wurden, analog zu Kap 7, als Trennparameter geprüft. Nach diesen Grundversuchen wurden einige andere Versuche durchgeführt. Als Testsubstanz wurden drei häufig vorkommende Salze von Alkalimetallen (K^+ , Na^+ und Li^+) und ein Erdalkalimetall (Mg^{2+}) benutzt, die mit einem UV-Detektor nur indirekt detektierbar sind.

8.2 Optimierung des kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektors

Im ersten Vorversuch wurde die Frequenz und die Amplitude des Frequenzgenerators optimiert, um ein besseres Signal zum Rauschenverhältnis zu erhalten. Die Amplitude wurde auf einen typischen Wert von 20 V fixiert [120]. Danach wurden diverse Messungen mit unterschiedlichen Frequenzen durchgeführt. Mit einer Frequenz von 720 kHz wurde das beste Resultat erzielt, wie in der Literatur [116] beschrieben ist. Danach wurde bei dieser Frequenz noch die Amplitude zwischen 2 V und 30 V gemessen, um zu kontrollieren, ob auch in diesem Fall das beste Resultat mit 30 V erreicht wurde.

Beim zweiten Versuch wurde die Distanz zwischen der Anregungs- und Empfangselektrode verändert. Mit einem Kapillarinne Durchmesser von 25 und 50 μm wurden folgende Messungen durchgeführt:

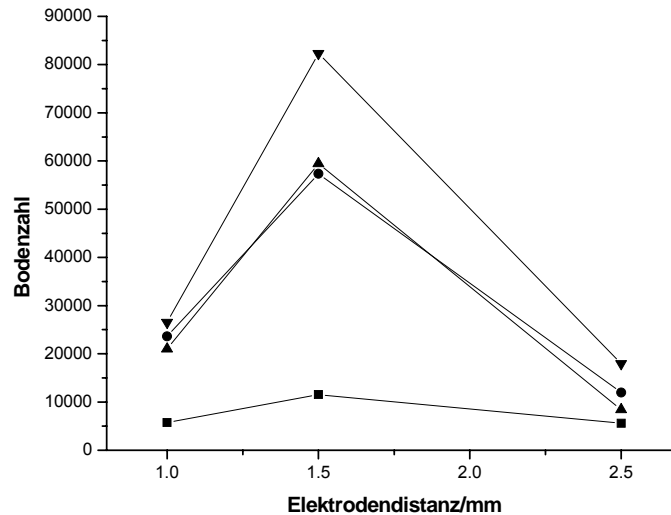


Abbildung 8.1: Bodenzahl in Funktion der verschiedenen Elektrodendistanzen. Bedingungen: 0.1 mM K⁺ (■), 0.1 mM Na⁺ (●), 0.1 mM Mg²⁺ (▲) und 0.1 mM Li⁺ (▼) gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/HIS, pH 6.1. Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 20 cm, 50 μm I.D. Injektion: 5 kV für 4 s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Abbildung 8.1 zeigt, dass die besten Bodenzahlen bei einer Elektrodendistanz von 1.5 mm erreicht wurden. Auch mit einem Kapillarinne Durchmesser von 25 μm wurde das gleiche Ergebnis erreicht. Gemäss Gleichung 32 ergibt sich, je näher die Elektroden sind, desto höher ist die Leitfähigkeit. Daraus folgt, dass der Strom auch grösser ist, d. h. dass der Peak höher ist und folglich auch die Bodenzahl, wie auch in der Literatur [124] beschrieben ist. Das ist nicht der Fall in Abbildung 8.1. Ein zusätzlicher und unerklärlicher Effekt muss in der benutzten Zelle stattfinden.

8.3 Der Einfluss der Kapillarlängen

Die Abbildung 8.2 zeigt vier Trennungen mit der gleichen Feldstärke (850 V/cm) und mit unterschiedlichen effektiven Kapillarlängen von 5 cm bis 20 cm.

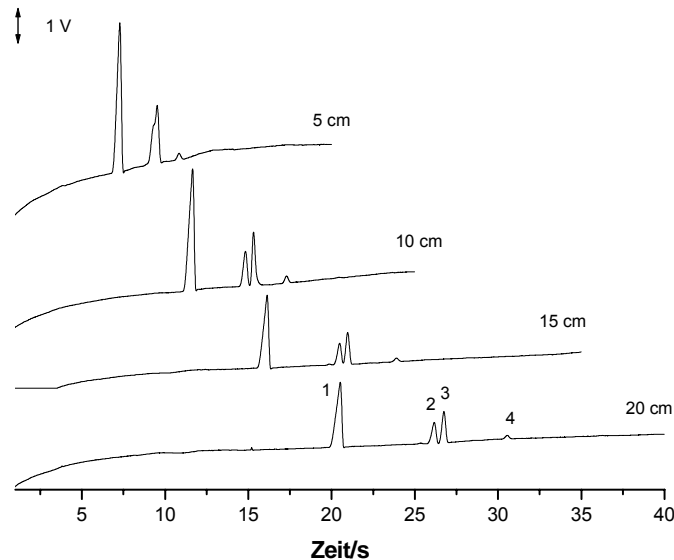


Abbildung 8.2: Vier Elektropherogramme mit unterschiedlichen effektiven Kapillarlängen von 0.1 mM K⁺ (1), 0.1 mM Na⁺ (2), 0.1 mM Mg²⁺ (3) und 0.1 mM Li⁺ (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/His, pH 6.1. Feldstärke 850 V/cm, 50 μ m i.d. Injektion: 5 kV für 4 s. Trennungsspannung: 30kV. Detektor: kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 μ l/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 μ l/min.

Die Abbildung 8.2 zeigt, wie bereits in Kapitel 7 erwähnt, dass die Analysezeit und der Separationseffizient von der Trennstreckenlänge beeinflusst werden. Mit 10 cm effektiver Kapillarlänge wurden die vier Kationen in weniger als 20 s in den Basislinien getrennt. Man sieht auch eine kleine Drift der Basislinien, die grösser bei der kleinsten Trennstrecke und bei grösseren Kapillareinnendurchmessern ist. Bei 25 μ m ist die Drift

vernachlässigbar. Der Grund dafür ist nicht so deutlich. Es könnte sein, dass diese Drift durch den Joule-Wärme-Effekt oder durch elektrische Ladungsphänomene hervorgerufen wurde. Den grössten Beitrag an die Peakverbreiterung bei kleinen Ionen leistet normalerweise die Diffusion. Dieser Effekt ist bei diesen kurzen Messzeiten wichtig, denn je länger die Migrationszeit ist, desto kleiner und breiter sind die Peaks. Zur besseren Quantifizierung des Trenneffizient wurden die Bodenzahlen berechnet (s. Abbildung 8.3).

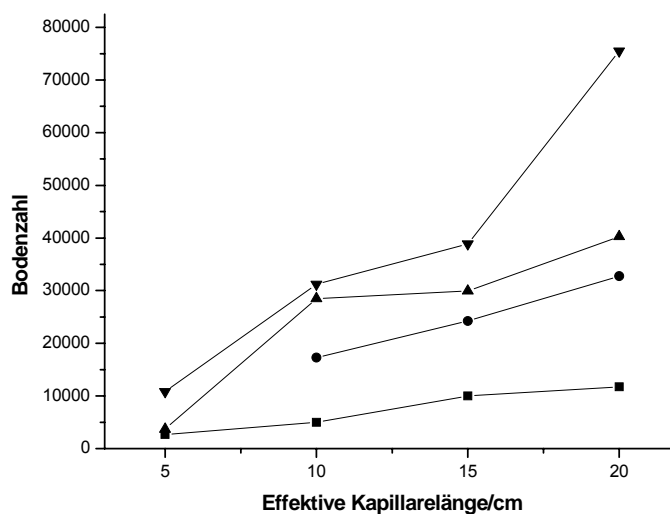


Abbildung 8.3: Bodenzahl in Funktion der effektiven Kapillarlänge bei einer konstanten elektrischen Feldstärke von 850 V/cm. Bedingungen: 0.1 mM K⁺ (■), 0.1 mM Na⁺ (●), 0.1 mM Mg²⁺ (▲) und 0.1 mM Li⁺ (▼), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/His, pH 6.1. 50 µm i.d. Injektion: 5 kV für 4 s. Trennungsspannung: 30kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 µl/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 µl/min.

Wie bei der Messung mit dem UV-Detektor in Abbildung 7.2 ersichtlich, stieg die Bodenzahl, wenn die Kapillare länger waren, da die Bodenzahl direkt proportional zur Migrationszeit ist (s Gleichung 18). Auch bei Kapillarinne Durchmesser von 75 µm

und 25 μm (in der Abbildung nicht gezeigt), wurde der gleiche Trend wie bei 50 μm beobachtet.

8.4 Der Einfluss der Feldstärke und des Kapillarinneendurchmessers

Mit dem kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor, im Gegensatz zum Spektrophoresis-UV-Detektor, konnten die Kapillaren zwischen Detektor und dem Puffergefäß von 34 cm auf 15 cm verkürzt werden. Aus Sicherheitsgründen war es nicht möglich, die Kapillaren noch weiter zu verkürzen, weil man dazu auf die Hochspannungsschutzbox verzichten musste. Es wurde also eine 25 cm Kapillare mit einer effektiven Trennstrecke von 10 cm benutzt, damit wurde eine Feldstärke von bis zu 1200 V/cm erzeugt. Die Testmischung wurde mit verschiedenen Feldstärken und Innendurchmessern analysiert.

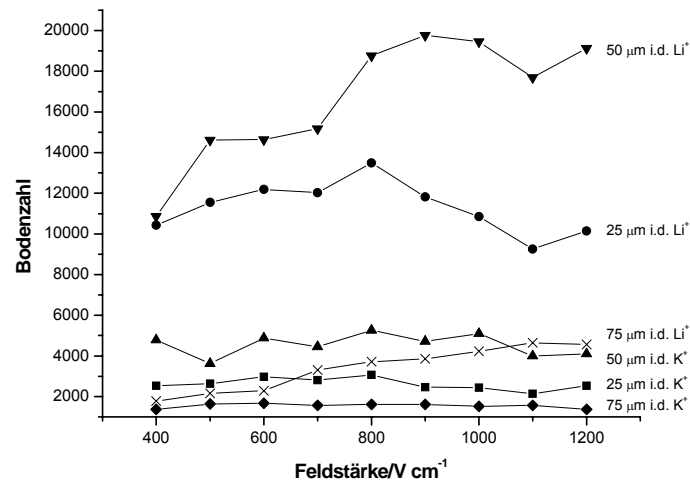


Abbildung 8.4: Bodenzahl in Funktion der verschiedenen Feldstärken und Kapillareninnendurchmessern. Bedingungen: 0.1 mM K⁺, 0.1 mM Na⁺, 0.1 mM Mg²⁺ und 0.1 mM Li⁺, gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/His, pH 6.1. Injektion: 5 kV für 4 s (8 kV für 4 s mit 75 i.d.). Kapillarlänge 10 cm, bis zum Detektor 25 cm. Trennungsspannung: Angepasst zur Feldstärke. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 μl/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 μl/min.

In Abbildung 8.4 wurden nur die Kalium- und Lithiumkationen angezeigt. Na⁺ und Mg²⁺ wurden bei dieser kleinen Trennstrecke und bei den verschiedenen Feldstärken nicht getrennt. Das schnellste Kation (K⁺) hatte einen konstanten Trend bei allen Innendurchmessern. Dagegen vergrößerte sich die Bodenzahl für das langsamste Kation (Li⁺) bei größeren Feldstärken. Einzige Ausnahme war bei der Kapillare mit einem Innendurchmesser von 25 μm, bei der sich die Bodenzahl bei Feldstärken größer als 800 V/cm verkleinerte. Durch die Erhöhung der Feldstärken wurden verbesserte Bodenzahlen erwartet. Doch nach einer gewissen Feldstärke, wurde eine Verschlechterung festgestellt, vermutlich gegeben durch die Joule-Wärme. Diese

Effekte hätten umso stärker sein müssen, je grösser der Kapillarrinnendurchmesser war und zwar wegen der schlechteren Wärmeabführung. Aber mit diesem Puffer wurden diese Effekte bei einem Innendurchmesser von 75 μm und 50 μm nicht beobachtet. Bei einer Trennstrecke von 20 cm wurden auch noch Messungen durchgeführt, um zu sehen, ob mit längeren Kapillaren die gleichen Trends beobachtet werden können.

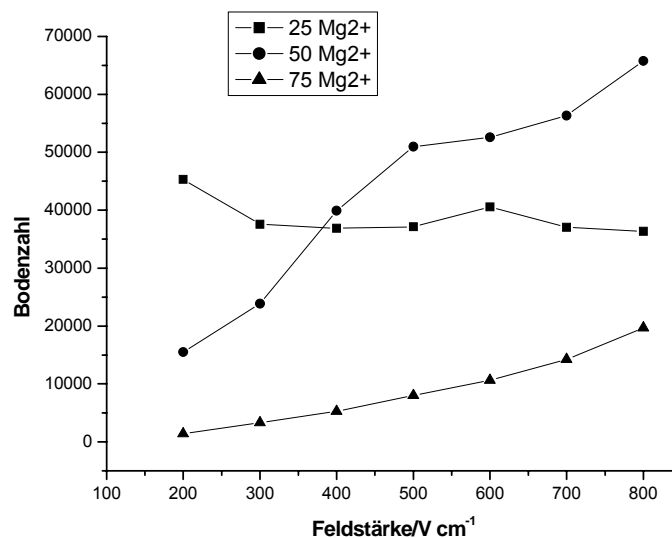


Abbildung 8.5: Bodenzahl in Funktion der verschiedenen Feldstärken und Kapillarrinnendurchmesser. Bedingungen: 0.1 mM K^+ , 0.1 mM Na^+ , 0.1 mM Mg^{2+} und 0.1 mM Li^+ , gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/His, pH 6.1. 25 μm i.d. (■), 50 μm i.d. (●) und 75 μm i.d. (▲). Injektion: 5 kV für 4 s (8 kV für 4 s mit 75 i.d.). Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 20 cm. Trennungsspannung: Angepasst zur Feldstärke. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Bei dieser Trennstrecke wurden auch Na^+ und Mg^{2+} getrennt. In Abbildung 8.5 wurde zum besseren Verständnis nur das Magnesiumkation gezeigt. Nur das Kaliumkation hatte einen konstanten Trend bei allen Innendurchmessern. Die anderen zwei Kationen hatten einen dem Magnesiumkation vergleichbaren Trend (Abb.8.5). Mit 25 μm Kapillarinne Durchmesser und mit dem schnellsten Kation (K^+) hatte man also nicht den Trend, den man erwartet hätte. Sehr wahrscheinlich ist die Verbesserung der Effizienz, die durch die Hochspannung gegeben ist, vernachlässigbar für die sehr kurzen Migrationszeiten des schnellsten Kations (K^+).

Abbildungen 8.4 und 8.5 zeigen auch, dass die besten Bodenzahlen bei einem Kapillarinne Durchmesser von 50 μm erreicht werden. Mit der elektrokinetischen Injektion wurde bei grösseren Kapillarinne Durchmessern mehr Analyt injiziert (s. Gleichung 24), was zu kleineren Bodenzahlen führte (s. Kap. 7.6 und 8.5). Bei grösseren Kapillarinne Durchmessern wie 75 μm könnte auch ein eventueller Effizienzverlust durch die Temperatureffekte einen negativen Einfluss gehabt haben. Für die Unterschiede zwischen 25 μm und 50 μm müssen aber noch andere Einflüsse eine Rolle gespielt haben. Der Absaugeffekt, der schon in Kap. 7.2 erwähnt wurde, könnte auch das Resultat beeinflusst haben. Dieser Effekt war grösser bei grösseren Innendurchmessern. So könnte die grössere Injektionsmenge, gegeben durch die elektrokinetische Injektion, in der 50 μm Kapillare, durch diesen Absaugeffekt kompensiert werden, so dass sich in der Kapillare mit 50 μm Innendurchmesser schlussendlich weniger Analyt befand als in der 25 μm Kapillare. Somit wurde eine grössere Bodenzahl gemessen. Eine Bestätigung dafür war, dass für die 75 μm nicht die gleiche Injektionszeit und Spannung wie bei den anderen zwei Grössen angewendet werden konnten, obwohl die elektrokinetische Injektion selbst mehr Analyt injiziert. Die Injektionszeit oder die Spannung mussten bei der 75 μm Kapillare erhöht werden, um die Analyten zu detektieren. Generell kann man aussagen, dass der 75 μm Kapillarinne Durchmesser eine kleinere Bodenzahl ergibt als die Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 und 25 μm . Das ist nicht der Fall mit dem UV-Detektor, wo die Empfindlichkeit mit einem kleineren Innendurchmesser als 50 μm , wegen der

Abhängigkeit des Lichtweges, sehr schlecht ist. Mit dem Leitfähigkeitsdetektor sollte man vorzugsweise, wie schon oben beim Drift diskutiert, kleine Kapillarrinnendurchmesser wählen.

8.5 Der Einfluss der Injektionsmenge

Als letzter Parameter wurde der Einfluss der Injektionsmenge, gegeben durch die Injektionszeit, analysiert.

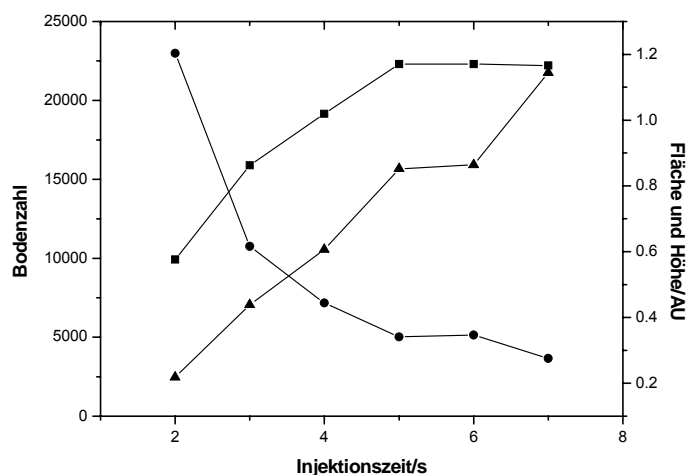


Abbildung 8.6: Bodenzahl (●), Peakfläche (▲) und Peakhöhe (■) in Funktion der verschiedenen Injektionszeiten. Bedingungen: 0.1 mM K^+ gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/His, pH 6.1. Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 20 cm, 25 μ m i.d. Injektion: 5 kV für X s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 μ l/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 μ l/min.

Es wurde nur ein Unterschied zwischen den Messungen mit dem Leitfähigkeitsdetektor (Abb. 8.6) und dem UV-Detektor (Abb. 7.5) festgestellt. Die Kurve der Peakhöhen ist nicht mehr linear, sondern nach 5 s Injektionszeit wurde ein Plateau erreicht. Wenn man

die verschiedenen Elektropherogramme aufzeichnet, kann man die Sättigung besser sehen.

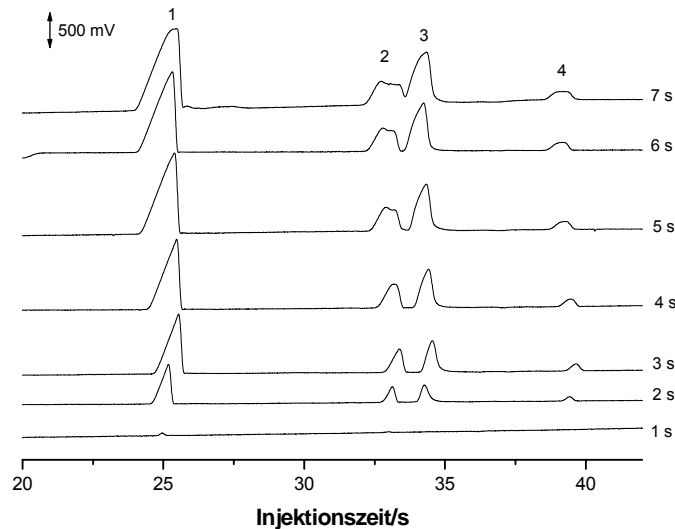


Abbildung 8.7: Sieben Elektropherogramme von unterschiedlichen Injektionszeit von 0.1 mM K⁺ (1), 0.1 mM Na⁺ (2), 0.1 mM Mg²⁺ (3) und 0.1 mM Li⁺ (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/His, pH 6.1. Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 20 cm, 25 µm i.d. Injektion: 5 kV für X s. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 µl/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 µl/min.

Die Sättigung sieht man am besten bei dem Natriumkationspeak (2). Nach 5 s ist die Peakhöhe konstant. Dies ist ein Hinweis dafür, dass keine Verdünnungseffekte in der Mitte der Probenzone stattfinden. Am Ende wurde noch die Nachweisgrenze mit der Methode Signal/Rauschen gleich 3 für die verschiedenen Kapillarinne Durchmesser gemessen. Die Resultate sind in Tabelle 8.1 zusammengefasst.

Kapillarinne Durchmesser (μm)	Injektionszeit (s) / Injektionsspannung (kV)	Signal (mV)	Rauschen (mV)	Nachweisgrenze (μM)
25	4/5	20	7	0.5
50	4/5	20	5	< 0.5
75	4/5	22	8	1
75	8/5	30	8	0.5

Tabelle 8.1: Die Nachweisgrenze mit verschiedenen Kapillarinne Durchmessern. Bedingungen $x \mu\text{M K}^+$, gelöst in Puffer. Trennpuffer: 20 mM MES/His, pH 6.1. Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 20 cm. Injektion: Siehe Tabelle. Trennspannung: 30 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Wie schon bei den Bodenzahlen, wurde die tiefste Nachweisgrenze bei einem Kapillarinne Durchmesser von 50 μm erreicht. Die Nachweisgrenze ist in diesem Fall nicht so stark von den Kapillarinne Durchmessern abhängig wie bei der UV-Detektion. Dieses spezielle Verhalten der Leitfähigkeitsdetektion ist durch die Änderung des Analytsignals und des Hintergrundsignals des Puffers mit dem Kapillarinne Durchmesser gegeben. Die höhere Bodenzahl der Messung mittels kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektors ist gegeben durch die höhere Empfindlichkeit jenes Detektors im Vergleich zum UV-Detektor (mit einem kleinen Lichtweg). Daraus folgt, dass wenig injiziert werden muss und dann eine hohe Bodenzahl erreicht wird.

8.6 Vergleich Chip und Kapillare

Die grösste Bodenzahl wurde für Li^+ mit einem Kapillarinne Durchmesser von 50 μm , einem elektrisches Feld von $800 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ und einer Trennstrecke von 20 cm erreicht und sie betrug ca. 90000. Für eine Trennstrecke von 10 und 5 cm entsprachen

die Bodenzahlen dieses Ions 34000 und 12800. Diese Resultate sind gut vergleichbar mit denen des elektrophoretischen Chips. Zhang und Manz [160] erreichten Bodenzahlen zwischen 5000 und 7000 für die Trennung von Fluorescein und Fluorescein-5-isothiocyanat in einem 2.8 cm langen Kanal. Grössere Bodenzahlen wurden von Obeid und Mitarbeitern [161] gemessen. Für Desoxyribonukleinsäure-Fragmente (DNS) erhielt man mit einem 6 cm langen Trennkanal Bodenzahlen von 70000. Diese hohe Zahl wurde aber mit einem grossen Molekül erreicht, für welches die Diffusionsverbreiterung minimal ist. Tanyanyiwa und Mitarbeiter [126] führten die Messungen von verschiedenen kleinen organischen Ionen im Chip mit einem Trennkanal von 8 cm mit der kontaktlosen Leitfähigkeit durch. Die erhaltenen Bodenzahlen waren zwischen 2000 und 4200. Rodriguez und Mitarbeiter [162] erhielten Bodenzahlen zwischen 1300 und 3400 für 8 derivatisierte biogene Amine in einem Trennkanal von 2.8 cm.

8.7 Anwendungen

8.7.1 Anorganische Kationen

Bei den ersten Anwendungen wurden acht verschiedene Salze von Alkali- und Erdalkalimetalle, und ein Übergangsmetall (Mn^{2+}) gemessen. Leitungswasser aus dem Universitätslabor und Wasser aus dem Rhein wurden mit einer Testlösung verglichen.

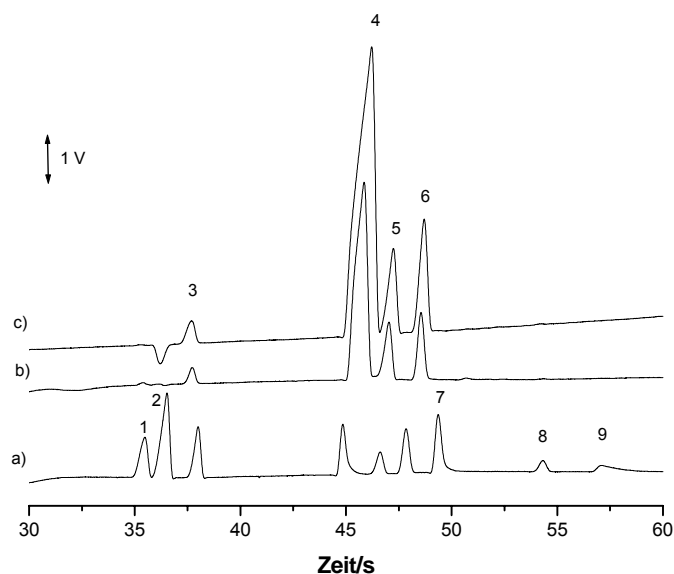


Abbildung 8.8: a) Elektropherogramm von 0.1 mM Rb^+ (1), 0.1 mM NH_4^+ (2), 0.1 mM K^+ (3), 0.1 mM Ca^{2+} (4) 0.1 mM Na^+ (5), 0.1 mM Mg^{2+} (6), 0.1 mM Mn^{2+} (7), 0.1 mM Li^+ (8) und 0.1 mM Ba^{2+} (9), gelöst in Puffer. b) Elektropherogramm von Leitungswasser und c) von Rheinwasser beider 1:1 mit Puffer verdünnt. Trennpuffer: 20 mM MES/His, 1mM 18-Krone-6 pH 6.1. Kapillarlänge 38 cm, bis zum Detektor 23 cm, 50 μm i.d. Injektion: 3 s, 5 kV. Trennungsspannung: 23 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Kronether wurde dazugegeben, um die Ammonium- und Kaliumionen zu trennen. Die Struktur des 18-Krone-6 mit einem Kavitätsradius von 1.38 Å passt besser zu dem Kaliumradius von 1.38 Å als zu dem Ammoniumradius von 1.51 Å. So komplexiert dieses Kronether besser mit Kaliumion und verlangsamt dessen Wanderungsgeschwindigkeit deutlich gegenüber Ammoniumion [163]. In einer Minute wurden die neun Kationen getrennt. K^+ , Ca^{2+} , Na^+ und Mg^{2+} wurden auch in den beiden Wasserproben gefunden. Die zwei Wasserproben hatten also die gleiche

Zusammensetzung und auch die gleiche Konzentration, d. h. dass es möglich ist, dass das Leitungswasser, vor der mikrobiologischen Behandlung, aus dem Rhein stammt. Und es ist tatsächlich so, denn das Wasser der Stadt Basel wird von Wasser aus dem Rhein gewonnen. Das Rheinwasser wird mechanisch und biologisch gereinigt. Danach werden bewaldete Wasserstellen mit diesem filtrierte Rheinwasser überflutet. Dabei sickert das Wasser durch mehrere Bodenschichten in das Grundwasser. Das saubere Grundwasser wird zur Verhinderung einer Verkeimung desinfiziert und als Trinkwasser in die Reservoirs gefördert [164]. In den Industriellen Werken Basel (IWB) wurde eine Untersuchung von Basler Trinkwasser an zwei Tagen im Februar 2004 durchgeführt [165]. Die Konzentration an Kationen aus dem Leitungswasser stimmte 5 Monate später mit den Messungen der IWB überein.

8.7.2 Anorganische Anionen

Als zweite Anwendung wurden sechs verschiedene anorganische Anionen getrennt. Wie bei den Alkali- und Erdalkalimetallionen (Abb 8.8) wurde auch in diesem Fall Leitungswasser und Wasser aus dem Rhein gemessen.

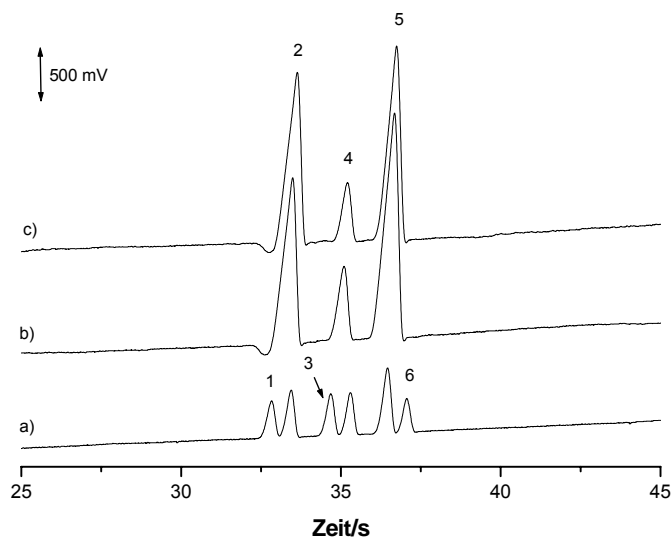


Abbildung 8.9: a) Elektropherogramm von 0.1 mM Bromid (1), 0.1 mM Chlorid (2), 0.1 mM Nitrit (3), 0.1 mM Nitrat (4) 0.1 mM Sulfat (5) und 0.1 mM Perchlorat (6), gelöst in Puffer. b) Elektropherogramm von Leitungswasser und c) von Rheinwasser beide 1:1 mit Puffer verdünnt. Trennpuffer: 10 mM MES/His, 0.00015% Hexadimethrine bromide, pH 6.1. Kapillarlänge 45 cm, bis zum Detektor 25 cm, 50 μm i.d. Injektion: 3 s, -5 kV. Trennungsspannung: -30 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Hexadimethrine wurde dazugegeben, um den EOF-Fluss umzukehren [166]. In weniger als 38 s, statt in 6 Minuten von Tanyanyiwa und Mitarbeitern [114] mit einer 74 cm Kapillarlänge, wurden die sechs Anionen in den Basislinien getrennt. Chlorid, Nitrat und Sulfat wurden auch in den Wasserproben gefunden. Wie schon bei den Kationen wurde die Werte mit denen von den IWB-Untersuchungen verglichen und auch in diesem Fall waren die Werte vergleichbar.

8.7.3 Kohlenhydrate

In der dritten Anwendung wurden vier verschiedene Zucker getrennt. Die Kohlenhydrate wurden schon lange untersucht, vor allem wegen ihrer Wichtigkeit in der Lebensmittelwissenschaft und in der Biochemie. Da die Kohlenhydrate keine elektrische Ladung haben, mussten sie in Ionen konvertiert werden damit sie mit CE detektiert werden konnten. Die Ladung kann mit Interaktion mit Oxalsäure [167], Borat [168], mit Metall-Kationen [169], durch das Anhängen eines geladenen Moleküls [170] oder in starkem alkalischen Milieu [129,171-173] erfolgen.

Die Hydroxylgruppen wurden in diesem Fall in starkem alkalischen Milieu schwach dissoziiert. Die Kohlenhydrate haben generell keine guten Absorptions- und Fluoreszenz-Eigenschaften. Deswegen muss man die Moleküle derivatisieren [88,174,175] oder indirekt detektieren [88,171,176,177]. Aus diesen Gründen wurde bei den dissoziierten Kohlenhydraten der kontaktlose Leitfähigkeitsdetektor benutzt und nicht der UV- oder Fluoreszenzdetektor.

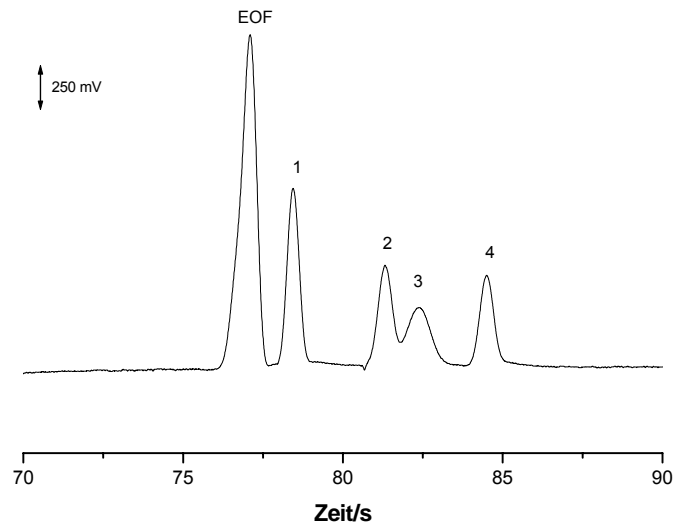


Abbildung 8.10: Elektropherogramm von 1 mM Saccharose (1), 1 mM Galactose (2), 1 mM Glucose (3) und 1 mM Fructose (4), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM NaOH, 4.5 mM Na₂HPO₄, 0.00015% Hexadimethrinbromide, pH >12 Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 20 cm. 15 µm i.d. Injektion: 2 s, -7 kV. Trennspannung: -20 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 µl/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 µl/min.

Hexadimethrin wurde in der gleichen Menge zugesetzt wie bei der Anionenbestimmung (Kap. 8.6.2). In diesem Fall war die EOF nur verlangsamt und nicht umgekehrt. Bei hohen pH-Werten lagen mehr Silanolgruppen in der anionischen Form vor, deswegen musste mehr EOF-Modifizier benutzt werden, um die Doppelschicht aufzubauen und den Fluss damit umzukehren (s. Kap. 2.2.2.4). Durch Zugabe von Phosphat zu dem Puffer wurde die Basisliniestabilität verbessert [129]. In Abbildung 8.10 ist das Elektropherogramm einer Standardmischung von Saccharose, Galactose, Glucose und Fructose zu sehen. Aufgrund der hohen Leitfähigkeit des Hintergrundelektrolyten wurde ein Kapillarrinnendurchmesser von 15 µm benutzt.

8.7.4 Kohlenhydrate und Aminosäuren

Die Aminosäuren haben einen amphoteren Charakter, deswegen konnte man sie sowohl in der kationischen Form als auch in der anionischen Form analysieren. Nur in relativ starken sauren oder basischen Bedingungen verliert die Aminosäure ihre zwitterionische Form. Bei pH 7 wenn die Seitenkette neutral ist, ist auch ihre Gesamtladung neutral. Unter den gleichen Bedingungen des vorherigen Versuchs konnten auch die Aminosäuren, zusammen mit den Kohlenhydraten getrennt werden.

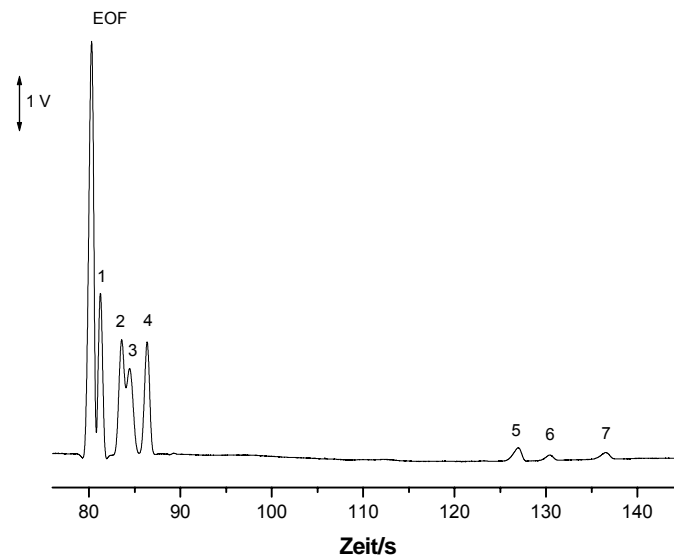


Abbildung 8.11: Elektropherogramm von 1 mM Saccharose (1), 1 mM Galactose (2), 1 mM Glucose (3), 1 mM Fructose (4), 1 mM Leucin (5), 1 mM Methionin (6) und 1 mM Threonin (7), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM NaOH, 4.5 mM Na₂HPO₄, 0.00015% Hexadimethrine bromide, pH >12 Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 25 cm. 15 µm i.d. Injektion: 2 s, 10 kV. Trennspannung: 20 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 µl/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 µl/min.

Abbildung 8.11 zeigt die Trennung von Kohlenhydraten und drei essentiellen Aminosäuren, die nicht UV-absorbierend sind. Die essentiellen Aminosäuren sind neun: Histidin, Phenylalanin, Tryptophan, die UV-Licht absorbieren und Isoleucin, Leucin, Methionin, Threonin, Lysin und Valin. Die essentiellen Aminosäuren sind diejenige die der menschliche Körper nicht selbst synthetisieren kann. Wie schon in Abbildung 8.10 wurde die Trennung mit der normalen Polung durchgeführt, weil die Kohlenhydrate unter diesen Bedingungen langsamer als die Anionen und die Aminosäuren immer noch detektierbar waren. Die Kohlenhydrate wurden unter diesen Bedingungen nicht in den Basislinien getrennt. Zur besseren Trennung wurde die EOF umgekehrt.

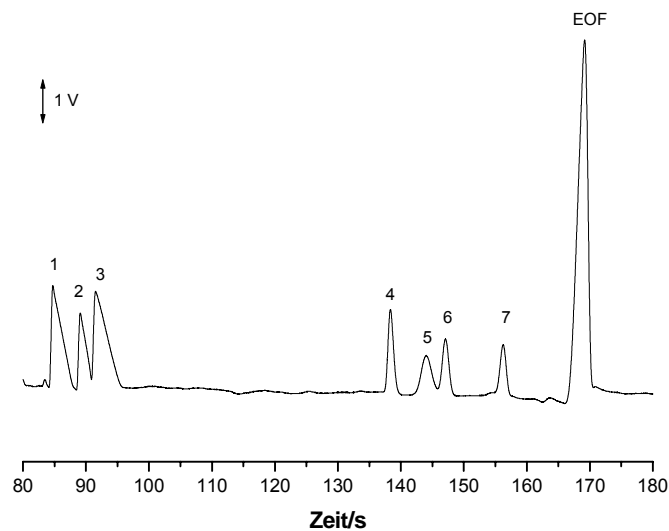


Abbildung 8.12: Elektropherogramm von 1 mM Threonin (1), 1 mM Methionin (2), 1 mM Leucin (3), 1 mM Fructose (4), 1 mM Glucose (5), 1 mM Galactose (6) und 1 mM Saccharose (7), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM NaOH, 4,5 mM Na₂HPO₄, 1 mM CTAB, pH >12. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 25 cm. 15 µm i.d. Injektion: 2 s, -20 kV. Trennungsspannung: -20 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 µl/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 µl/min.

Abbildung 8.12 zeigt dass sich mit der Umkehrung der EOF die Analyten besser trennen. In dem Versuch mit Aminosäuren und Kohlenhydraten wurde eine grössere CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Konzentration benutzt. Obwohl Carvalho und Mitarbeiter [129] eine Konzentration von 0.2 mM CTAB für den gleichen Puffer verwendeten, wurde mit CTAB Konzentrationen von 0.2 mM und 0.5 mM keine EOF-Umkehrung erzielt. Eine Studie von Lucy und Underhill [95] zeigte, wie die Doppelschicht mit unterschiedlichen CTAB-Konzentrationen und pH-Werten entstand. Durch Erhöhung der CTAB Konzentrationen im Puffer, wurde zuerst die EOF umgekehrt. Über einer gewissen Konzentration blieb die EOF-Mobilität konstant. So wurde eine Konzentration von 0.9 mM [178], die leicht grösser als die CMC (Critical micelle concentration) ist, gewählt, um die EOF umzukehren. Der Unterschied zwischen normalen EOF oder umgekehrten EOF liegt darin, dass bei umkehrten EOF, bei gleicher Signalintensität und gleicher Analytkonzentration, die Trennung besser ist.

Unter gleichen Bedingungen wurde auch ein Elektropherogramm mit einer Konzentration von 0.1 mM per Analyt aufgenommen.

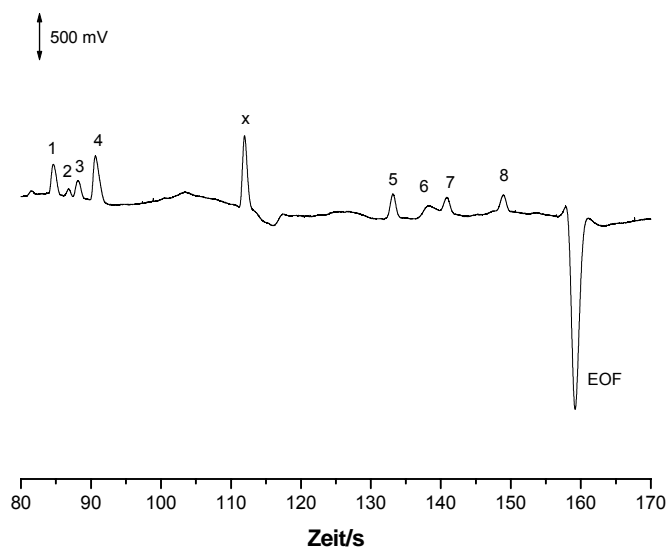


Abbildung 8.13: Elektropherogramm von 0.1 mM Threonin (1), 0.1 mM Methionin (2), 0.1 mM Isoleucin (3), 0.1 mM Leucin (4), 0.1 mM Fructose (5), 0.1 mM Glucose (6), 0.1 mM Galactose (7) und 0.1 mM Saccharose (8), gelöst in Puffer. Trennpuffer: 10 mM NaOH, 4.5 mM Na₂HPO₄, 1 mM CTAB, pH >12. Kapillarlänge 40 cm, bis zum Detektor 25 cm. 15 µm i.d. Injektion: 5 s, -5 kV. Trennungsspannung: -20 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 µl/min. Flussrate der Analytpumpe: 20 µl/min.

Wie in Abbildung 8.13 ersichtlich, trat ein Systempeak (X) auf und die Basislinie war nicht stabil. Sehr wahrscheinlich war die Unstabilität durch die Kombination von hohen pH-Werten und CTAB [179] gegeben. Beckers, Gebauer und Bocek haben verschiedene Artikel über die Theorie des Systempeaks und dessen Vorkommen [179-184] verfasst. Das Auftreten eines Systempeaks ist von der Zusammensetzung des Puffers abhängig. Bei Puffern, die aus n ionischen Molekülen bestehen, treten in dem Elektropherogramm $n-1$ Systempeaks auf, wobei die EOF auch

dazu zählt. Deswegen ist es immer besser, einen Puffer zu wählen, der so einfach wie möglich ist, um nicht zuviele Systempeaks zu erzeugen. In diesem Versuch war dies nicht der Fall. Doch wenn die Systempeaks in Zonen ohne Analytpeaks auftreten, werden die Analytpeaks dadurch nicht gestört.

Abbildung 8.13 zeigt, dass die Peaks Isoleucin (3) und Leucin (4) getrennt wurden. Gemäss Literatur wurden diese zwei Aminosäuren, besonders unter alkalischen Bedingungen, normalerweise nicht getrennt [115,185,186]. Diese Separation könnte durch die verschiedenen Affinitäten der Aminosäuren mit der kationischen Mizelle (CTA⁺) entstanden sein.

8.7.5 Arzneimittel

Bei der letzten Anwendung wurden zwei Arzneimittel analysiert. Vicks MediNait® und Sanalepsi® N haben den gleichen Wirkstoff, Doxylamin. Vicks enthält daneben auch noch Ephedrin, Dextomethorphan und 4-Acetamidophenol (Paracetamol) und ist ein Sirup gegen Schnupfen und Erkältungen. Sanalepsi® N ist ein Beruhigungsmittel, Antihistaminikum und Antiallergikum.

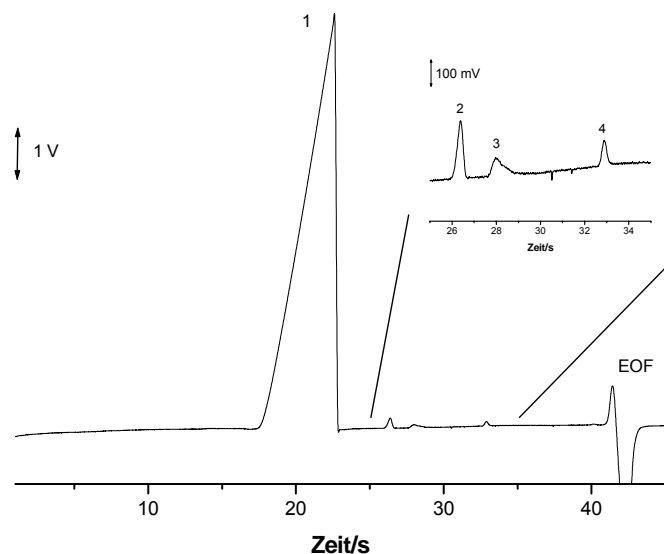


Abbildung 8.14: Elektropherogramm von Vicks MediNait® 1:10 mit Puffer verdünnt, das entspricht ca. Unbekannt mM Na^+ und 13 mM Paracetamol (1), 0.16 mM Ephedrin (2), 0.06 mM Doxylamin (3) und 0.13 mM Dextomethorphan (4). Trennpuffer: 20 mM Mes/His, pH 6.1. Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 15 cm. 25 μm i.d. Injektion: 7 s, 10 kV. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: Kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Die Arzneimittel beinhalten nicht nur Wirkstoffe sondern auch noch Farbstoffe, Konservierungsmittel, Süßmittel usw. Gemäss dem Vicks MediNait® Beipackzettel war die Konzentration von Paracetamol 100 Mal höher als die der anderen Wirkstoffe und als Konservierungsmittel wurde Natriumbenzoat benutzt. Zur Peakbestimmung wurde nach jeder Messung ein weiterer Wirkstoff dazugegeben. Der erste Peak kann Paracetamol und auch Na^+ sein. Mit kleineren Mengen diese zwei Substanzen wurden 2 Peaks gemessen. Der erste war bei 16.5 s (Paracetamol) und der zweite bei 20.5 s (Na_2). Bei grosser Konzentration von Na^+ wurde ein Peak ähnlich dem

von Peak 1 (Abb. 8.14) gemessen. Nach diesem Versuch konnte man sagen, dass Na^+ und Paracetamol wegen der grossen Konzentration nicht getrennt wurden.

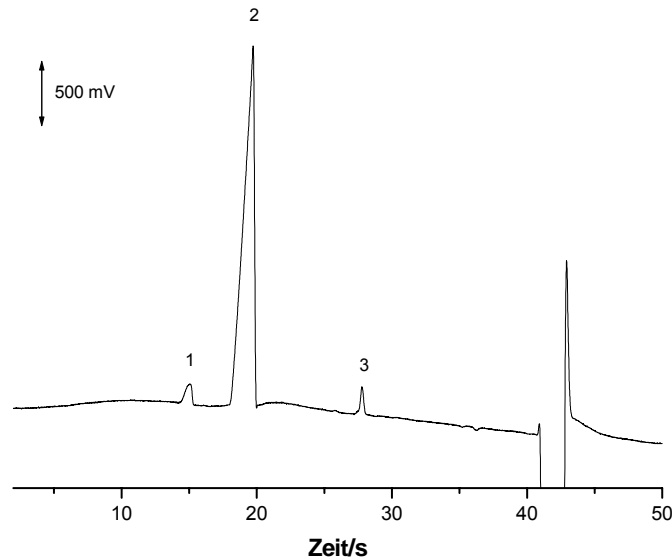


Abbildung 8.15: Elektropherogramm von Sanalepsi® 1:100 mit Puffer verdünnt, das entspricht Unbekannt (1), Unbekannt mM Na^+ (2) und 0.37 mM Doxylamin (3). Trennpuffer: 20 mM Mes/His, pH 6.1. Kapillarlänge 35 cm, bis zum Detektor 15 cm. 25 μm i.d. Injektion: 4 s, 10 kV. Trennungsspannung: 30 kV. Detektor: kontaktlose Leitfähigkeit. Frequenz 720 kHz, Amplitude 30 V. Flussrate der Pufferpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Flussrate der Analytpumpe: 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Bei Sanalepsi® N konnte der erste Peak nicht bestimmt werden. Gemäss Beipackzettel könnte es sich dabei um den Aromastoff Chininsulphat handeln.

8.8 Schlussfolgerung

Mit dem Einsatz des kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektors wurden prinzipiell der Einfluss des Kapillarinnendurchmessers und der Einfluss grösserer Feldstärken analysiert. Die kontaktlose Leitfähigkeit hat verschiedene Vorteile im Unterschied zu der UV-Detektion. Es ist ein universeller Detektor, d. h. verschiedene Ionenproben kann man direkt detektieren wie z. B. kleine Kationen. Die Herstellung ist einfacher und es bestehen nur elektronische Teile. Man verwendet keine Lampe, die während der Benutzung die Lichtintensität verliert und der Ersatz ist teuer. Man braucht kein optisches Fenster herzustellen, so kann man einfach die Zelle entlang der Kapillare bewegen, um die Trennung zu optimieren. Es ist möglich verschiedene Kapillarinnendurchmesser von 10 μm bis 100 μm oder grösser zu benutzen. Eine spezielle Herausforderung war die Messung der Kohlenhydrate. In sehr stark alkalischem Milieu liegen die Kohlenhydrate als Anionen vor, so kann man die Leitfähigkeit, ohne zu derivatisieren, direkt detektieren. Zu diesem Zweck wurde eine Kapillare von 15 μm Innendurchmesser benutzt, weil der Puffer, unter diesen Bedingungen, sehr stark leitet und viel Joule-Wärme erzeugt. Nach unserem Wissen wurden Kohlenhydrate und Aminosäuren zum ersten Mal gleichzeitig getrennt.

9 Schlussfolgerungen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Automatisierung der Injektionssysteme des Fliessinjektionsanalyseystems im Mikromassstab (μ FIA) betrachtet. Dank des geringen Reagenzverbrauchs und der Computersteuerung könnten mehr als 500 Injektionen ohne eigene Handhabung und Spritzenfüllung durchgeführt werden. Zusätzlich wird mit der Automation auch die Reproduzierbarkeit verbessert. Dank des Seitenkanals konnte man auch eine zweistufige Reaktion verwenden, wie bei der Nitritbestimmung oder es wurde als Hilfe der Reaktion durch zusätzliche Durchmischung verwendet. Mit einigen Änderungen könnte man das μ FIA-System mit Batterien betreiben und somit für die Vor-Ort Messung benutzen.

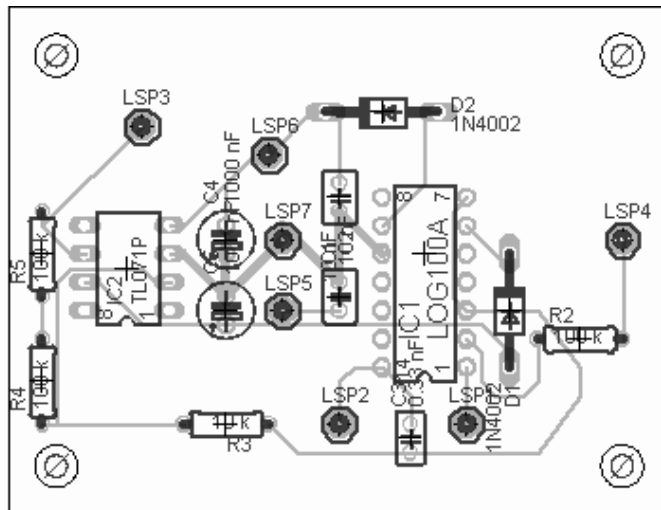
Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein tragbares CE-Gerät mit einer einfachen Absorptionszelle getestet. Schon nach den ersten Messungen wurde klar, dass das alte tragbare CE-Gerät, wegen Funkenentwicklung zwischen der Elektrode und der Gerätewand, nicht mehr einsetzbar war. Es wurde also ein neues tragbares CE-Gerät gebaut. Das neue Gerät wurde für alle CE Anwendungen und Entwicklungen in dieser Arbeit verwendet und in verschiedenen Kopien für unsere Gruppe oder für andere Gruppen hergestellt. Die einfache Detektionszelle ist für $75\ \mu\text{m}$ Kapillarinendurchmesser nicht geeignet. Der optische Detektor basiert auf Leuchtdiode, einfacher optischer Zelle, optischer Faser und Photodiode, die beim μ FIA-System gut funktioniert, aber bei den CE nicht geeignet ist. Auch mit der Verwendung von intensiver Lichtquelle und einem empfindlichen Detektor war die Eigenschaft nicht genügend für eine normale Anwendung. Über die neue batteriebetriebene Deuteriumlampe kann man nicht viel aussagen, weil die Zelle nicht geeignet war. Mit einer neuen Zelle mit fokussierten Elementen und Fasern und mit einem grösseren Kern könnte man die Deuteriumlampe besser testen.

Der dritte Teil dieser Arbeit basierte auf einer billigen und flexibleren Alternative zu dem elektrophoretischen Chip mit der Benutzung von konventionellen

kurzen Kapillaren. Die schnelle Trennung mit einer kurzen Kapillare hat eine vergleichbare Leistung, im Sinn von Analysenzeit zur Bodenzahl, zu den elektrophoretischen Chips. Der Vorteil der höheren Flexibilität des Kapillarsystems trägt auch zur Kosteneinsparung bei. Der elektrophoretische Chip hat eine fixe Trennstrecke, welche ein wichtiger Parameter ist, um das Optimum in Analysenzeit und Auflösung zu erreichen. In unserem System kann die Länge ab 4 cm beliebig gewählt werden, ohne geometrische Begrenzungen wie im Fall kommerzieller Geräte. Mit der kontaktlosen Leitfähigkeit kann man den Detektor einfach positionieren und entlang der Kapillare bewegen, weil man die Polyimidschutzschicht nicht, wie bei der UV- und Fluoreszenz-Detektion üblich, wegbrennen muss, um die optischen Fenster herzustellen. Mit dem Kapillarsystem kann man die Distanz der Elektrode optimieren, was für Chips nicht möglich ist, um bessere Empfindlichkeit zu erreichen.

10 Anhang

10.1 Layout der Platine für den LOG 100 mit Photodiode inklusive Liste der elektronischen Komponenten



Lötstützpunkte:

- LSP1: Eingang Strom Referenzsignal (von der Photodiode)
- LSP2: Eingang Strom Analytssignal (von der Photodiode)
- LSP3: Analoger Ausgang (→ AD-Wandler)
- LSP4: Offset (von 10 k Poti)
- LSP5: + 15 V
- LSP6: - 15V
- LSP7: GRD

Kondensatoren:

- C1: 10 nF TYP MKS 02
- C2: 10 nF TYP MKS 02

C3: 0.33 nF (Keramik Plättchenkondensator)

C4: 1 μ F TYP MS7 6.3 V

C5: 1 μ F TYP MS7 6.3 V

Widerstände:

R2: 100 k Ω (Metallfilm)

R3: 10 k Ω (Präzisionswiderstand. (schwarz))

R4: 100 k Ω (Präzisionswiderstand. (schwarz))

R5: 100 k Ω (Präzisionswiderstand. (schwarz))

Diode:

D1: 1N4002

D2: 1N4002

IC-Baustein:

LOG100

TL071CP

10.2 FORTH-Programm für FIA

\ FORTH PROGRAMM ZUR STEUERUNG EINES MICROFIA-ABLAUFS

```
\ -----  
\  
\ „INCLUDE FILENAME“ musste nur beim ersten Aufruf in FORTH eingegeben  
\ werden,  
\ solange dasselbe Programm ohne Veränderung benutzt wird.  
\ ACHTUNG, dass FILENAME im WORD inc mit dem Filenamen übereinstimmt !  
\  
: inc INCLUDE FE;  
\  
\ -----  
\ Konstanten-Zuordnung zu den einzelnen Komponenten  
\ -----
```

```

\
: mpon 26 888 PC! ; \ Membranpumpe on + V2 und V3 offen
: mpoff 24 888 PC! ; \ Membranpumpe off + V2 und V3 offen

: spon 37 888 PC! ; \ Spritzenpumpe on + V1 und V4 offen
: alloff 0 888 PC! ; \ Alle Komponenten off
\
\-----
\
: lloop 100000 0 DO NOOP LOOP ; \ 1 Hertz Frequenz
\ Umschaltung Membranpumpe 1 Hertz (6 Loop = 1.09 sec)
: MP 6 0 DO mpon 1000 lloop mpoff 1000 lloop mpoff LOOP mpoff ;
\
\-----
\
: 30 CONSTANT DELAY \ Verzögerung der Pumpen zu den Ventilen
\ Ventile werden früher geöffnet, um Überdruck zu vermeiden
: wait SWAP BEEP ; \ beep

\-----
\
\ Vor dem Start werden alle Werte auf 0 gesetzt, um definierte Ausgangsbedingungen
\ zu haben

\
: reset 110 alloff wait ; \ Alle off
: spuel 440 spon wait ; \ Spritzenpumpe + V1 und V4 on
: inject 880 MP ; \ Umschaltung Membranpumpe + V2 und V3 on
\
\-----
\
\ Start des Ablaufs und Anzeige der einzelnen Zeiten

\-----
\
: run          CR
\ Comment      time function (100 = 1 sec)
. " Start      : ,, .T CR      100 reset
. " Spuelen1   : ,, .T CR      500 spuel
. " Injection  : ,, .T CR      100 inject \ Zeitwert gleichgültig
. " Spuelen2   : ,, .T CR      500 spuel \ Der Analyt wird zum Detektor transportiert
. " Reset      : ,, .T CR      100 reset

```

.“ Ende :,, .T CR

;

\-----

Jeder Bit entsprach einem bestimmten Ventil oder Pumpe (s. Tabelle 3.1), der dazugehörige dezimale Wert war durch 2^{bit} gegeben. Z.B.: SP1 an, V1 und V4 offen (alle andere ausgeschaltet), $2^0+2^2+2^5= 1+4+32=37$. Für SP1 eingeschaltet und V1 und V4 geöffnet wurde der Befehl 37 888 PC! (888 PC! Ist durch parallele Port). Für alle ausgeschaltet wurde der Befehl 0 888 PC! gegeben. Zur Magnetpumpe wurde zusätzlich ein Loop geschrieben, um die Pumpe mit einer Frequenz von 1 Hertz umzuschalten.

10.3 Belegung des Detektorteils und des Steuerteils für das tragbare Kapillarelektrophoresegerät

10.3.1 Steuerteil

Komponenten

As	Stecker für 24 V, extern
Bs	Schalter HV ein/aus
Cs	LED (HLMP-D 150) HV ein
Ds	Sicherungs-Schalter Gehäuse
Es	Potentiometer 10 k Ω
Fs	LED (HLMP-D 150) positive Polarität
Gs	LED (HLMP-D 150) negative Polarität
Hs	Schalter positive/negative Polarität
Is	LM78L05
Js	LCD- Display Strom
Ks	Trimmer 10 k Ω (5.4 k Ω)
Ls	Trimmer 1 k Ω (529 Ω)
Ms	LCD-Display Spannung

Ns	Spellman CZE2000 Input Connector
Os	4 mm Bananenbuchse grün für GND
Ps	Platine
Qs	Erdungschreibe Spellman CZE2000

Belegung As (Stecker für 24 V ext.)

- 1 → Batterie Plus
→ Bs 2
- 2 → Batterie Minus
- 3 → Os GND

Belegung Bs (Schalter HV ein/aus)

- 1 → 18 k Ω → Cs A → Cs K → GND
→ Ds ON
- 2 (Mitte) → As 1
- 3 → Leer

Belegung Cs (LED HV ein)

- A → 18 k Ω → Bs 1
- K → Fs K → Gs K
→ Ps GND → Os GND

Belegung Ds (Sicherungs-Schalter Gehäuse)

- 1 (COM) → Ns 14
→ Ns 15
→ Is Input

- 2 → Leer
- 3(Schalter)
- 4 (ON) → Bs 1

Belegung Es (Potentiometer 10 k Ω)

- 1 (CCW) → Os GND
- 2 (S) → Ns 8
- 3 (CW) → Ns 10

Belegung Fs (LED positiver Polarität)

- A → 18 k Ω → Ns 13
- K (GND) → Gs K
→ Cs K

Belegung Gs (LED negativer Polarität)

- A → 18 k Ω → Ns 17
- K (GND) → Fs K

Belegung Hs (Schalter positiver/negativer Polarität)

- 1 → Is Output 5 V
- 2 (Mitte) → Ns 12
- 3 → GND

Belegung Is (LM78L05)

- Output 5V → Hs 1

- Ms VDD
- Js VDD
- Ns 4
- Ps
- GND → Ms GD → Ms INLO → Ps GND → Os GND
- Input → Ds COM

Belegung Js (LCD-Display Strom)

- A → Js XBP
- μ → Js XBP
- INHI → Ks 2
- INLO → Js GD → Ps GND → Os GND
- XBP → Js A
→ Js μ
- VDD → Is Output
- GD → Js INLO
→ Is GND

Belegung Ks (Trimmer 10 k Ω (5.4 k Ω))

- 1 → Ps GND → Os GND
- 2 → Js INHI
- 3 → 150 k Ω → Ns 6

Belegung Ls (Trimmer 1 k Ω (520 Ω))

- 1 → Ps GND → Os GND
- 2 → Ms INHI

- 3 → 150 k Ω → Ns 5

Belegung Ms (LCD-Display Spannung)

- INHI → Ls 2
- INLO → Ms GD
→ Ps GND → Os GND
- XBP → Ms D3
- D3 → Ms XBP
- VDD → Is Output
- Gd → Ms INLO
→ Is GND

Belegung Ns (DB25 weiblich = Spellman CZE2000 Input Connector)

- 1 → Os GND
→ Ns 2
→ Ns 3
- 2 → Ns 1
→ Ns 3
- 3 → Ns 1
→ Ns 2
→ Os GND
- 4 → Is Output
→ Ns 9
- 5 → 150 k Ω → Ls 3
- 6 → 150 k Ω → Ks 3
- 7 → Os GND
- 8 → Es 2 (S)

- 9 → Ns 4
- 10 → Es 3 (CW)
- 11 → Ns 16
- 12 → Hs 2 (Mitte)
- 13 → 18 k Ω → Fs A → Fs K → Ps GND → Os GND
- 14 → Ds 1 (COM)
- 15 → Ds 1 (COM)
- 16 → Ns 11
→ Ns 21
- 17 → 18 k Ω → Gs A → Gs K → Ps GND → Os GND
- 21 → Ns 16
→ Os GND

Os (Bananenbuchse 5mm GND)

- 1 → Cd 10 (Detektionsteil)
→ As 3
→ Es 1
→ Ns 1
→ Ns 3
→ Ns 7
→ Ns 21
→ Ps (GND)
→ Qs

Ps (GND Platine)

- 1 → Os
→ Js INLO

- Ms INLO
- Ks 1
- Ls 1
- Cs K → Fs K → Gs K
- Is GND

Os Erdungsschraube Spellman CZE2000

- 1 → Erdelektrode
 - Os
 - Käfig Detektionsteil

10.3.2 Detektionsteil

Komponenten

- Ad Hauptschalter
- Bd LED
- Cd TRACO DC/DC-Konverter 24 V → 15 V
- Dd Potentiometer 10 k Ω
- Ed Trimmer 1k Ω
- Fd 2 Stück Bananenbuchsen 2 mm
- Gd LED Lichtquelle
- Hd ACD-16 von Pico Analog-Digital-Wandler
- Id LOG 100
- Jd Buchse LEMO 00
- Kd DB9 weiblich (9 Pin Buchse)

Belegung Ad (Hauptschalter)

- 1: → 24 V extern
- 2: → 18 k Ω → Bd K → Ba A → GND
→ Cd 1
- 3: → Leer

Belegung Bd (LED)

- A → 18 k Ω → Ad 2
- K (GND) → Cd 10
→ Gd K

Belegung Cd (TRACO DC/DC-Konverter 24 V→15 V)

- 1 (+V IN) → Ad 2
- 2 (-V OUT) → Dd 2
- 3 → Leer
- 10 (GND) → Hd 18
→ Jd 2
→ Id Gehäuse
→ Id
→ Gehäuse Detektionsteil
→ Od Steuerungsteil
→ Bd K
- 11 (+V OUT) → Dd 2

- Ed 2
- Id
- 12 → Leer

Belegung Dd (Potentiometer 10 k Ω)

- 1 → Id Offset
- 2 → Cd 11
- 3 → Cd 2

Belegung Ed (Trimmer 1k Ω)

- 1 → Fd 1
- 2 → Cd 11
- 3 → Leer

Belegung Fd (2 Stück Bananenbuchsen 2mm)

- 1 → Fd 2
- Ed 1
- 2 → Fd 1
- Gd A

Belegung Gd (LED Lichtquelle)

- A (Anode) → Fd 2
- K (Kathode) → Bd K

Belegung Hd (ADC 16)

- 5 → Hd 18
- 6 → Id
→ 10 k Ω → Hd 19
- 7 → Hd 19
- 18 → Cd 10
- 19 → Hd 7
→ 10 k Ω → Hd 6

Belegung Id (LOG 100)

(s. Anhang 10.1)

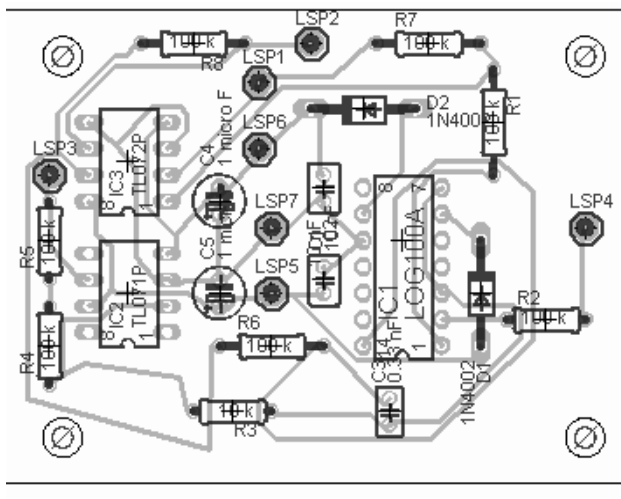
Belegung Jd (Buchse LEMO 00)

- Zentrum → Hd 6
- Ausser → Cd 10

Belegung Kd (DB9 weiblich = 9 Pin Buchse)

- Pin 1 → Pin 1 Ausgang ADC 16
- Pin 4 → Pin 3 Ausgang ADC 16
- Pin 7 → Pin 7 Ausgang ADC 16
- Pin 9 → Pin 2 Ausgang ADC 16

***10.4 Layout der Platine für den LOG 100 mit Photomultierröhre
inklusive Liste der elektronischen Komponenten***



Lötstützpunkte:

- LSP1: Eingang Strom Referenzsignal (vom Photomultiplier)
- LSP2: Eingang Strom Analytsignal (vom Photomultiplier)
- LSP3: Analoger Ausgang (→ AD-Wandler)
- LSP4: Offset (von 10 k Poti)
- LSP5: + 15 V

LSP6: - 15V

LSP7: GRD

Kondensatoren:

C1: 10 nF TYP MKS 02

C2: 10 nF TYP MKS 02

C3: 0.33 nF (Keramik Plättchenkondensatoren)

C4: 1 μ F TYP MS7 35 V

C5: 1 μ F TYP MS7 35 V

Widerstände:

R1: 100 k Ω (Präzisionw. (schwarz))

R2: 100 k Ω (Metallfilm)

R3: 10 k Ω (Präzisionswiderstand (schwarz))

R4: 100 k Ω (Präzisionswiderstand (schwarz))

R5: 100 k Ω (Präzisionswiderstand (schwarz))

R6: 100 k Ω (Präzisionswiderstand (schwarz))

R7: 100 k Ω (Präzisionswiderstand (schwarz))

R8: 100 k Ω (Präzisionswiderstand (schwarz))

Diode:

D1: 1N4002

D2: 1N4002

IC- Baustein:

LOG100

TL071CP

TL072ACP

10.5 Änderung des Interface und Belegung des SCSI-Steckers

Die SCSI 2 Stecker Karte von National Instruments wurde mit der Parallele Port der FIA Interface gemäss der folgenden Tabelle angeschlossen:

Bit	LabVIEW Port	SCSI 2 Pin	Parallele Port FIA Interface (DB 25)	Beschriftung (wie bei FIA)	Anschlüsse Interface Frontplatte
0	DIO0	52	2	SP1	Spritzpumpe
1	DIO1	17	3	MP	Trigger
2	DIO2	49	4	V1	Ventil
3	DIO3	47	5	V2	ev. Ventil
4	DIO4	19	6	V3	ev. Ventil
5	DIO5	51	7	V4	ev. Ventil
6	DIO6	16	8	V5	ev. HV Ein/Aus
7	DIO7	48	9	SP2	Spritzpumpe
Erde	DGND	15	25		

Trigger:

Zum automatischen Beginn der Aufnahme des Elektropherogramms muss sich der Membranpumpen (MP) Ausgang der FIA- Interface ändern. Das 12 V Signal muss man zum TTL-Signal ändern. Das 12 V Kabel wurde von der roten Buchse der MP ausgelötet und der IC Puffer Pin 16 wurde angeschlossen. Die schwarze Buchse der MP wurde mit der Erde (5V) angeschlossen.

HV ein/aus:

Zum Ein- und Ausschalten des Hochspannungsgerätes muss der V5 Ausgang wie bei dem Trigger in ein TTL Signal modifiziert werden. Aber in diesem Fall war es besser den Puffer und den Hochspannungsstecker zu trennen wegen eines möglichen Kurzschlusses. Der Kurzschluss hätte durch Kontakt eines aus dem

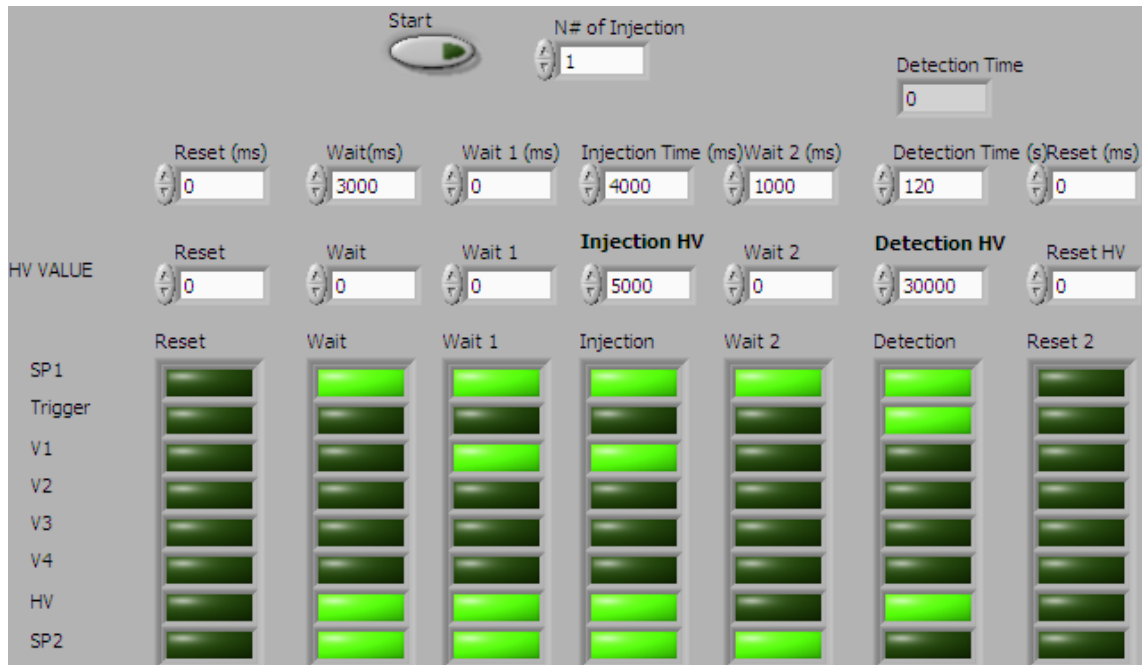
Hochspannungsstecker ausgelösten Drahtes mit einem anderen Pin des Hochspannungssteckers. Anstatt des Schaltkreises für Ventile, wurde bei V5 der Schaltkreis wie bei der Spritzenpumpe umgebaut, und zwar mit zwei Optokopplern. Der blaue Draht wurde mit dem Pin 5 des Puffers, der gelbe mit der schwarzen Buchse (V5) und der orange mit der roten Buchse (V5) angeschlossen. Zusätzlich wurde die schwarze Buchse mit der Erde (5V) verbunden. Die rote Buchse V5 wurde mit dem Pin 4 und die schwarze mit dem Pin 1 des Hochspannungssteckers (Ns Spannungsteil) mit zwei Kabeln angeschlossen.

Den Strom direkt steuern:

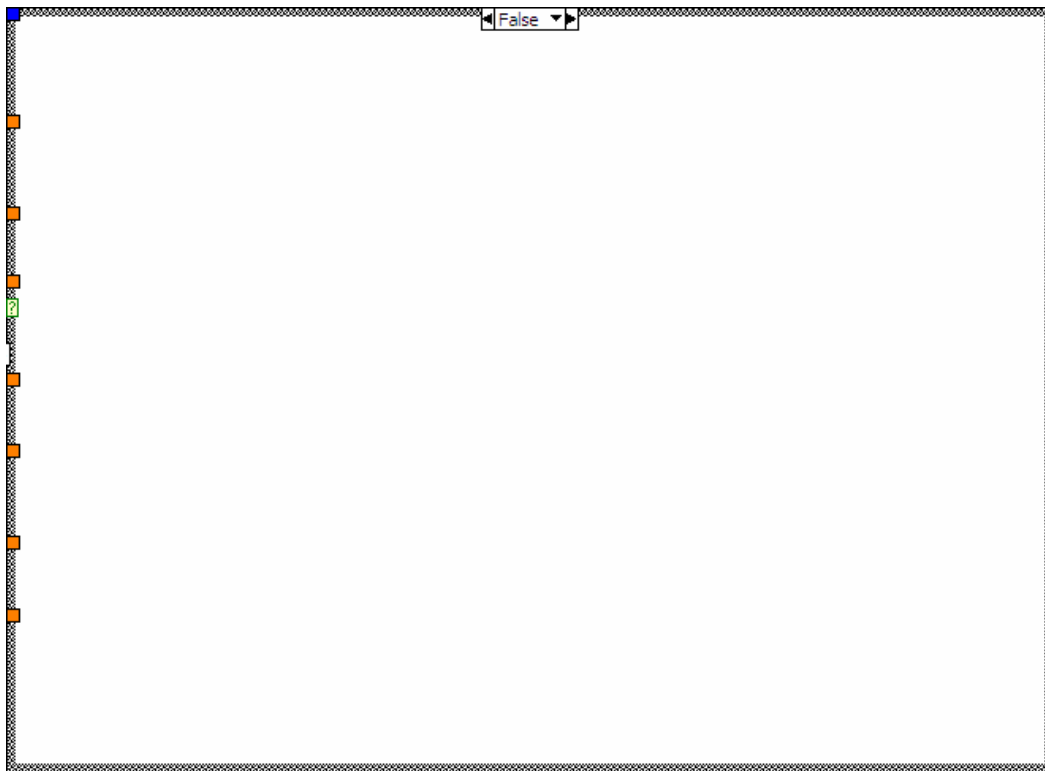
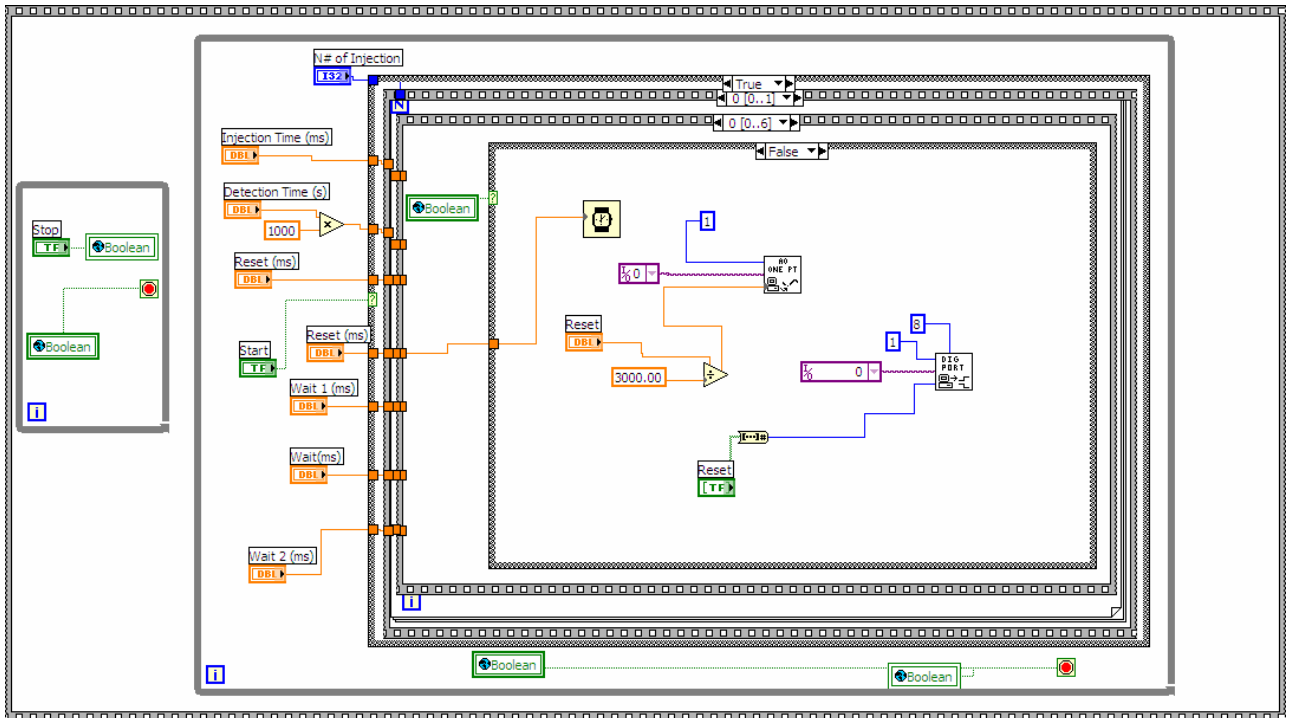
Mit der Steuerung der verschiedenen Hochspannungen während den verschiedenen Schritten der Analyse wurde das Ein- und Ausschalten der Hochspannung unnötig, weil ein Befehl von 0V gleich einer Ausschaltung ist. Die Verbindung zwischen Potentiometer (Es Spannungsteil) und Pin 8 des Hochspannungssteckers (Ns Spannungsteil) wurde getrennt und mit einer 2mm Bananenbuchse wurden der Pin 8 des Hochspannungssteckers (Ns) und der Pin 22 des SCSI 2 Steckers (LabVIEW: DAC0OUT) verbunden. Der Pin 55 des SCSI 2 Stecker (LabVIEW: A0GND) wurde mit dem Pin 1 des Hochspannungssteckers (Ns) verbunden.

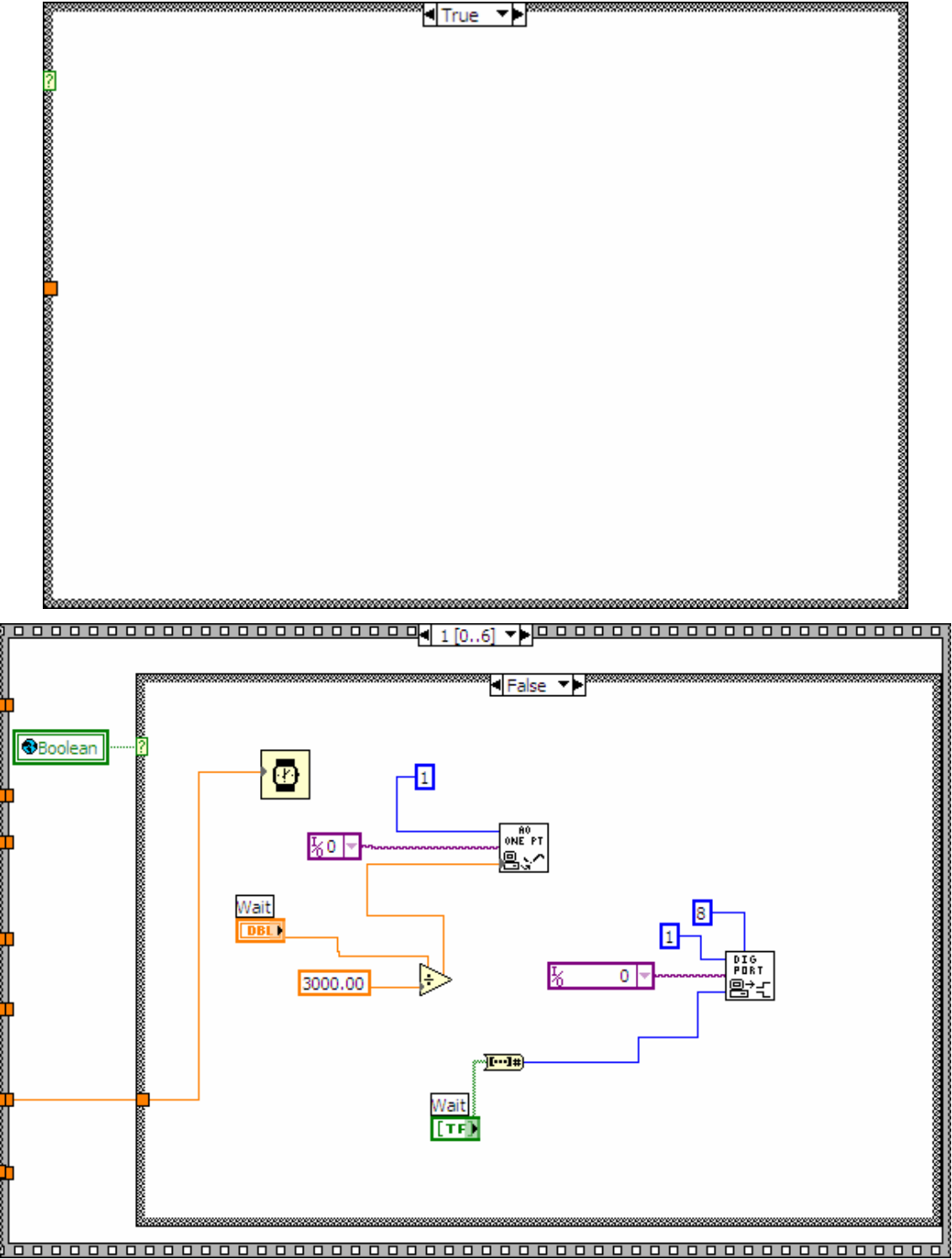
10.6 LabVIEW-Programm für den automatischen Injektor

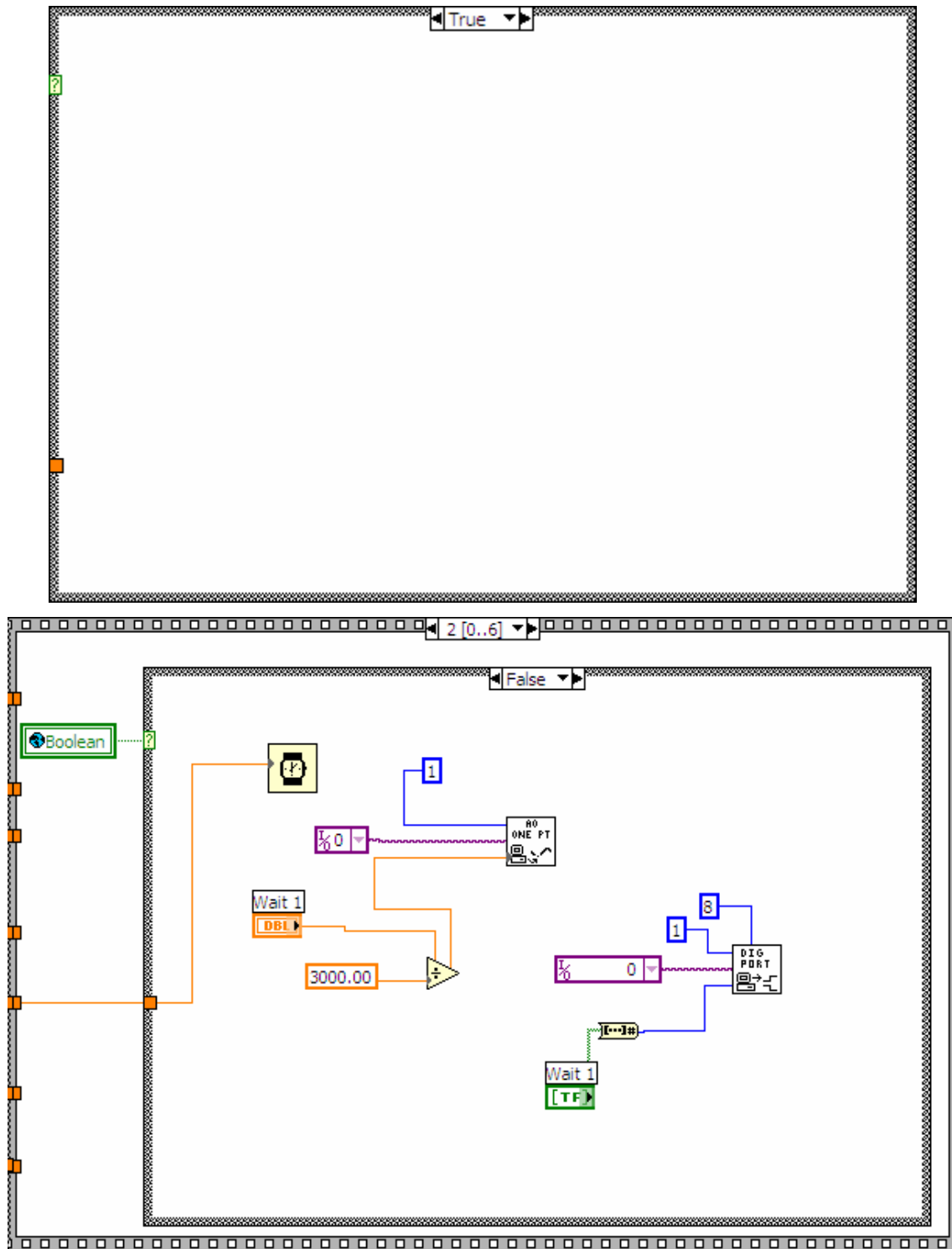
Front Panel

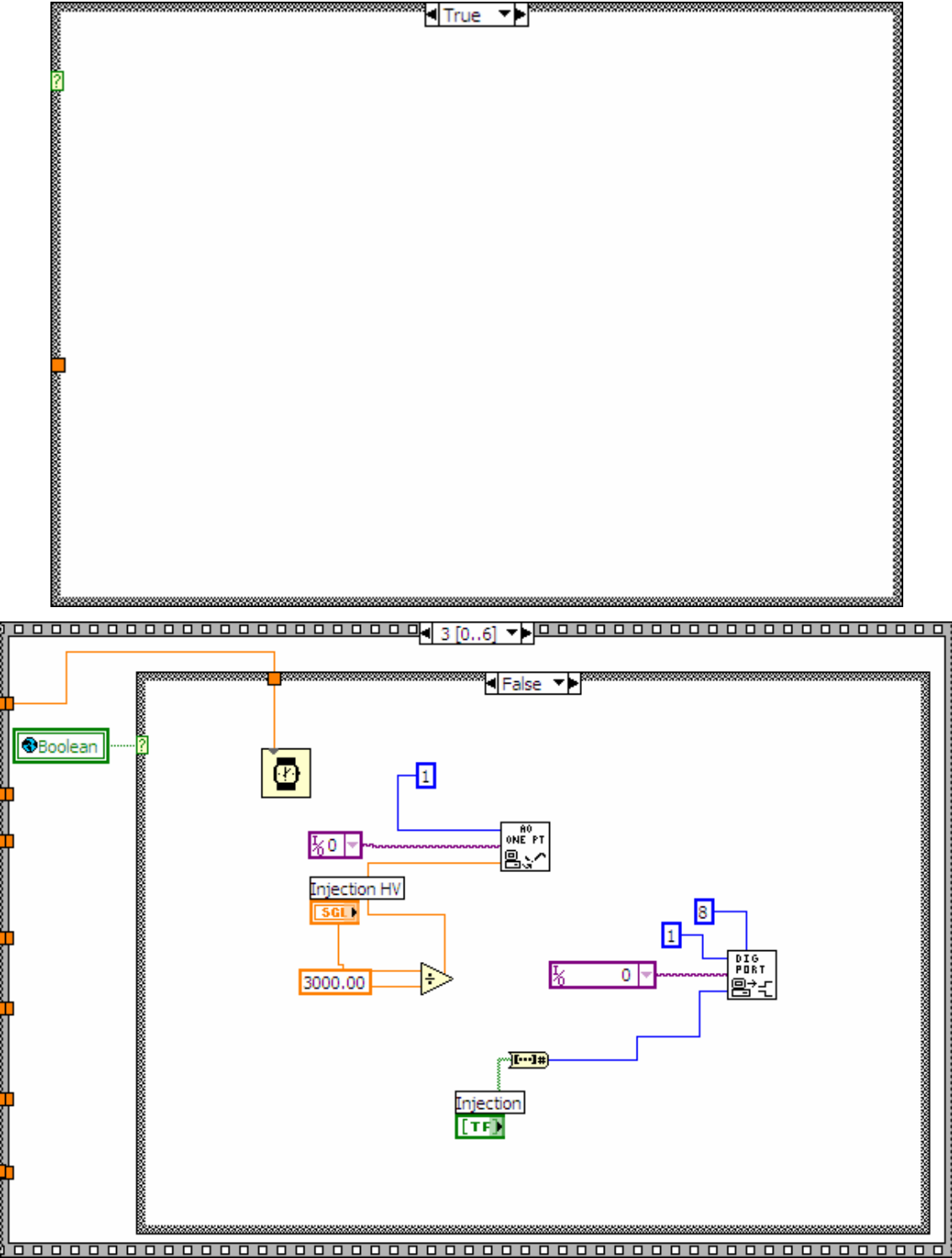


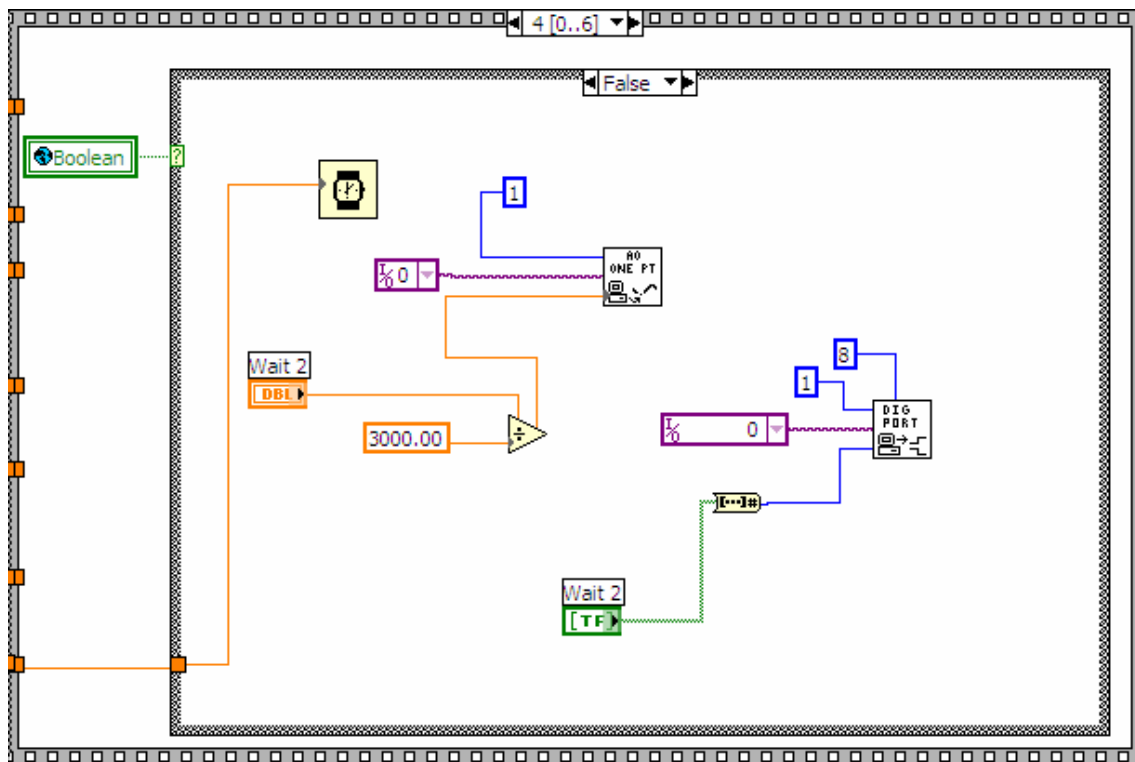
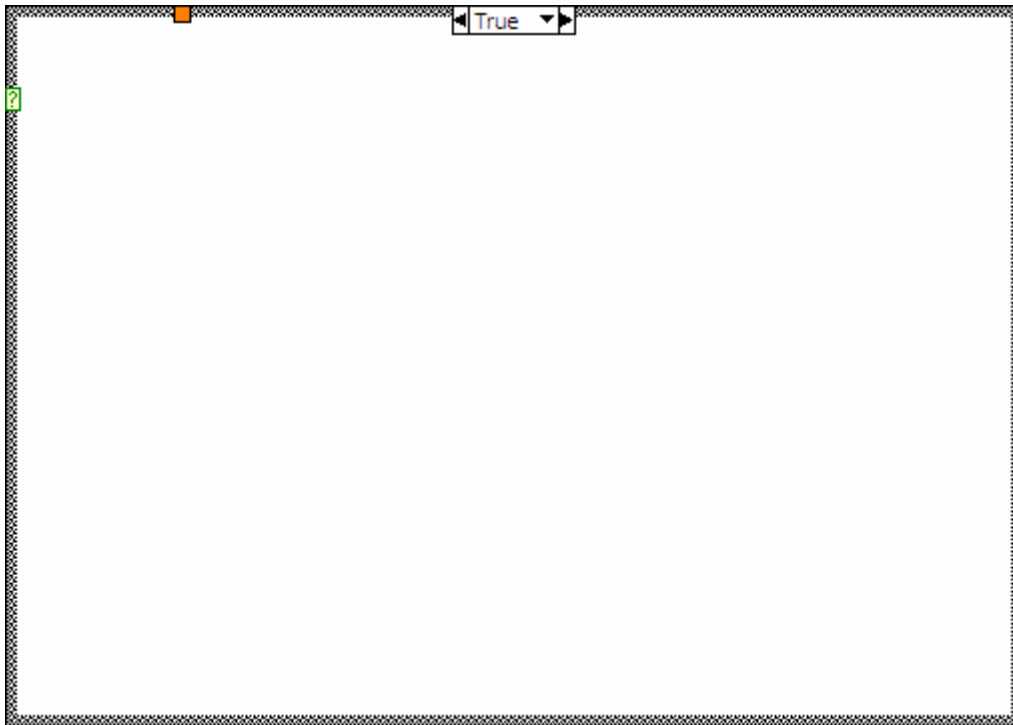
Block Diagram

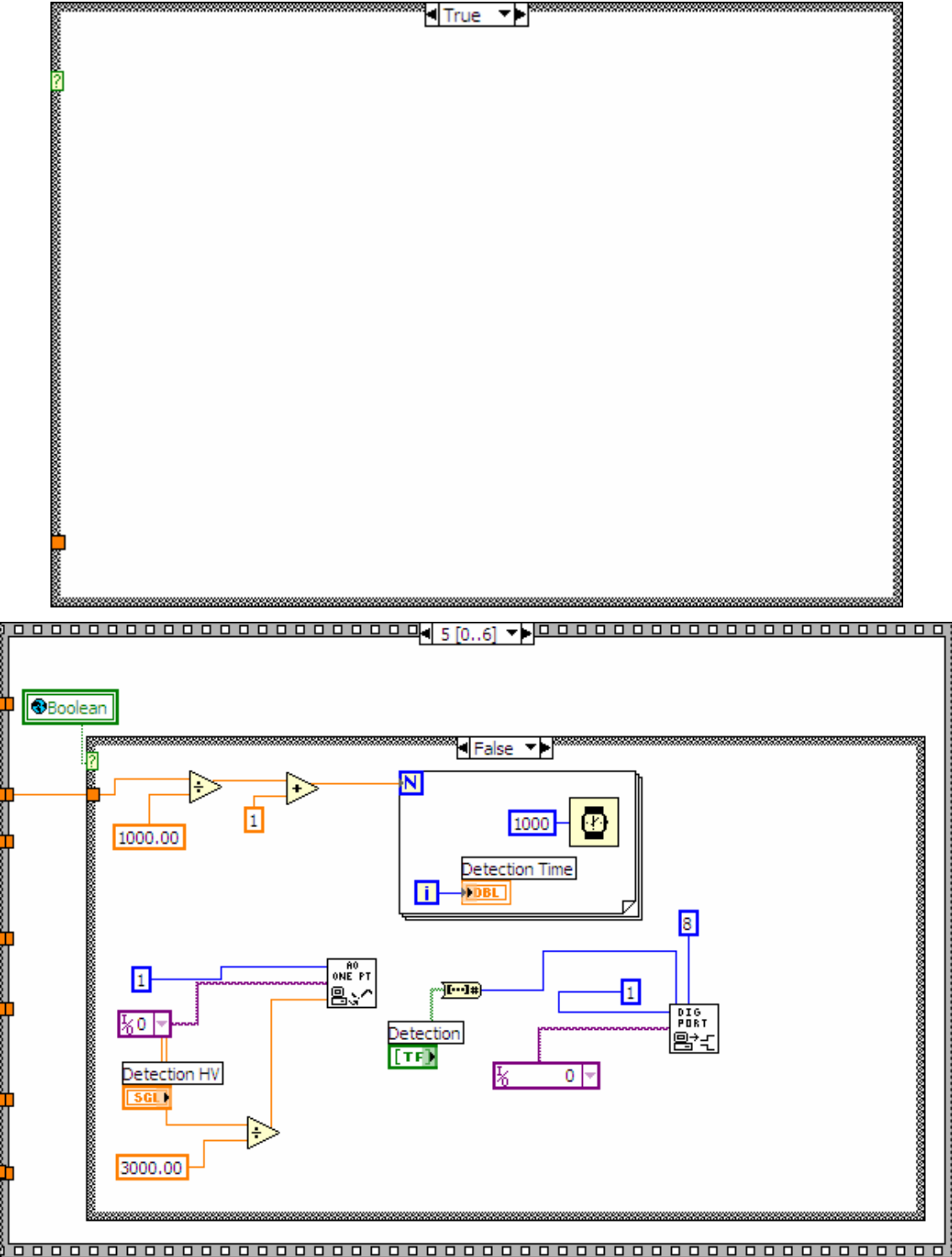


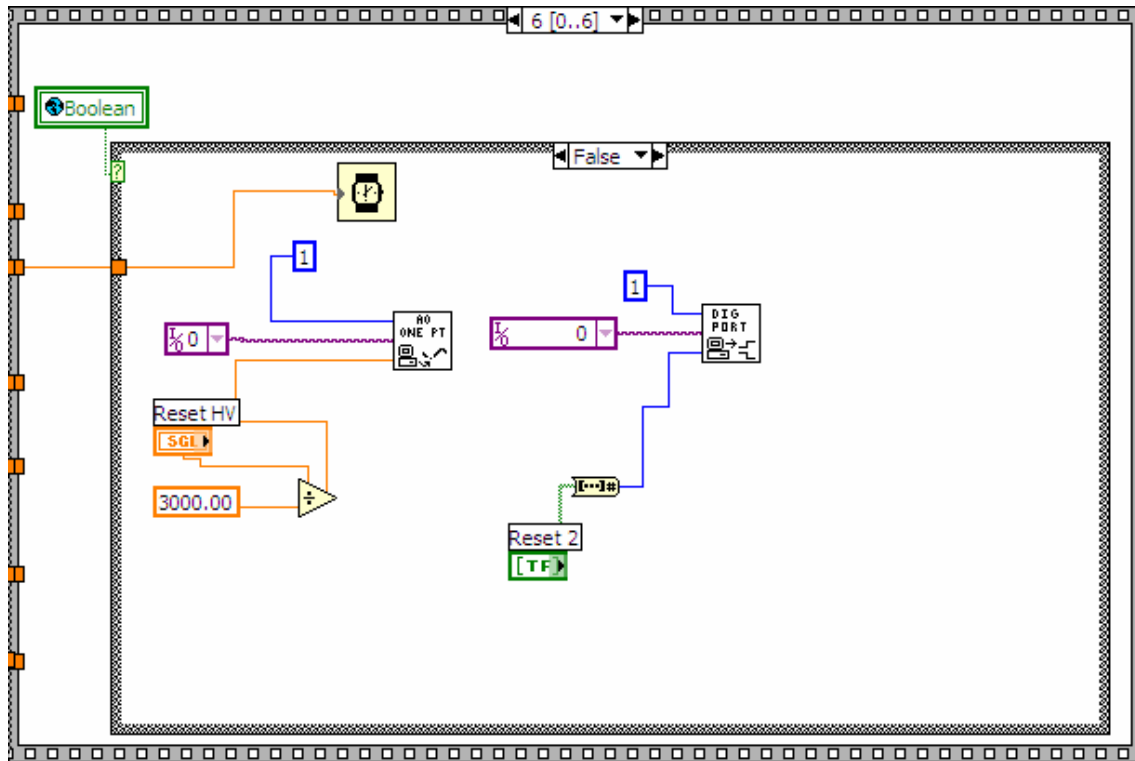
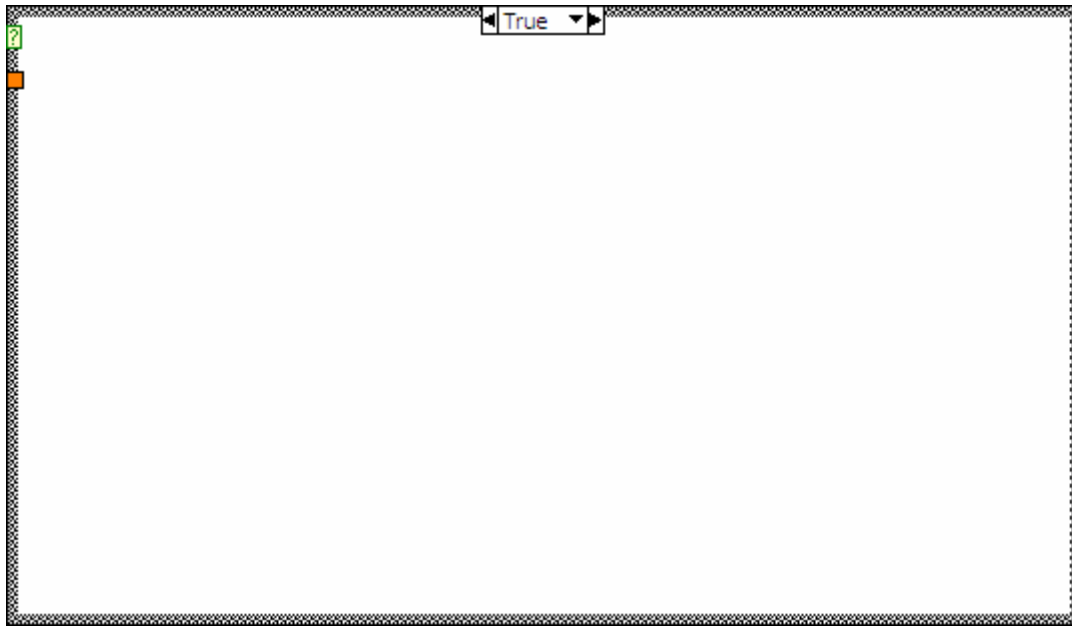


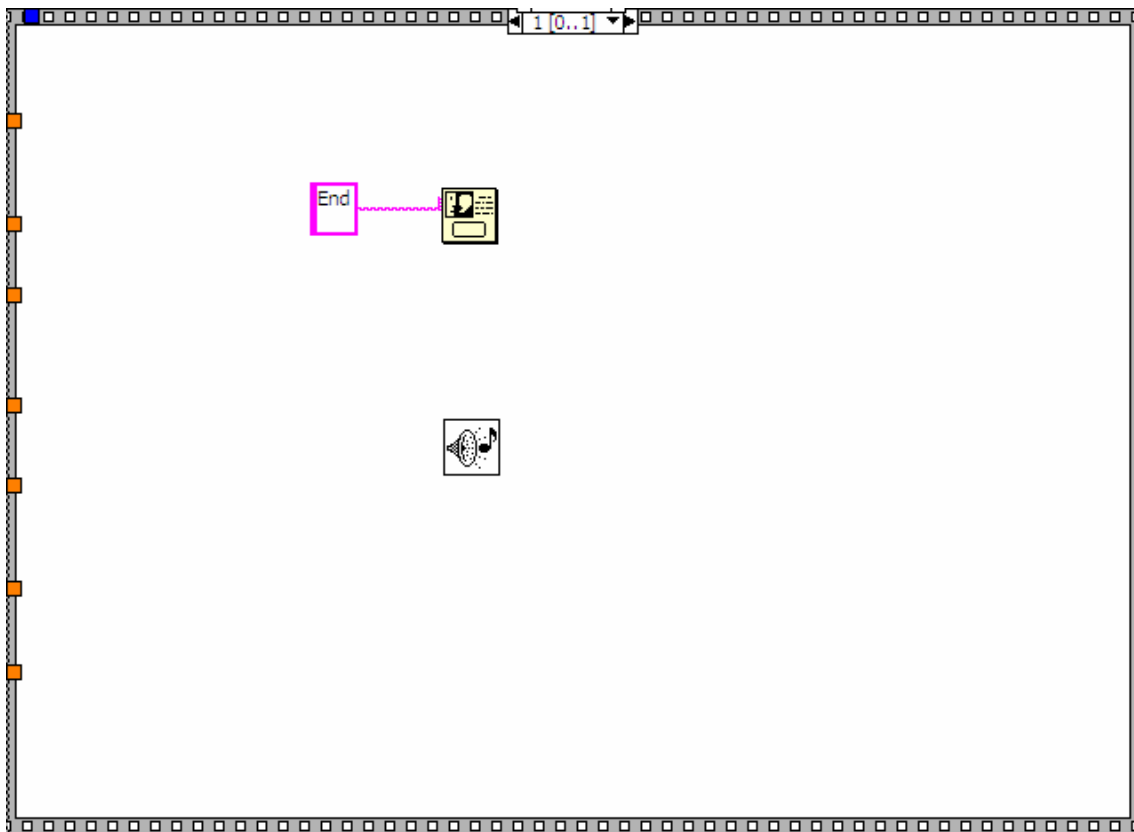
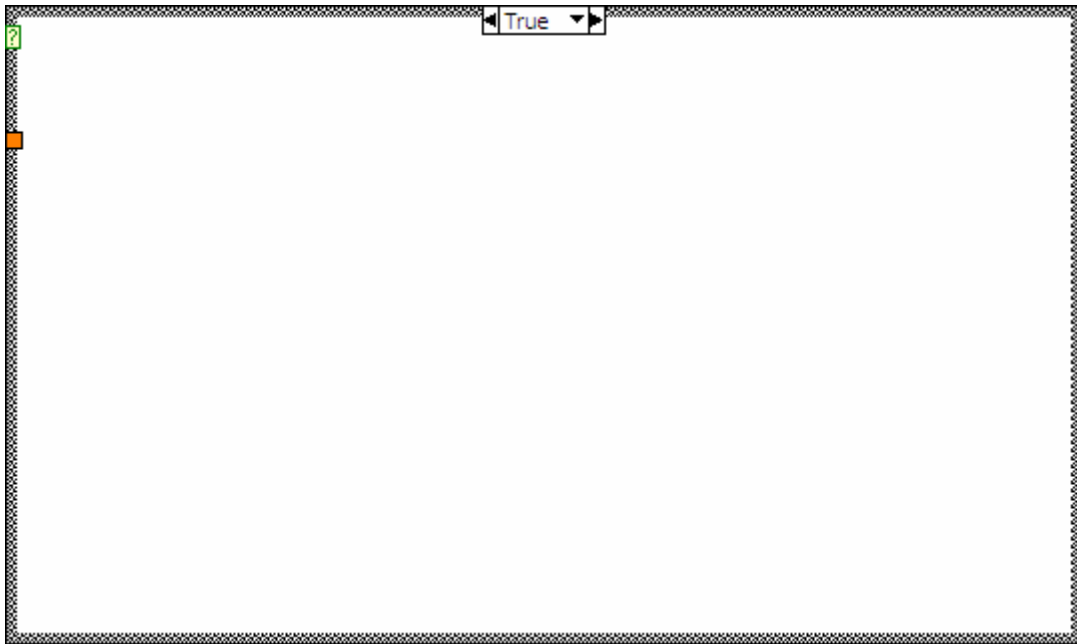




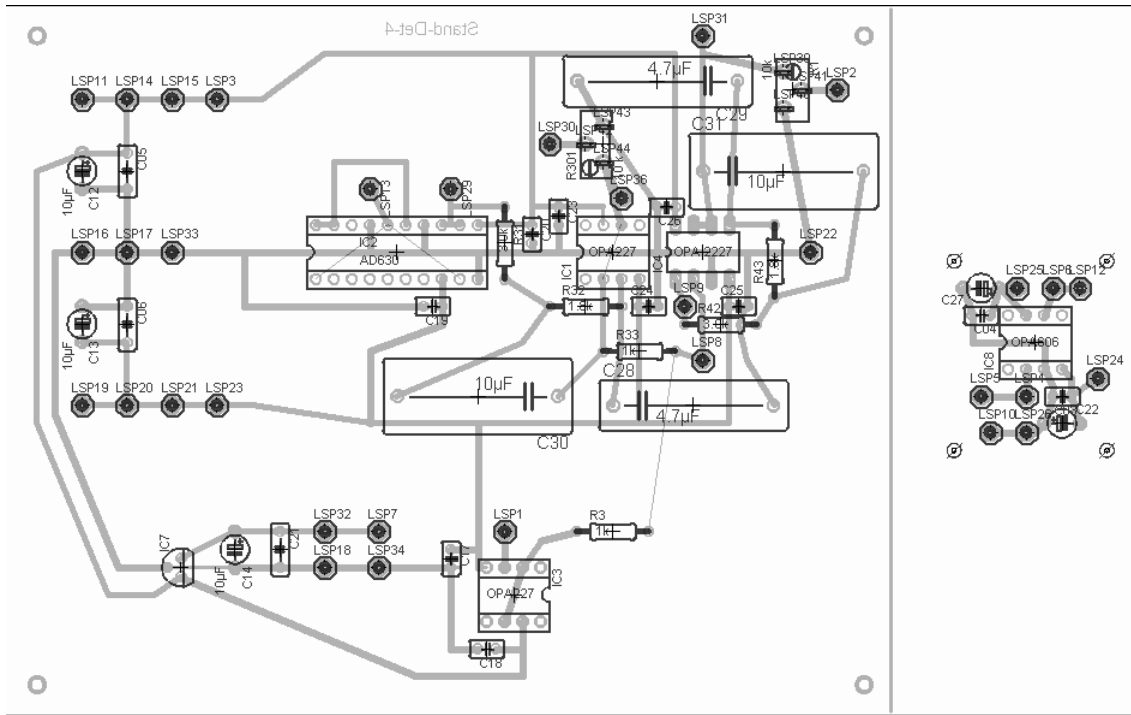








10.7 Layout der Platine für den Leitfähigkeitsdetektor inklusive Liste der elektronischen Komponenten



Platine Leitfähigkeitsdetektor

Lötstützpunkte:

- LSP1: → Potentiometer (Mitte)
- LSP2: → OM33-2
- LSP3: ext. + 15 V
- LSP4: Ausgang Signal Zelle (LEMO)
- LSP5: → Rückwiderstand 1 M Ω Zelle → LSP 6
- LSP6: → Rückwiderstand 1 M Ω Zelle → LSP 5
- LSP7: → OM33-1 (5+)
- LSP8: → Rückwiderstand 1 M Ω OPA2227 → LSP 9

LSP9:	→ Rückwiderstand 1 M Ω OPA2227→ LSP 8
LSP10:	Ausgang GND Zelle (LEMO)
LSP11:	→ev. Frequenzgenerator V+
LSP12:	→LSP 13
LSP13:	→LSP12
LSP14:	→ Potentiometer (V+)
LSP15:	→LSP 25 V+
LSP16:	→ev. Frequenz Generator GND
LSP17:	→LSP26 GND
LSP18:	→OM33-1 (GND)
LSP19:	→ev. Frequenz Generator V-
LSP20:	→ Potentiometer (V-)
LSP21:	→LSP 24 V-
LSP22:	Ausgang GND OUTPUT (LEMO)
LSP23:	ext. - 15V
LSP24:	→LSP 21 V-
LSP25:	→LSP 15 V+
LSP26:	→LSP 17 GND
LSP29:	Kontrollpunkte nach AD630
LSP30:	→OM33-1
LSP31:	Ausgangsignal OUTPUT (LEMO)
LSP32:	→OM33-2 (5+)
LSP33:	ext. GRD
LSP34:	→OM33-2 (GND)
LSP36:	Kontrollpunkte nach OPA227

Kondensatoren:

C3:	10 μ F Tantal
C4:	100 μ F Folien

C5:	100 μ F Folien
C6:	100 μ F Folien
C12:	10 μ F Tantal
C13:	10 μ F Tantal
C14:	10 μ F Tantal
C17:	100 μ F Folien
C18:	100 μ F Folien
C19:	100 μ F Folien
C20:	100 μ F Folien
C21:	100 μ F Folien
C22:	100 μ F Folien
C23:	100 μ F Folien
C24:	100 μ F Folien
C25:	100 μ F Folien
C26:	100 μ F Folien
C27:	10 μ F Tantal
C28:	4.7 μ F Folien
C29:	4.7 μ F Folien
C30:	10 μ F Folien
C31:	10 μ F Folien

Widerstanden:

R1:	10 k Ω Trimmer
R301:	10 k Ω Trimmer
R3:	1 k Ω
R31:	3 k Ω
R32:	1.8 k Ω
R33:	1 k Ω
R42:	3 k Ω

R43: 1.8 k Ω

R LSP8-LSP9: 100 k Ω

R LSP5-LSP6: 1 M Ω

IC:

AD630

OPA606

OPA227

OPA227

OPA2227

LM7805

11 Literaturverzeichnis

- [1] Hutterer K. M. and Jorgenson J. W., **Ultrahigh-voltage capillary zone electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **71**, 1293-1297 (1999).
- [2] Zemann A. J., **Sub-minute separations of organic and inorganic anions with co- electroosmotic capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **787**, 243-251 (1997).
- [3] Yang W. P., O'Flaherty B. and Cholli A. L., **Fast analysis of water samples for detection of anions by capillary zone electrophoresis**, *J. Environ. Sci. Health*, **A36**, 1271-1285 (2001).
- [4] Yang W. P. and Zhang Z. J., **Simultaneous and fast detection of anions in snow using short tube by capillary zone electrophoresis**, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **82**, 353-360 (2002).
- [5] Yang W. P. and Zhang Z. J., **Fast and direct determination of small anions in proteinaceous samples using low voltage-short tube capillary zone electrophoresis system**, *Anal. Lett.*, **36**, 465-477 (2003).
- [6] Björnsdóttir I. and Hansen S. H., **Fast separation of 16 seizure drug substances using non-aqueous capillary electrophoresis**, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **38**, 155-161 (1999).
- [7] Hyötyläinen T., Siren H. and Riekkola M. L., **Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary**

-
- electrophoresis with the marker technique**, *J. Chromatogr. A*, **735**, 439-447 (1996).
- [8] Rodriguez I., et al., **Conventional capillary electrophoresis in comparison with short-capillary capillary electrophoresis and microfabricated glass chip capillary electrophoresis for the analysis of fluorescein isothiocyanate anti-human immunoglobulin G**, *J. Chromatogr. A*, **781**, 287-293 (1997).
- [9] Zemann A. J., et al., **Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **70**, 563-567 (1998).
- [10] da Silva J. A. F. and do Lago C. L., **An oscillometric detector for capillary electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **70**, 4339-4343 (1998).
- [11] Ruzicka J. and Hansen E. H., **Flow injection analysis Part I. A new concept of fast continuous flow analysis**, *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145-157 (1975).
- [12] Stewart K. K., Beecher G. R. and Hare P. E., **Rapid Analysis of Discrete Samples - Use of Non-Segmented, Continuous-Flow**, *Anal. Biochem.*, **70**, 167-173 (1976).
- [13] Harvey D., **Modern Anal. Chem.**, *Mc Graw Hill*, New York, (2000).
- [14] Ruzicka J. and Hansen E. H., **Flow Injection Analysis**, *Wiley & Sons*, New York, (1988).
- [15] Spence D. M. and Crouch S. R., **Factors affecting zone variance in a capillary flow injection system**, *Anal. Chem.*, **69**, 165-169 (1997).

- [16] Satinsky D., Karlicek R. and Svoboda A., **Using on-line solid phase extraction for flow-injection spectrophotometric determination of salbutamol**, *Anal. Chim. Acta*, **455**, 103-109 (2002).
- [17] Anderson L., **Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow injection analysis**, *Anal. Chim. Acta*, **110**, 123-128 (1979).
- [18] Dai K., Vlessidis A. G. and Evmiridis N. P., **Dialysis membrane sampler for on-line flow injection analysis/chemiluminescence-detection of peroxyxynitrite in biological samples**, *Talanta*, **59**, 55-65 (2003).
- [19] Hasebe T., Nagao J. and Kawashima T., **Simultaneous flow injection determination of acetylcholine and choline based on luminol chemiluminescence in a micellar system with on-line dialysis**, *Anal. Sci.*, **13**, 93-98 (1997).
- [20] Lima J., Matos C. D. and Vaz M., **Determination of Ca, Mg, Na, and K in milk by AAS and flame emission spectroscopy using high dilution FIA manifolds based on stream splitting or a dialysis unit**, *Atom. Spectrosc.*, **17**, 196-200 (1996).
- [21] Lima J., Rangel A. and Souto M. R. S., **Simultaneous determination of potassium and sodium in vegetables by flame emission spectrometry using a flow-injection system with two dialysis units**, *Anal. Sci.*, **12**, 81-85 (1996).
- [22] Pravda M., et al., **A damping system for syringe pumps used for microdialysis with on-line electrochemical detection**, *Anal. Chem.*, **68**, 2447-2450 (1996).

- [23] Hauser P. C. and Zhang Z. P., **Flow-injection determination of lead by hydride generation and conductometric detection**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **355**, 141-143 (1996).
- [24] Azevedo C. M. N., et al., **Determination of sulfur dioxide in wines by gas-diffusion flow injection analysis utilizing modified electrodes with electrostatically assembled films of tetraruthenated porphyrin**, *Anal. Chim. Acta*, **387**, 175-180 (1999).
- [25] Oshima M., et al., **Highly sensitive determination method for total carbonate in water samples by flow injection analysis coupled with gas-diffusion separation**, *Anal. Sci.*, **17**, 1285-1290 (2001).
- [26] Mana H. and Spohn U., **Sensitive and selective flow injection analysis of hydrogen sulfite/sulfur dioxide by fluorescence detection with and without membrane separation by gas diffusion**, *Anal. Chem.*, **73**, 3187-3192 (2001).
- [27] Castillo E., et al., **Simultaneous determination of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) in surface waters by solid phase extraction and flow injection analysis with spectrophotometric detection**, *Analyst*, **126**, 1149-1153 (2001).
- [28] Miro M., et al., **A novel flow-through disk-based solid-phase extraction diffuse reflectance optrode. Application to preconcentration and determination of trace levels of nitrite**, *Analyst*, **126**, 1740-1746 (2001).
- [29] Ohno N. and Sakai T., **Sensitive and selective flow-injection analysis coupled with solvent-extraction for the determination of pharmaceuticals and environmental pollutants**, *Bunseki Kagaku*, **53**, 233-244 (2004).

- [30] Wang J. H. and Hansen E. H., **Flow injection on-line two-stage solvent extraction preconcentration coupled with ET-AAS for determination of bismuth in biological and environmental samples**, *Anal. Lett.*, **33**, 2747-2766 (2000).
- [31] Weeks D. A. and Bruland K. W., **Improved method for shipboard determination of iron in seawater by flow injection analysis**, *Anal. Chim. Acta*, **453**, 21-32 (2002).
- [32] HajHussein A. T., **Ultraviolet spectrophotometric determination of copper in copper ores by flow-injection analysis**, *Talanta*, **43**, 1909-1914 (1996).
- [33] Kojlo A. and Gorodkiewicz E., **Simultaneous Spectrophotometric Determination of Nitrite and Nitrate in a Flow-Injection System**, *Anal. Chim. Acta*, **302**, 283-287 (1995).
- [34] Bordera L., Hernandis V. and Canals A., **Automatic flow injection system for the determination of heavy metals in sewage sludge by microwave digestion and detection by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (MW- ICP/AES)**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **355**, 112-119 (1996).
- [35] Burguera J. L. and Burguera M., **Flow-Injection Spectrophotometry Followed by Atomic-Absorption Spectrometry for the Determination of Iron(II) and Total Iron**, *Anal. Chim. Acta*, **161**, 375-379 (1984).
- [36] Kelly T. A. and Christian G. D., **Fluorometer for Flow-Injection Analysis with Application to Oxidase Enzyme Dependent Reactions**, *Anal. Chem.*, **53**, 2110-2114 (1981).

- [37] Rhee J. and Dasgupta P. K., **Determination of acids, bases, metal ions and redox species by peak width measurement flow injection analysis with potentiometric, conductometric, fluorometric and spectrophotometric detection**, *Microchim. Acta*, **III**, 107-122 (1985).
- [38] Hauser P. C. and Litten J. C., **Flow-injection analysis with bulk extraction based optical sensor membranes**, *Anal. Chim. Acta*, **294**, 49-56 (1994).
- [39] Chaniotakis N. A., et al., **Magnesium ion-selective electrode: optimization and flow injection analysis application**, *Anal. Chim. Acta*, **356**, 105-111 (1997).
- [40] Hidayat A., Hibbert D. B. and Alexander P. W., **Amperometric flow injection analysis of organic thiols and proteins**, *Electroanalysis*, **8**, 468-472 (1996).
- [41] Donascimento P. C. and Schwedt G., **Comparative-Studies of the Determination of Cyanide at Low Concentration Levels in Waste-Waters**, *Anal. Chim. Acta*, **283**, 755-761 (1993).
- [42] Ruzicka J. and Hansen E. H., **Integrated microconduits for flow injection analysis**, *Anal. Chim. Acta*, **161**, 1-25 (1984).
- [43] Carlsson K., et al., **Micro-continuous flow system for wet chemical analysis**, *Anal. Chim. Acta*, **354**, 35-42 (1997).
- [44] Fettinger J. C., et al., **Stacked modules for micro flow systems in chemical analysis: concept and studies using an enlarged model**, *Sensor. Actuat. B*, **17**, 19-25 (1993).

- [45] van der Schoot B. H., et al., **Modular setup for a miniaturized chemical analysis system**, *Sensor. Actuat. B*, **15-16**, 211-213 (1993).
- [46] van der Schoot B. H., et al., **A silicon integrated miniature chemical analysis system**, *Sensor. Actuat. B*, **6**, 57-60 (1992).
- [47] Daykin R. N. C. and Haswell S. J., **Development of a micro flow injection manifold for the determination of orthophosphate**, *Anal. Chim. Acta*, **313**, 155-159 (1995).
- [48] Doku G. N. and Haswell S. J., **Further studies into the development of micro-FIA (μ FIA) system based on electroosmotic flow for the determination of phosphate as orthophosphate**, *Anal. Chim. Acta*, **382**, 1-13 (1999).
- [49] Haswell S. J., **Development and operating characteristics of micro flow injection analysis systems based on electroosmotic flow A review**, *Analyst*, **122**, 1R-10R (1997).
- [50] Petsul P. H., Greenway G. M. and Haswell S. J., **The development of an on-chip micro-flow injection analysis of nitrate with a cadmium reductor**, *Anal. Chim. Acta*, **428**, 155-161 (2001).
- [51] Linnemann R., et al., **Mikropumpe für Flüssigkeiten und Gase**, *LaborPraxis*, **11**, 68-76 (1997).
- [52] Kakizaki T., Imai K. and Hasebe K., **Flow injection with diaphragm pump and amperometric detector**, *Anal. Comm.*, **33**, 75-77 (1996).

- [53] Weeks D. A. and Johnson K. S., **Solenoid pumps for flow injection analysis**, *Anal. Chem.*, **68**, 2717-2719 (1996).
- [54] Ruzicka J. and Hansen E. H., **Recent developments in flow injection analysis: gradient technique and hydrodynamic injection**, *Anal. Chim. Acta*, **145**, 1-15 (1983).
- [55] Tiselius A., **A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures**, *Trans. Faraday. Soc.*, **33**, 524 (1937).
- [56] **Nobel Lectures, Chemistry 1942-1962**, *Elsevier*, Amsterdam, (1964).
- [57] Hjerten S., **High-Performance Electrophoresis - the Electrophoretic Counterpart of High-Performance Liquid-Chromatography**, *J. Chrom. A*, **270**, 1-6 (1983).
- [58] Mikkers F. E. P., Everaerts F. M. and Verheggen T. P. E. M., **High-performance zone electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **169**, 11-20 (1979).
- [59] Jorgenson J. W. and Lukacs K. D., **Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries**, *Anal. Chem.*, **53**, 1298-1302 (1981).
- [60] Jorgenson J. W. and DeArman Lukacs K., **High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis**, *J. Chromatogr. A*, **218**, 209-216 (1981).
- [61] Harrison D. J., et al., **Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip**, *Anal. Chem.*, **64**, 1926-1932 (1992).

- [62] Reyes D. R., et al., **Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology**, *Anal. Chem.*, **74**, 2623-2636 (2002).
- [63] Wang J., et al., **Capillary electrophoresis microchips for separation and detection of organophosphate nerve agents**, *Anal. Chem.*, **73**, 1804-1808 (2001).
- [64] Dang F., et al., **Ultrafast analysis of oligosaccharides on microchip with light-emitting diode confocal fluorescence detection**, *Electrophoresis*, **24**, 714-721 (2003).
- [65] Effenhauser C. S., Manz A. and Widmer H. M., **Glass Chips for High-Speed Capillary Electrophoresis Separations with Submicrometer Plate Heights**, *Anal. Chem.*, **65**, 2637-2642 (1993).
- [66] Engelhardt H., Beck W. and Schmitt T., **Kapillarelektrophorese**, Vieweg Verlag, Wiesbaden, (1994).
- [67] Strege M. and Lagu A., **Separation of DNA Restriction Fragments by Capillary Elektrophoresis Using Coated Fused Silica Capillaries**, *Anal. Chem.*, **63**, 1233-1236 (1991).
- [68] Molina M. and Silva M., **Micellar electrokinetic chromatography: Current developments and future**, *Electrophoresis*, **23**, 3907-3921 (2002).
- [69] Pyell U., **Micellar electrokinetic chromatography - From theoretical concepts to real samples (Review)**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **371**, 691-703 (2001).

- [70] Bartle K. D. and Myers P., **Theory of capillary electrochromatography**, *J. Chromatogr. A*, **916**, 3-23 (2001).
- [71] Blatny P. and Kvasnicka F., **Application of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples**, *J. Chromatogr. A*, **834**, 419-431 (1999).
- [72] Gebauer P. and Bocek P., **Recent progress in capillary isotachopheresis**, *Electrophoresis*, **21**, 3898-3904 (2000).
- [73] Gebauer P. and Bocek P., **Recent progress in capillary isotachopheresis**, *Electrophoresis*, **23**, 3858-3864 (2002).
- [74] Thormann W., et al., **Advances of capillary electrophoresis in clinical and forensic analysis (1999-2000)**, *Electrophoresis*, **22**, 4216-4243 (2001).
- [75] Patrick J. S. and Lagu A. L., **Review applications of capillary electrophoresis to the analysis of biotechnology-derived therapeutic proteins**, *Electrophoresis*, **22**, 4179-4196 (2001).
- [76] Dabek-Zlotorzynska E., Aranda-Rodriguez R. and Keppel-Jones K., **Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of pollutants**, *Electrophoresis*, **22**, 4262-4280 (2001).
- [77] Tegeler T. and El Rassi Z., **Capillary electrophoresis and electrochromatography of pesticides and metabolites**, *Electrophoresis*, **22**, 4281-4293 (2001).

- [78] Weinberger R., **Capillary electrophoresis of venoms and toxins**, *Electrophoresis*, **22**, 3639-3647 (2001).
- [79] Macka M. and Haddad P. R., **Determination of metal ion by capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **18**, 2482-2501 (1997).
- [80] Klampfl C. W., Buchberger W. and Haddad P. R., **Determination of organic acids in food sample by capillary zone electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **881**, 357-364 (2000).
- [81] Trenerry V. C., **The application of capillary electrophoresis to the analysis of vitamins in food and beverages**, *Electrophoresis*, **22**, 1468-1478 (2001).
- [82] Frazier R. A. and Papadopoulou A., **Recent advances in the application of capillary electrophoresis for food analysis**, *Electrophoresis*, **24**, 4095-4105 (2003).
- [83] Harakuwe A. H. and Haddad P. R., **Control of separation selectivity in capillary zone electrophoresis of inorganic anions**, *J. Chromatogr. A*, **834**, 213-232 (1999).
- [84] Paull B. and King M., **Quantitative capillary zone electrophoresis of inorganic anions**, *Electrophoresis*, **24**, 1892-1934 (2003).
- [85] Timerbaev A. R., Dabek-Zlotorzynska E. and van den Hoop M., **Inorganic environmental analysis by capillary electrophoresis**, *Analyst*, **124**, 811-826 (1999).

- [86] Wang A. B. and Fang Y. Z., **Applications of capillary electrophoresis with electrochemical detection in pharmaceutical and biomedical analyses**, *Electrophoresis*, **21**, 1281-1290 (2000).
- [87] Fritz J. S., **Recent developments in the separation of inorganic and small organic ions by capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **884**, 261-275 (2000).
- [88] Paulus A. and Klockow A., **Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **720**, 353-376 (1996).
- [89] Suzuki S. and Honda S., **Miniaturization in carbohydrate analysis**, *Electrophoresis*, **24**, 3577-3582 (2003).
- [90] Poinot V., Bayle C. and Couderc F., **Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **24**, 4047-4062 (2003).
- [91] Kasicka V., **Recent advances in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of peptides**, *Electrophoresis*, **24**, 4013-4046 (2003).
- [92] Wang J., **Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review**, *Talanta*, **56**, 223-231 (2002).
- [93] Baker D. R., **Capillary Electrophoresis**, *John Wiley & Sons*, New York, (1995).
- [94] Kirby B. J. and Hasselbrink E. F., **Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations**, *Electrophoresis*, **25**, 187-202 (2004).

- [95] Lucy C. A. and Underhill R. S., **Characterization of the cationic surfactant induced reversal of electroosmotic flow in capillary electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **70**, 1045-1045 (1998).
- [96] Petersen N. J., et al., **Effect of Joule heating on efficiency and performance for microchip-based and capillary-based electrophoretic separation systems: A closer look**, *Electrophoresis*, **25**, 253-269 (2004).
- [97] Grushka E., McCormick R. M. and Kirkland J. J., **Effect of Temperature-Gradients on the Efficiency of Capillary Zone Electrophoresis Separations**, *Anal. Chem.*, **61**, 241-246 (1989).
- [98] Petersen S. L. and Ballou N. E., **Effects of Capillary Temperature Control and Electrophoretic Heterogeneity on Parameters Characterizing Separations of Particles by Capillary Zone Electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **64**, 1676-1681 (1992).
- [99] Beckers J. L. and Bocek P., **Sample stacking in capillary zone electrophoresis: Principles, advantages and limitations**, *Electrophoresis*, **21**, 2747-2767 (2000).
- [100] Heiger D. N., **High Performance Capillary Electrochromatography**, *Hewlett-Packard*, (1992).
- [101] Krivacsy Z., et al., **Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application to the analysis of inorganic compounds**, *J. Chromatogr. A*, **834**, 21-44 (1999).
- [102] Böcker J., **Spektroskopie**, *Vogel Buchverlag*, Würzburg, (1997).

- [103] Dasgupta P. K., et al., **Light emitting diode based flow-through optical absorbtion detectors**, *Talanta*, **40**, 53-74 (1993).
- [104] Butler P. A. G., Mills B. and Hauser P. C., **Capillary electrophoresis detector using a light emitting diode and optical fibers**, *Analyst*, **122**, 949-953 (1997).
- [105] Hauser P. C., Rupasinghe T. W. T. and Cates N. E., **A multi wavelength photometer based on light-emitting diodes**, *Talanta*, **42**, 605-612 (1995).
- [106] Hauser P. C. and Rupasinghe T. W. T., **Simultaneous determination of metal ion concentrations in binary mixtures with a multi-LED photometer**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **357**, 1056-1060 (1997).
- [107] King M., et al., **Performance of a simple UV LED light source in the capillary electrophoresis of inorganic anions with indirect detection using a chromate background electrolyte**, *Analyst*, **127**, 1564-1567 (2002).
- [108] Macka M., Andersson P. and Haddad P. R., **Linearity evaluation in absorbance detection: The use of light emitting diodes for on capillary detection in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **17**, 1898-1905 (1996).
- [109] Lu Q. and Collins G. E., **Microchip separations of transition metal ions via LED absorbance detection of their PAR complexes**, *Analyst*, **126**, 429-432 (2001).
- [110] Atkins P. W., **Physikalische Chemie**, *VCH Verlag*, Weinheim, (1990).

- [111] Huang X. H., et al., **On-Column Conductivity Detector for Capillary Zone Electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **59**, 2747-2749 (1987).
- [112] Huang X. H., et al., **End-Column Detection for Capillary Zone Electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **63**, 189-192 (1991).
- [113] Huang X. H. and Zare R. N., **Improved End-Column Conductivity Detector for Capillary Zone Electrophoresis**, *Anal. Chem.*, **63**, 2193-2196 (1991).
- [114] Tanyanyiwa J., et al., **Improved capacitively coupled conductivity detector for capillary electrophoresis**, *Analyst*, **127**, 214-218 (2002).
- [115] Tanyanyiwa J., Schweizer K. and Hauser P. C., **High-voltage contactless conductivity detection of underivatized amino acids in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **24**, 2119-2124 (2003).
- [116] Kuban P. and Hauser P. C., **Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part I: Frequency behavior and cell geometry**, *Electrophoresis*, **25**, 3387-3397 (2004).
- [117] Kuban P. and Hauser P. C., **Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part II: Signal-to-noise ratio and stray capacitance**, *Electrophoresis*, **25**, 3398-3405 (2004).
- [118] Zemann A. J., **Conductivity detection in capillary electrophoresis**, *Trac-Trends in Anal. Chem.*, **20**, 346-354 (2001).
- [119] Tanyanyiwa J., Leuthardt S. and Hauser P. C., **Conductimetric and potentiometric detection in conventional and microchip capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **23**, 3659-3666 (2002).

- [120] Zemann A. J., **Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **24**, 2125-2137 (2003).
- [121] Mayrhofer K., et al., **Capillary electrophoresis and contactless conductivity detection of ions in narrow inner diameter capillaries**, *Anal. Chem.*, **71**, 3828-3833 (1999).
- [122] Tanyanyiwa J. and Hauser P. C., **High-voltage contactless conductivity detection of metal ions in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **23**, 3781-3786 (2002).
- [123] Tanyanyiwa J., Leuthardt S. and Hauser P. C., **Electrophoretic separations with polyether ether ketone capillaries and capacitively coupled contactless conductivity detection**, *J. Chromatogr. A*, **978**, 205-211 (2002).
- [124] Kuban P., Karlberg B. and Kuban V., **Application of a contactless conductometric detector for the simultaneous determination of small anions and cations by capillary electrophoresis with dual-opposite end injection**, *J. Chromatogr. A*, **964**, 227-241 (2002).
- [125] Laugere F., et al., **On-chip contactless four-electrode conductivity detection for capillary electrophoresis devices**, *Anal. Chem.*, **75**, 306-312 (2003).
- [126] Tanyanyiwa J., Abad-Villar E. M. and Hauser P. C., **Contactless conductivity detection of selected organic ions in on-chip electrophoresis**, *Electrophoresis*, **25**, 903-908 (2004).

- [127] Tanyanyiwa J. and Hauser P. C., **Capillary and microchip electrophoresis of basic drugs with contactless conductivity detection**, *Electrophoresis*, **25**, 3010-3016 (2004).
- [128] Coufal P., et al., **Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection**, *Electrophoresis*, **24**, 671-677 (2003).
- [129] Carvalho A. Z., da Silva J. A. F. and do Lago C. L., **Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection**, *Electrophoresis*, **24**, 2138-2143 (2003).
- [130] Swinney K. and Bornhop D. J., **Detection in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **21**, 1239-1250 (2000).
- [131] Pereira E. A., Carrilho E. and Tavares M. F. M., **Laser-induced fluorescence and UV detection of derivatized aldehydes in air samples using capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **979**, 409-416 (2002).
- [132] Hillebrand S., et al., **Performance of an ultraviolet light-emitting diode-induced fluorescence detector in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **23**, 2445-2448 (2002).
- [133] Holland L. A. and Leigh A. M., **Amperometric and voltammetric detection for capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **23**, 3649-3658 (2002).
- [134] Schwarz M. A. and Hauser P. C., **Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices**, *Lab Chip*, **1**, 1-6 (2001).

- [135] Baldwin R. P., **Recent advances in electrochemical detection in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, **21**, 4017-4028 (2000).
- [136] Nagels L. J. and Poels I., **Solid state potentiometric detection systems for LC, CE and mu TAS methods**, *Trac-Trends Anal. Chem.*, **19**, 410-417 (2000).
- [137] Hauser P. C., et al., **Process monitoring for an ammoniacal nickel solution employing an infrared light-emitting diode and a log-ratio amplifier**, *Analyst*, **120**, 2635-2637 (1995).
- [138] Hauser P. C. and Litten J. C., **Flow-Injection Analysis with Bulk Extraction Based Optical Sensor Membranes**, *Anal. Chim. Acta*, **294**, 49-56 (1994).
- [139] Mortatti J., et al., **Determination of iron in natural waters and plant material with 1,10-Phenanthroline by flow injection analysis**, *Analyst*, **107**, 659-663 (1982).
- [140] Regan F. B., Meaney M. P. and Lunte S. M., **Determination of metal ions by capillary electrophoresis using on-column complexation with 4-(2-Pyridylazo)resorcinol following trace enrichment by peak stacking**, *J. Chromatogr. B*, **657**, 409-417 (1994).
- [141] Engström E., Jönebring I. and Karlberg B., **Assessment of a screening method for metals in seawater based on the non-selective reagent 4-(pyridylazo)resorcinol (PAR)**, *Anal. Chim. Acta*, **371**, 227-234 (1998).
- [142] Stratz R., **Tragbares Kapillarelektrophoresegerät und miniaturisierte Fliessinjektionsanalyse mit optischer Detektion**, *Dissertation*, (1999).

- [143] Hooker T. F. and Jorgenson J. W., **A transparent flow gating interface for the coupling of microcolumn LC with CZE in a comprehensive two-dimensional system**, *Anal. Chem.*, **69**, 4134-4142 (1997).
- [144] Bard A. j., **Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications**, Wiley,
- [145] Malá Z., Vespalec R. and Bocek P., **Capillary zone electrophoresis with indirect photometric detection in the visible range**, *Electrophoresis*, **15**, 1526-1530 (1994).
- [146] Johns C., Macka M. and Haddad P. R., **Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis using dyes as probes and electrolytes buffered with an isoelectric ampholyte**, *Electrophoresis*, **21**, 1312-1319 (2000).
- [147] Doble P., et al., **Buffered chromate electrolytes for separation and indirect absorbance detection of inorganic anions in capillary electrophoresis**, *Anal. Commun.*, **34**, 351 - 353 (1997).
- [148] Doble P. and Haddad P. R., **Use of electrolytes containing multiple co-anions in the analysis of anions by capillary electrophoresis using indirect absorbance detection**, *Anal. Chem.*, **71**, 15-22 (1999).
- [149] Foret F., et al., **Indirect photometric detection in capillary zone electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **470**, 299-308 (1989).
- [150] Galceran M. T. and Jauregui O., **Determination of Phenols in Sea-Water by Liquid-Chromatography with Electrochemical Detection after Enrichment by Using Solid- Phase Extraction Cartridges and Disks**, *Anal. Chim. Acta*, **304**, 75-84 (1995).

- [151] Mardones C., Rios A. and Valcarcel M., **Determination of chlorophenols in human urine based on the integration of on-line automated clean-up and preconcentration unit with micellar electrokinetic chromatography**, *Electrophoresis*, **20**, 2922-2929 (1999).
- [152] Ong C. P., et al., **Analysis of Priority Substituted Phenols by Micellar Electrokinetic Chromatography**, *Environ. Monit. and Assess.*, **19**, 93-103 (1991).
- [153] Skoog D. A. and J.J. L., **Instrumentelle Analytik**, *Springer - Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York, (1996).
- [154] Francois C., Morin P. and Dreux M., **Separation of transition metal cations by capillary electrophoresis Optimization of complexing agent concentrations (lactic acid and 18-crown-6)**, *J.Chromatogr. A*, **717**, 393-408 (1995).
- [155] Shi Y. and Fritz J. S., **New electrolyte systems for the determination of metal cations by capillary zone electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **671**, 429-435 (1994).
- [156] Kuban P. and Kuban V., **Flow injection-capillary electrophoresis system with contactless conductivity detection and hydrostatic pressure generated flow. Application to the quantitative analysis of inorganic anions in water samples**, *Electrophoresis*, **24**, 1935-1943 (2003).
- [157] Kuban P., Hauser P. C. and Kuban V., **A flow injection-capillary electrophoresis system with high- voltage contactless conductivity detection for automated dual opposite end injection**, *Electrophoresis*, **25**, 35-42 (2004).

- [158] Ludwig M., Kohler F. and Belder D., **High-speed chiral separations on a microchip with UV detection**, *Electrophoresis*, **24**, 3233-3238 (2003).
- [159] Wang J. and Chen G., **Microchip capillary electrophoresis with electrochemical detector for fast measurements of aromatic amino acids**, *Talanta*, **60**, 1239-1244 (2003).
- [160] Zhang C. X. and Manz A., **Narrow sample channel injectors for capillary electrophoresis on microchips**, *Anal. Chem.*, **73**, 2656-2662 (2001).
- [161] Obeid P. J., Christopoulos T. K. and Ioannou P. C., **Rapid analysis of genetically modified organisms by in-house developed capillary electrophoresis chip and laser-induced fluorescence system**, *Electrophoresis*, **25**, 922-930 (2004).
- [162] Rodriguez I., Lee H. K. and Li S. F. Y., **Microchannel electrophoretic separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography**, *Electrophoresis*, **20**, 118-126 (1999).
- [163] Oehrle S. A., **Controlled changes in selectivity of cation separations by capillary electrophoresis using various crown-ether additives**, *J. Chromatogr. A*, **745**, 87-92 (1996).
- [164] <http://www.bs.ch/wasser.htm>
- [165] http://www.iwb.ch/site/1_8_1_2_1.php

- [166] Galceran M. T., Puignou L. and Diez M., **Comparison of different electroosmotic flow modifiers in the analysis of inorganic anions by capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **732**, 167-174 (1996).
- [167] Honda S., et al., **Simultaneous Determination of Reducing Monosaccharides by Capillary Zone Electrophoresis as the Borate Complexes of N-2 Pyridylglycamines**, *Anal. Biochem.*, **176**, 72-77 (1989).
- [168] Honda S., **Separation of neutral carbohydrates by capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **720**, 337-351 (1996).
- [169] Honda S., et al., **High-Performance Capillary Zone Electrophoresis of Carbohydrates in the Presence of Alkaline-Earth Metal-Ions**, *J. Chromatogr. A*, **588**, 327-333 (1991).
- [170] Hase S., **Precolumn derivatization for chromatographic and electrophoretic analyses of carbohydrates**, *J. Chromatogr. A*, **720**, 173-182 (1996).
- [171] Soga T. and Serwe M., **Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection**, *Food Chem.*, **69**, 339-344 (2000).
- [172] Cao Y. H., et al., **Study on sugar profile of rice during ageing by capillary electrophoresis with electrochemical detection**, *Food Chem.*, **86**, 131-136 (2004).
- [173] Huang X. J. and Kok W. T., **Determination of Sugars by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection Using Cuprous-Oxide Modified Electrodes**, *J. Chromatogr. A*, **707**, 335-342 (1995).

- [174] Guttman A., **Analysis of monosaccharide composition by capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **763**, 271-277 (1997).
- [175] Suzuki S., et al., **Rapid analysis of amino sugars by microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection**, *Electrophoresis*, **22**, 4023-4031 (2001).
- [176] Soga T. and Imaizumi M., **Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds**, *Electrophoresis*, **22**, 3418-3425 (2001).
- [177] Cabalkova J., et al., **Determination of carbohydrates in juices by high-performance liquid capillary electrophoresis, chromatography, and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry**, *Electrophoresis*, **25**, 487-493 (2004).
- [178] Liu J. F. and Ducker W. A., **Surface-induced phase behavior of alkyltrimethylammonium bromide surfactants adsorbed to mica, silica, and graphite**, *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8558-8567 (1999).
- [179] Beckers J. L., Gebauer P. and Bocek P., **Why robust background electrolytes containing multivalent ionic species can fail in capillary zone electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **916**, 41-49 (2001).
- [180] Beckers J. L. and Everaerts F. M., **System peaks in capillary zone electrophoresis - What are they and where are they coming from?**, *J. Chromatogr. A*, **787**, 235-242 (1997).

- [181] Beckers J. L. and Bocek P., **Multiple effect of surfactants used as additives in background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Cetyltrimethylammonium bromide as example of model surfactant**, *Electrophoresis*, **23**, 1947-1952 (2002).
- [182] Beckers J. L. and Bocek P., **Multivalent weak electrolytes - risky background electrolytes for capillary zone electrophoresis**, *Electrophoresis*, **23**, 1942-1946 (2002).
- [183] Beckers J. L. and Bocek P., **The preparation of background electrolytes capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls**, *Electrophoresis*, **24**, 518-535 (2003).
- [184] Gebauer P., Beckers J. L. and Bocek P., **Theory of system zones in capillary zone electrophoresis**, *Electrophoresis*, **23**, 1779-1785 (2002).
- [185] Soga T. and Ross G. A., **Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis**, *J. Chromatogr. A*, **837**, 231-239 (1999).
- [186] Vcelakova K., et al., **Determination of cationic mobilities and pK(a) values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis**, *Electrophoresis*, **25**, 309-317 (2004).