

Einsatz partikulärer und monolithischer Kapillaren in der Kapillarelektrochromatographie

Vom Fachbereich C – Analytische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte
DISSERTATION

von

Stefan Droste

aus Dorsten

Wuppertal 2005

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. S. Gäß

an der Bergischen Universität Wuppertal im Fachbereich C – Analytische Chemie

in der Zeit von Januar 2002 bis Juli 2005

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20050750

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20050750>]

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. S. Gäb für die Bereitstellung des Themas bedanken. Die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung halfen gerade in den Zeiten, in denen es nicht von selbst lief.

Für die Übernahme des Korreferats und für die Beantwortung unzähliger Fragen auf dem Gebiet der CE und CEC danke ich Herrn PD Dr. O. Schmitz.

Der mechanischen Werkstatt unter der Leitung von Herrn Brakelmann danke ich für die stets schnelle und passgenaue Fertigung aller extravaganten Wünsche, die mir im Laufe meiner Arbeit einfielen.

Den Massenspektrometrie-Experten Marc Schellenträger und Marc Constapel danke ich für die oftmals aufwendige Mithilfe bei den Kopplungsversuchen der CEC mit der MS.

Bei Prof. Dr. Thorsten Benter und Dr. Klaus Brockmann bedanke ich mich für die wertvolle Unterstützung bei allen Experimenten mit dem Eximer-Laser. Die große Flexibilität, Diskussionsfreude und die lockeren Sprüche machten die Arbeit zum Vergnügen.

Bei Dr. Walter V. Turner bedanke ich mich für die Unterstützung bei allen Fragestellungen zur englischen Sprache.

Frau Silke Möschter im besonderen, aber natürlich den Rest der Arbeitsgruppe danke ich für die stete Hilfsbereitschaft, das gute Arbeitsklima und für viele Diskussion zu meiner Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei Andrea bedanken. Es war bestimmt nicht leicht, meiner teilweise schlechten Laune mit Deiner Geduld und Zuversicht zu begegnen; what comes around goes around.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Kapillarelektrochromatographie (CEC)	11
1.1.1	Elektroosmotischer Fluß (EOF)	13
1.1.2	Vorteile der CEC	16
1.1.3	Nachteile der CEC	18
1.1.4	Verschiedene Säulen in der CEC	19
1.1.4.1	Open-Tubular-Kapillaren	19
1.1.4.2	Gepackte Kapillaren	20
1.1.5	Detektionsarten in der CEC	25
1.1.5.1	CEC-UV/VIS	25
1.1.5.2	CEC-LIF	26
1.1.5.3	CEC-MS	27
2	Aufgabenstellung und Zielsetzung	30
3	Ergebnisse und Diskussion	31
3.1	Partikuläre Kapillaren für die CEC	31
3.1.1	Herstellung der Trennkapillare	31
3.1.1.1	Slurry Packung mit gesinterten Fritten	31
3.1.1.2	Slurry Packung mit Querschnittsverengung und einer Fritte	33
3.1.2	Einsatz von Kapillaren mit gesintertem Fritte gegenüber konischer Verjüngung an der Auslassseite	36
3.1.3	Einsatz weiterer partikulärer Phasenmaterialien	39
3.1.3.1	Trennung einer Testmischung an einer endcapped-Aminphase	40
3.1.3.2	Trennung eines Wirkstoffgemisches an einer endcapped-Aminphase	47
3.1.3.3	Trennung einer PAK-Mischung an einer BS-C23-Phase	50
3.1.3.4	Fazit zu den partikulär gepackten Phasen	50
3.2	Monolithische Kapillaren für die CEC	51
3.2.1	Molecular Imprinted Polymer - MIP	52
3.2.2	Monolithische Kapillaren auf Basis wasserlöslicher Acrylamid-Monomere	56
3.2.3	Monolithen auf Silikabasis	62
3.2.3.1	Trennung von PAKs und UV-Detektion	62

3.2.3.2	Trennung von derivatisierten Wirkstoffen und LIF-Detektion	63
3.3	Einsatz der CEC-MS.....	69
3.3.1	Trennung von Alkylpolyglykosiden (APGs) mittels CEC-ESI-MS	69
3.3.2	Entwicklung einer CEC-ES-APLI-MS-Kopplung.....	73
3.3.3	Einsatz eines Silika-Monolithen in der ES-APLI- MS	81
3.4	Limitationen der CEC	86
4	Zusammenfassung.....	88
5	Experimenteller Teil	90
5.1	Methoden zur Herstellung der Kapillaren.....	90
5.2	Fluoreszenzmakierung der Wirkstoffe.....	95
6	Anhang	96
6.1	Abbildungsverzeichnis	96
6.2	Tabellenverzeichnis	97
6.3	Chemikalienliste	98
6.4	Geräteliste	100
7	Literaturverzeichnis.....	101

Abstract

In this work, monolithic and particulate-packed capillaries were tested for their usefulness in capillary electrochromatography (CEC). One problem with particulate-packed capillaries is the formation of air bubbles, which occurs mainly at the outlet frit. For this reason, tapered capillaries were tested, where the outlet frit is replaced by a reduction in the diameter of the capillary. The use of an electrical arc makes the fabrication of the bottleneck reproducible. The particles are retained by the tapered “outlet frit” and form a stable bed. Blank tests showed that the tapered capillaries tend to form fewer air bubbles than fritted capillaries with similar separation efficiencies.

An even better reduction in bubble formation could be achieved with monolithic capillaries. With the Molecular-Imprinting-Polymer (MIP) approach, highly selective phases could be synthesized. An MIP which was produced by photo-initiated polymerization with cotinine as a template made it possible to separate the structurally related compounds cotinine, myosmine and nicotine. Because of the high selectivity, the applicability of the MIP as solid-phase extraction (SPE) material during sample preparation is encouraging.

Acrylamide and silica monoliths proved to be less selective, but well suited for separations of lipophilic samples. With these capillaries, air-bubble generation was not a problem. Although the acrylamide monoliths, which were prepared as part of this work, are based on water-soluble monomers, the lipophilic interactions between the sample and the stationary phase were strong enough to retain and separate a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Stronger lipophilic characteristics were shown by the commercially available RP-18 silica monoliths. These possessed good separation efficiencies for neutral lipophilic substances and produced a satisfactory EOF. The acrylamide and the silica monoliths were easily coupled to the mass spectrometer (MS). Alkyl polyglycosides (APGs) were analyzed first by ESI-MS. While the lipophilic properties of the acrylamide phase were not strong enough for base-line separation, the silica phase separated the APGs quite well. Only polar substances can be ionized by ESI, but, since CEC is especially useful for the separation of lipophilic substances, the monolithic capillaries were coupled with the recently developed Atmospheric-Pressure-Laser Ionization (APLI). The acrylamide monolith was destroyed in the tip area when the laser was turned on. This might have happened because the laser light was scattered in the ionization area, which led to irradiation of the capillary tip. In the end, this induced pyrolysis and formed a great number of nitrogen-containing fragments. These were ionized by ESI and produced a noisy background. Separation of the PAHs was achieved with the silica monolith. Selective soft ionization was employed, with subsequent TOF-MS detection. With this technique, the application of CEC-MS could be extended to lipophilic substances.

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidisulfat
CEC	Capillary Electrochromatography
CFFAB	Continous Flow Fast Atom Bombardment
DAD	Diodenarray Detektor
DMAA	Dimethylacrylamid
DMAL	Dimethylallylamin
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI	Electrospray Ionization
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID	Innendurchmesser
IPA	Isopropylacrylamid
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
MAA	Methacrylic Acid
MMA	Methylmethacrylic Acid
MS	Massenspektrometer
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PAK	Polyaromatische Kohlenwasserstoffe
PDA	Piperazindiacrylamid
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TRIM	[1,1,1-tris(hydroxymethyl)-propane trimethacrylat]
VSA	Vinylsulfonic Acid

*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.
Galileo Galilei.*

1 Einleitung

Die Arbeiten des Physikers KOHLRAUSCH zur Leitfähigkeit von Elektrolytlösungen führten 1897 zum KOHLRAUSCH'schen Gesetz, welches besagt, dass sich geladene Teilchen abhängig von ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in einem elektrischen Feld bewegen [1]. Dieser als Elektrophorese bezeichneter Effekt wurde bereits 1937 von TISELIUS zur Trennung einer Proteinmischung erfolgreich eingesetzt [2].

Da jedoch die Elektrophorese in Lösung durch die thermische Diffusion und Konvektion in ihrer Leistungsfähigkeit stark begrenzt ist, wurde die Flachbettgelelektrophorese entwickelt. Dabei werden Gele beispielsweise auf Polyacrylamid- oder Agarosebasis eingesetzt, an denen nach Auftragen der Probe ein elektrisches Feld angelegt wird. Diese Methode wird heute noch häufig zur Trennung von Aminosäuren, DNA, RNA, Peptiden und Proteinen in der Bioanalytik verwendet [3]. Jedoch hat sie einige gravierende Nachteile:

- Aufgrund der entstehenden Joule'schen Wärme ist die üblicherweise angelegte Spannung relativ gering; dies führt zu schlechten Trennleistungen und langen Analysenzeiten.
- Die Detektion erfolgt meist indirekt durch Anfärbung, wodurch eine quantitative Aussage erheblich erschwert wird.
- Die mangelnde Automatisierbarkeit und der damit einhergehende geringe Probendurchsatz wirken sich begrenzend aus.

Um diese Probleme zu lösen, wurde die Elektrophorese zunächst in einem Rohr und später dann in einer Kapillare durchgeführt. HJERTÉN gelang 1967 zum ersten mal eine Zonenelektrophorese im Quarzrohr [4]. Dabei rotierte das Glasrohr um seine eigene Achse, wodurch eine thermische Stabilisierung gewährleistet wurde. Um den Aufbau zu vereinfachen und eine bessere Wärmeabfuhr zu erzielen, wurde eine Verringerung des Innendurchmessers nötig. Ende der 70er Jahre nutzten MIKKERS, EVERAERTS und VERHEGGEN zunächst Glas- und Teflonkapillaren mit Innendurchmessern zwischen 200 und 500 μm [5], bevor dann anfang der 80er Jahre JORGENSON fused-silica Kapillaren aus der Gaschromatographie mit Innendurchmessern zwischen 50 und 200 μm einsetzte [6-8]. Dies ermöglichte letztendlich eine sehr effiziente Kühlung, da mit abnehmendem Innendurchmesser das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen verbessert wird. Dadurch ergeben sich mehrere Vorteile:

- Eine direkte on-column UV- und Fluoreszenzdetektion ist durchführbar und somit das Anfärben der Analyten unnötig.
- Ein hoher Automatisierungsgrad kann erreicht werden.
- Die Wärme kann wesentlich besser abgeführt werden, was wiederum höhere Feldstärken und damit geringere Analysenzeiten ermöglicht.
- Der Lösungsmittelverbrauch sinkt aufgrund des geringen Kapillarvolumens.
- Es sind nur kleine Probenmengen erforderlich.

JORGENSEN beschäftigte sich unter anderem mit der theoretischen Beschreibung von kapillarelektrophoretischen Trennungen [6-8]. Seine Arbeiten werden deshalb häufig als Beginn der Kapillaronenelektrophorese bezeichnet. Mittlerweile ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden unter dem Oberbegriff der Kapillarelektrophorese (CE) entwickelt worden. Einige sollen im Folgenden erläutert werden [9, 10].

Kapillaronenelektrophorese

Die Kapillaronenelektrophorese (CZE) ist die am weitesten verbreitete Methode in der Kapillarelektrophorese. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten geladener Analyten in einem konstanten elektrischen Feld ($\sim 500 \text{ V/cm}$). Auch alle anderen Parameter wie Pufferstärke, pH-Wert usw. werden bei den Messungen konstant gehalten. Neutrale Teilchen lassen sich mit dieser Methode nicht auftrennen.

Micellare Elektrokinetische Chromatographie

Die Micellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) wurde 1984 von TERABE entwickelt [11]. Unter Zuhilfenahme eines Micellenbildners wird eine pseudostationäre Phase gebildet, die eine Trennung von neutralen und geladenen Analyten ermöglicht. Bei der MEKC handelt es sich um eine sehr leistungsstarke Analysenmethode, die allerdings eine Kopplung mit einem massenspektrometrischen Detektor (MS) erschwert. Die Micellenbildner wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS) verschlechtern die Ionisierung der Analyten erheblich, und es kommt zudem zu Verunreinigungen der MS-Quelle.

Kapillargelelektrophorese

Die Kapillargelelektrophorese (CGE) wird eingesetzt, um biologische Proben aus einer komplexen Matrix zu untersuchen. Sie ist eine der wichtigsten Analysemethoden in der Biochemie und der Molekularbiologie. Durch Automatisierung und Entwicklung von Multikapillar(Array)-Systemen konnte der Probendurchsatz dieser Methode stark erhöht

werden. Dadurch wurde es beispielsweise möglich, das menschliche Genom wesentlich schneller als erwartet zu sequenzieren [12].

Kapillare Isoelektrische Fokussierung

Bei der Kapillaren Isoelektrischen Fokussierung (cIEF) wird in der Kapillare mit Hilfe eines Ampholyten ein pH-Gradient aufgebaut. Nach Anlegen einer Spannung werden Proteine abhängig von ihrem isoelektrischen Punkt im entsprechenden pH-Bereich fokussiert. Auch hier wurden die ersten Experimente Mitte der 80er Jahre durchgeführt. Pionier auf diesem Feld war HJERTÉN [13-15]. Die cIEF ist eine Methode mit sehr hoher Trenneffizienz [16].

Kapillarelektrochromatographie

Bei der Kapillarelektrochromatographie (CEC) handelt es sich um eine Hybridmethode aus HPLC und CE (siehe Abb. 1.1). Kapillaren werden mit verschiedenen stationären Phasen gefüllt, jedoch wird der Eluent nicht mit Hilfe einer Pumpe gefördert, sondern durch das Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Trennung wird nun, analog zur HPLC, durch unterschiedliche Verteilung der Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase erreicht. Zusätzlich können bei geladenen Ionen unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten zur Trennung beitragen [17]. Im folgenden Kapitel wird die CEC ausführlicher behandelt.

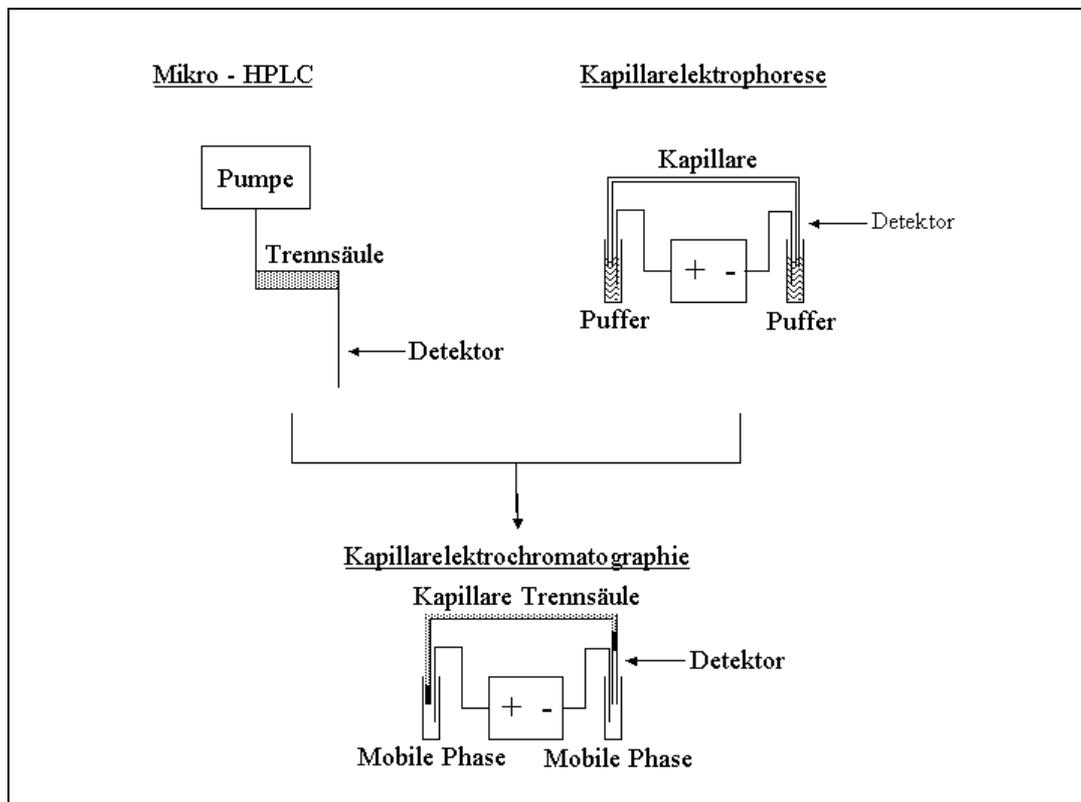


Abb. 1.1: CEC als Hybridmethode aus μ -HPLC und CE

1.1 Kapillarelektrochromatographie (CEC)

Die Bandenverbreiterung in der HPLC kann durch stationäre Phasen mit geringeren Partikeldurchmessern reduziert werden. Dadurch werden immer kleinere Bodenhöhen erreicht [18]. Der Einfluss der Partikelgröße auf die Trennleistung eines Systems ergibt sich aus der van-Deemter Gleichung. Danach haben, vereinfacht dargestellt, kleine Partikel eine geringere Diffusion der Analyten im Trennsystem zur Folge. Jedoch ist auch hier eine technische Grenze vorhanden, da der Gegendruck von Partikeln im Submikrometer-Bereich zu groß wird. Alternativ kann die mobile Phase nicht mit Druck, sondern mit Strom durch die Kapillare befördert werden. Bereits 1974 verglich PRETORIUS die Bodenhöhen von druckgetriebenen gegenüber elektrisch angetriebenen Systemen [19]. Die Nutzung des elektroosmotischen Flusses als Pumpe führt zu stark verringerten Bodenhöhen, da nicht das für Druck typische parabolische Strömungsprofil entsteht, sondern, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, ein charakteristisches stempelförmiges Profil [20].

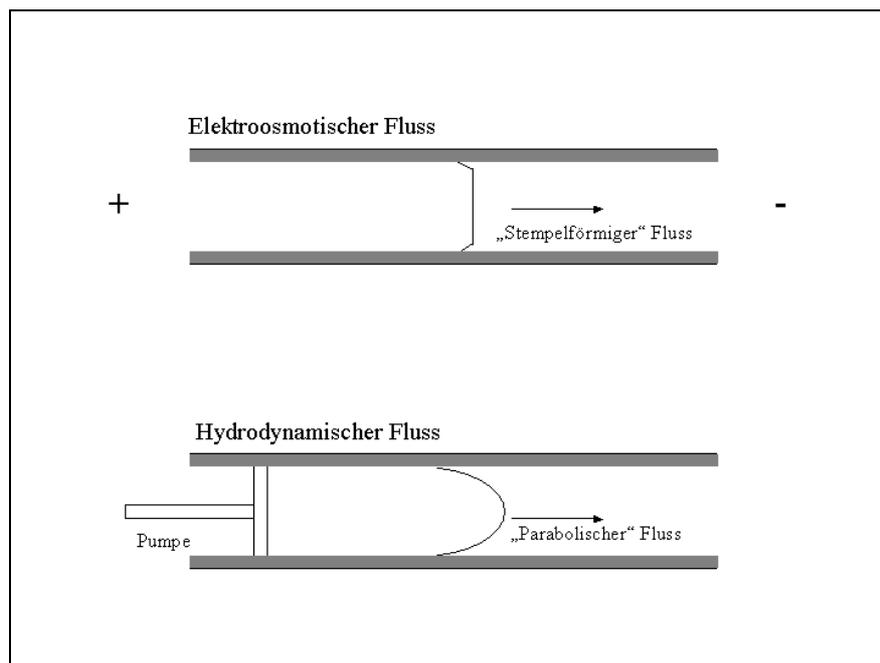


Abb. 1.2: Vergleich der Strömungsprofile in CEC und HPLC

1981 zeigten JORGENSON und LUKACS die Trennung von 9-Methylantracen und Perylen [7]. Sie verwendeten dazu eine Kapillare (I.D. 170 μm), die mit Kieselgelpartikeln (Partikeldurchmesser 10 μm , Octadecylsilan modifiziert) gepackt war. Dies kann als Geburtsstunde der CEC aufgefasst werden.

Seit dieser Zeit wurde die Forschung auf diesem Gebiet enorm ausgeweitet, da aufgrund der Tatsache, dass der Gegendruck keine Rolle spielt, sehr kleine Packungsmaterialien eingesetzt

werden können. Zusätzlich können unter Hinnahme von verlängerten Analysezeiten deutlich längere Säulen als in der HPLC verwendet werden. Man erhält so eine wesentlich größere Anzahl an effektiven Böden und ermöglicht damit gute Trennleistungen. Ein Problem stellt jedoch bis heute die Herstellung der Säulen dar, so dass die CEC immer noch nicht in ihrem gesamten Potential genutzt werden kann. Da der prinzipielle Aufbau der CEC dem der klassischen CE gleich ist (Abb. 1.1), können die Messungen mit kommerziell erhältlichen CE-Geräten durchgeführt werden. Anstelle der freien Kapillaren werden jedoch Kapillaren entweder gepackte oder oberflächenmodifizierte Kapillaren verwendet. Bei den Packungen handelt es sich um Partikel wie sie aus der HPLC bekannt sind, die je nach Anwendung unterschiedlich oberflächenmodifiziert sind. Bei den oberflächenmodifizierten Kapillaren wird Analog zur GC eine funktionelle Gruppe an die Oberfläche der freien Kapillare synthetisiert.

Die meisten beschriebenen Anwendungen nutzen partikulär gepackte Kapillaren mit HPLC-typischen Phasen [21]. Bei diesen Kapillaren hat man zwei Bereiche, einen gepackten und einen nicht gepackten Teil. Der nicht gepackte Teil an der Auslass-Seite (outlet) dient der Detektion, da die vom Packungsmaterial verursachte Lichtstreuung eine optische Detektion erheblich erschweren würde. Um eine Verbreiterung des Signals nach der Trennung zu vermeiden, wird möglichst nah am Packungsende detektiert. Diese zweigeteilten Kapillaren werden „Duplex“-Kapillaren genannt und nur dann verwendet, wenn in der Kapillare (on-column) detektiert werden soll, nicht aber bei Kopplungen mit off-column-Detektoren wie zum Beispiel einem Massenspektrometer.

Ein zweiter Weg ist die Verwendung von monolithischen Säulen, welche auf der gesamten Kapillarlänge eine stationäre Phase in Form eines Polymers enthalten [22]. Diese Polymere werden unter Freilassung eines Detektionsfensters (z.B. durch Abdecken desselben mit Aluminiumfolie während der Durchführung einer UV-induzierten Polymerisation) *in situ* in der Kapillare gebildet. Je nach Anwendung können verschiedenste Monomere zur Reaktion eingesetzt werden, was zu einer Vielzahl von möglichen Polymeren und damit zu unterschiedlichsten Einsatzmöglichkeiten führt.

Auch der Gebrauch von freien oberflächenmodifizierten Kapillaren (open tubular) in der CEC ist möglich (OT-CEC) [23]. Die Kapillarwände werden dort ähnlich wie in der GC mit stationärer Phase belegt. Der größte Nachteil der OT-CEC ist die schlechte Nachweisgrenze, da sehr dünne Kapillardurchmesser gewählt werden müssen.

Im Folgenden soll nun auf die theoretischen Hintergründe und die für diese Arbeit bedeutsamen Packungsarten eingegangen werden.

1.1.1 Elektroosmotischer Fluß (EOF)

Aufgrund der Verkleinerung des Querschnitts bis auf die heute üblichen Kapillardurchmesser von 50 – 200 µm muss neben der Wanderung der Ionen im elektrischen Feld nach KOHLRAUSCH [1] ein zweiter Wanderungseffekt, der elektroosmotische Fluss (EOF), berücksichtigt werden. Durch die Verwendung von fused-silica Kapillaren liegt an der Oberfläche aufgrund der dort vorhandenen Silanolgruppen eine pH-abhängige negative Ladung vor. Dies führt zur Anziehung von positiven Ladungen aus dem in der Kapillare befindlichen Elektrolyten. Nach STERN bildet sich eine starre Grenzschicht durch an der Oberfläche adsorbierte Ionen aus (HELMHOLTZ-Schicht), welche von einer diffusen Grenzschicht überlagert wird (die GOÛY - CHAPMAN Schicht). Beim Anlegen einer Spannung entlang der Kapillare wandern die positiven Ionen der diffusen Grenzschicht in Richtung Kathode. Durch die auftretenden Scherkräfte wird der Elektrolyt im Inneren der Kapillare mitbewegt. So kommt es zur Ausbildung eines fast perfekt stempelförmigen Strömungsprofils [24].

Das Potential an der Grenze zwischen starrer und diffuser Grenzschicht wird als Zetapotential (ζ) bezeichnet. Übliche Werte für ζ liegen zwischen 0 und 100 mV, abhängig von der Elektrolytkonzentration und dem pH Wert. ζ nimmt, wie die Ladungsdichte, exponentiell mit der Entfernung von der Kapillarwand ab. Die Dicke der Doppelschicht ist als δ definiert.

Nach Knox [18] berechnet sich δ als:

$$\delta = \sqrt{\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 R T}{2 c F^2}} \quad (1)$$

mit ε_r = Dielektrizitätskonstante des Mediums

ε_0 = Dielektrizitätskonstante des Vakuums

R = universelle Gaskonstante

T = absolute Temperatur

c = molare Elektrolytkonzentration

F = Faraday Konstante

Bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel ($\varepsilon_r = 80$) wird ein δ von 10 nm für eine 0,001 M und 1 nm für eine 0,1 M Elektrolytlösung erhalten.

Zur Beschreibung des EOF dient eine Grundgleichung, welche Anfang 1900 durch VON SMOLUCHOWSKI entwickelt wurde. Seine Theorie beschreibt dabei die Mobilität $\mu_{eo,offen}$ eines Elektrolyten entlang einer geladenen Platte bei vorhandenem elektrischen Feld E als [25-27]:

$$\mu_{eo,offen} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta_W}{\eta} \quad (2)$$

mit ζ_W = Zetapotential an der Kapillarwand

η = Viskosität des Elektrolyten

Dieses Modell ist hinreichend genau für freie Kapillaren. Da aber in der CEC die Kapillare mit vielen Einzelpartikeln gepackt ist, an denen sich Doppelschichten ausbilden, muss hier berücksichtigt werden, dass, wie in Abb. 1.3 gezeigt, die Partikel zur Ausbildung vieler paralleler Mikrokanäle beitragen [28-32].

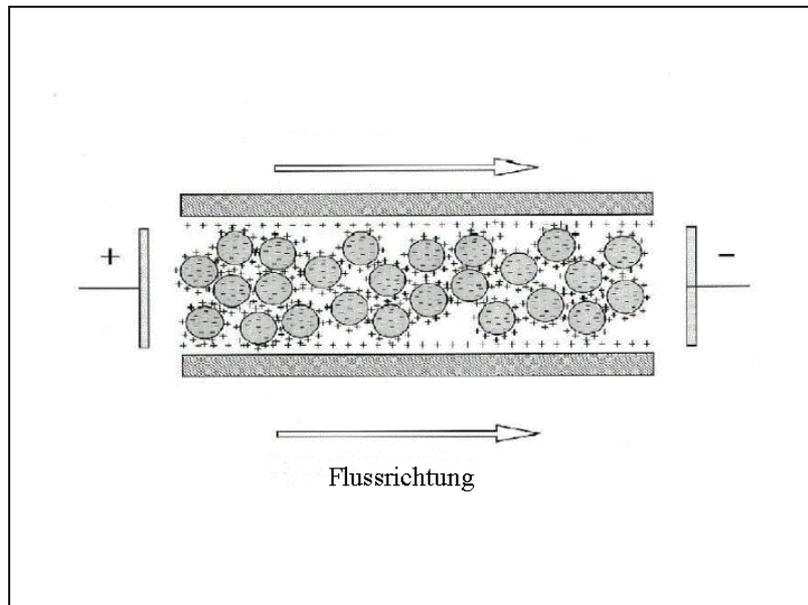


Abb. 1.3: EOF in gepackter Kapillare nach [33]

Unter Berücksichtigung der Packungsdichte, also der Durchlässigkeit der Packung, wurde Gleichung 2 auf Grundlage der Arbeiten von OVERBEEK [27] erweitert und liefert für eine gepackte Kapillare die Mobilität $\mu_{eo,gepackt}$ eines Elektrolyten [31]:

$$\mu_{eo,gepackt} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta_P}{\eta} \cdot \left(\frac{\sigma_{gepackt}}{\sigma_{offen}} \right) \quad (3)$$

mit: ζ_P = Zetapotential an der Partikeloberfläche

$\sigma_{gepackt}$ = Leitfähigkeit der gepackten Kapillare

σ_{offen} = Leitfähigkeit der offenen Kapillare

Dabei ist das Verhältnis der Leitfähigkeiten von gepackter und freier Kapillare leicht messbar und liefert eine Aussage über die Qualität der Packung. Je kleiner der Quotient ist, desto dichter ist die Packung.

Nachfolgend wird erläutert, von welchen Größen der EOF in der CEC abhängig ist [34]. Dazu wird eine Formel abgeleitet, welche die Faktoren, die Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit haben, beschreibt. Im ersten Schritt soll ζ_p aus Gleichung 3 ersetzt werden. Es gilt, dass die Wanderungsgeschwindigkeit direkt proportional zur elektroosmotischen Mobilität ist und somit zum Zetapotential, welches seinerseits von der Ladungsdichte ω abhängig ist:

$$\zeta_p \approx \frac{\delta \omega}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (4)$$

Weiterhin gilt, für die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten im elektrischen Feld:

$$v_{CEC} = \mu_{eo, \text{gepackt}} \cdot E \quad (5)$$

mit v_{CEC} = lineare Geschwindigkeit
 E = elektrische Feldstärke

Die Kombination der Gleichungen 3-5 führt zu:

$$v_{CEC} \approx \delta \frac{\omega E}{\eta} \cdot \left(\frac{\sigma_{\text{gepackt}}}{\sigma_{\text{offen}}} \right) \quad (6)$$

Aus dieser Gleichung wird nun deutlich, dass der EOF von folgenden Faktoren abhängig ist:

- Ladungsdichte an der Oberfläche
- Elektrische Feldstärke
- Dicke der elektrischen Doppelschicht
- Viskosität des Elektrolyten (und damit Temperatur)
- Packungsdichte

Je nach Herstellungsmethode variiert die Oberflächenladung von stationären Phasen, was zu Unterschieden im EOF führt. KNOX und GRANT stellten fest, dass der EOF in gepackten Kapillaren geringer ist als in freien [35]. Dies hat zwei Hauptgründe: Zum einen sind die Kanäle in einem gepackten Bett nicht axial zueinander angeordnet, was nach ihrer Schätzung zu einer Reduzierung des EOF um 40 % führt. Des Weiteren führt die Porosität der Packungsmaterialien zu einer weiteren Reduzierung von bis zu 20 %. Der EOF in einer gepackten Kapillare beträgt somit circa 40 – 60 % des EOFs einer freien Kapillare des gleichen Materials. Diese Annahmen wurden von RATHORE, WEN und HORVATH bestätigt [36]. Interessanterweise spielt die Partikelgröße erst dann eine Rolle, wenn der Teilchendurchmesser sehr klein wird. In diesem Fall können Doppelschichten überlappen. Dies führt zunächst zu einem parabolischen Profil und anschließend zu einem Zusammenbruch des EOF. Theoretische Überlegungen von KNOX [18] zeigen, dass bei den verwendeten Kapillaren von 50 bis 100 μm und einer Elektrolytkonzentration von 0,001 M bis 0,01 M Partikeldurchmesser von $\geq 0,4 \mu\text{m}$ verwendet werden können. Knox nimmt an, dass ein Überlappen der Grenzschichten keine Rolle spielt, solange die Partikeldurchmesser größer oder gleich des vierzigfachen der elektrischen Doppelschicht sind. Eine ausführliche theoretische Betrachtung des EOF gibt der Übersichtsartikel von RATHORE [34].

1.1.2 Vorteile der CEC

Die CEC versucht die Vorteile der HPLC mit denen der CE zu kombinieren. Die HPLC ist eine der meist genutzten Methoden in der Analytik. Durch intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten verfügt der Analytiker heute über eine Vielzahl von verschiedenen Phasen. Aufgrund der unterschiedlichen Wechselwirkungen der Phasen mit verschiedenen Analyten sind die in der HPLC erhaltenen Selektivitäten recht hoch. Verglichen mit der CE ist die Bodenzahl bei der HPLC jedoch relativ gering. Dies liegt an der großen Effizienz der CE, die durch die geringe Diffusion und dem stempelförmigen Strömungsprofil erreicht wird. In der HPLC sind die erreichbaren Bodenhöhen von den verwendeten Partikeldurchmessern abhängig. Je kleiner der Durchmesser, desto kleiner ist auch die Bodenhöhe und umso größer die Bodenzahl. In einem druckgetriebenen System wie der HPLC wird der lineare Fluss wie folgt berechnet [18]:

$$v_{HPLC} = \frac{d^2 \Delta p}{\phi \eta L} \quad (7)$$

mit v_{HPLC} = lineare Geschwindigkeit
 d = Partikeldurchmesser
 Δp = Druckabfall entlang der Säule
 ϕ = Gegendruckfaktor bei gepackten Säulen
 η = Viskosität der mobilen Phase
 L = Säulenlänge

Im Gegensatz dazu berechnet sich die Geschwindigkeit in einem elektrisch angetriebenen System mit Hilfe der Gleichung 6. Es fällt auf, dass nur im druckgetriebenen System eine Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser besteht. So folgt daraus, dass in einem elektrisch angetriebenen System auch sehr kleine Partikeldurchmesser verwendet werden können, ohne dass die lineare Geschwindigkeit beeinträchtigt wird. So zeigten SIEFAR et al. [37], dass bei 1,5 μm Partikeldurchmesser eine Substanz nach 150 Sekunden mit 120.000 Böden eluiert wird. Im Vergleich dazu muss man in der HPLC für 100.000 Böden bei 200 bar und 6 μm Partikeldurchmesser eine Totzeit von 2000 Sekunden veranschlagen [38]. Des Weiteren ist die Signalverbreiterung in der CEC geringer als in der HPLC. HORVATH und LIN [39, 40] fassten für die HPLC die einzelnen Faktoren der Signalverbreiterung zu einer Gleichung für die Bodenhöhe H zusammen. Dies wurde von Dittmann [41] auf die CEC übertragen. Dabei wurde gezeigt, dass der Beitrag der Eddy-Diffusion in der CEC wesentlich geringer als in der HPLC ausfällt. Dies wird bei der Betrachtung der möglichen Weglängen und Kanalgrößen in Packungen deutlich. In einer mit porösem, partikulärem Material gepackten Säule sind die interpartikulären Kanäle wesentlich größer als die intrapartikulären. Daraus ergeben sich unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten für interpartikuläre und intrapartikuläre Strömungen bei druckgetriebenen Systemen. In der CEC ist der EOF beinahe unabhängig vom Kanaldurchmesser, weshalb die Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb und außerhalb der Packung nahezu identisch sind. Deshalb findet in der CEC eine 2,5-fach geringere Bandenverbreiterung als in der HPLC statt. Dies wurde mit Hilfe von NMR-Studien durch TALLAREK [24] bewiesen.

Die geringere Bandenverbreiterung und somit kleineren Bodenhöhen in der CEC basieren also nicht nur auf der Tatsache, dass generell kleinere Packungsmaterialien eingesetzt werden können. Eine Größe, welche die Beurteilung der Bandenverbreiterung auch bei der Verwendung von unterschiedlich großen Packungsmaterialien erlaubt, ist die reduzierte Bodenhöhe h . Es gilt:

$$h = H / d_p \quad (8)$$

mit: h = reduzierte Bodenhöhe
 H = Bodenhöhe
 d_p = Partikeldurchmesser

In der HPLC liegt nach einer Faustregel der optimale Wert für h um zwei. Bei der CEC können für h jedoch Werte von eins und darunter erreicht werden. Diese verbesserten Werte lassen auf einen sehr effizienten Massentransfer schließen [42, 43].

1.1.3 Nachteile der CEC

Ungefähr 90 % aller CEC-Applikationen nutzen Kapillaren mit Packungsmaterialien aus der HPLC. Neben dem Vorteil, dass damit wohldefinierte und charakterisierte Phasen verwendet werden, treten auch einige Nachteile auf. Ein Schwachpunkt dieser gepackten Kapillaren ist ihre Tendenz, während der Messung Gasblasen zu bilden. Diese führen zum Zusammenbrechen des Stromflusses, was gleichbedeutend mit dem Ende der Analyse ist. Die Entstehung solcher Gasblasen kann mehrere Ursachen haben.

Temperaturerhöhung, durch nicht ausreichend abgeführte Joule'sche Wärme, verringert die Löslichkeit von Gasen im Medium. Die Wärmeentwicklung pro Volumeneinheit ist in der CEC ungefähr 1000 mal so groß wie in der HPLC [18], weshalb Kapillaren benötigt werden, die circa um den Faktor 30 kleiner als HPLC Säulen sind (die Joule'sche Wärme ist proportional zum Quadrat des Durchmessers). Ausgehend von der in der HPLC routinemäßig verwendeten Säule mit 4,6 mm Innendurchmesser ergeben sich für die CEC Kapillaren mit einer lichten Weite von 150 μm . Die Problematik der Wärmeentwicklung bei der CEC wurde ausführlich von KNOX behandelt [20].

Gasblasen entstehen oftmals auch an der Grenze zwischen gepacktem und nicht gepacktem Bereich innerhalb einer Kapillare. Wahrscheinlich kommt es hier durch EOF-Unterschiede zu Turbulenzen, was zu Druckdifferenzen und einem Ausgasen der Lösung führt. Dies kann durch sorgfältiges Entgasen des Puffers und durch Applikation eines Überdruckes (bis 12 bar) auf Ein- und Auslassgefäß reduziert werden [44].

Darüber hinaus ist die reproduzierbare Erzeugung von Packungen äußerst schwierig. Selbst mit Erfahrung sind Abweichungen von 5 bis 22 % zu erwarten [45-47]. Die Abhängigkeit der Eddy-Diffusion von der Packungsdichte und der Packungsgröße, von KNOX als Qualität der Packung bezeichnet [47, 48], dient hierbei als Vergleichsgröße.

In der CEC können aufgrund der kleinen Volumina keine externen Fritten verwendet werden, weshalb meistens eine Fritte in die Kapillare „gesintert“ wird. „Sintern“ ist ein Begriff aus der Pulvermetallurgie. Er beschreibt einen Prozess, bei dem Pulver verfestigt wird, indem es

auf dreiviertel der Schmelztemperatur erhitzt wird. Dadurch verliert es seine Korngrenzen und bildet ein zunächst loses Netzwerk, welches mit der Zeit immer dichter wird. Aufgrund der Analogie des Prozesses bei der Herstellung der internen Fritten in der CEC wird der Begriff hier übernommen. Beim Sintern entstehen aufgrund einer kurzzeitigen Überhitzung, z. B. mit Hilfe eines angelegten Widerstanddrahtes, Si-O-Si-Brücken zwischen den einzelnen Partikeln und der Kapillarwand. Je nach Dauer und Temperatur entsteht so eine etwa 5 mm breite interne Fritte mit zeitabhängiger Festigkeit. Bei zu kurzen Heizzeiten ist die Fritte sehr porös, gut durchlässig, aber instabil. Bei zu langen Behandlungen kommt es durch einen geschmolzenen Block zu einer Verstopfung der Kapillare. Zeitdauer und Temperatur des „Sinterns“ sind vom Packungsmaterial abhängig. Beim häufigen Wechseln von Packungsmaterialien müssen die verwendeten Parameter immer wieder neu optimiert werden, um stabile Fritten zu erhalten.

1.1.4 Verschiedene Säulen in der CEC

In der CEC unterscheidet man grundsätzlich zwischen offene und gepackte Kapillaren. Gepackte Kapillaren können in mit Partikeln gefüllte (partikuläre) und monolithische Kapillaren unterteilt werden. Welche Kapillare eingesetzt wird, hat einen großen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit, die Möglichkeiten und auch die Probleme der Methode. Des weiteren unterscheidet sich die Herstellung der Kapillaren fundamental, weshalb nachfolgend auf die verschiedenen Arten genauer eingegangen werden soll.

1.1.4.1 Open-Tubular-Kapillaren

Die OT-CEC hat viele Ähnlichkeiten mit der GC. Die stationäre Phase ist hier an der Kapillarwand immobilisiert und kann mit verschiedensten Techniken (Adsorption [49], kovalente Bindung [50], Sol-Gel [51] und andere Verfahren [52]) appliziert werden.

Auch wenn die OT-Kapillaren eine Alternative zu gepackten CEC-Kapillaren darstellen, so ist der größte Nachteil jedoch das geringe Verhältnis von stationärer zu mobiler Phase. Die Oberfläche der Kapillaren bleibt auch nach Behandeln der Kapillarwand wie dem Ätzen gering. Seit der ersten OT-CEC-Analyse von Aromaten mit Octadecyl-modifizierten Kapillaren (ID=30 µm) durch TSUDA [53] wurden Herstellung und Applikation der OT-Kapillaren intensiv untersucht. DITTMANN und ROZING haben vor kurzem die theoretischen Überlegungen mit den experimentellen Beobachtungen in der OT-CEC verglichen [54]. Einen aktuellen Übersichtsartikel zum Fortschritt auf diesem Gebiet bietet KAPNISSI-CHRISTODOULOU [55].

1.1.4.2 Gepackte Kapillaren

Die gepackten Kapillaren werden in der CEC am häufigsten eingesetzt [21, 56]. Meist handelt es sich dabei um Kapillaren, bei denen Material mit einem Partikeldurchmesser zwischen 1,5 und 5 μm als stationäre Phase verwendet wird. Der Vorteil besteht darin, dass es sich um wohl definierte Phasen handelt, deren Eigenschaften bekannt sind. Eine zweite Art wird monolithische Kapillaren genannt. Bei diesen Kapillaren wird ein Polymer *in situ* in der Kapillare gebildet. Durch die Gleichmäßigkeit der Packung und damit auch des EOF entstehen in monolithischen Systemen seltener Luftblasen. Ein Zurückhalten der stationären Phase mit Fritten ist nicht mehr erforderlich, wodurch die Herstellung erleichtert wird. Aus diesen Gründen werden monolithische Kapillaren als Alternative zu partikulär gepackten Kapillaren gesehen [57, 58].

Partikulär gepackte Kapillaren

Die Partikel erfüllen in der CEC zwei Aufgaben. Zum einen sind sie für die Trennung verantwortlich, indem sie über ihre Funktionalität (z.B. C_{18} -Gruppen) mit dem Analyten in Wechselwirkung treten. Zum anderen ist jedoch auch wesentlich, dass sie einen ausreichend großen EOF erzeugen. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, entstehen an den freien Silanolgruppen der Partikel elektrische Doppelschichten, die bei Anlegen einer Spannung einen EOF hervorrufen. Bei den meisten Packungsmaterialien auf Silika-Basis ist dieser EOF, wie auch in der freien Kapillare, zur Kathode gerichtet. Es ist zu beobachten, dass Phasen, welche nicht oberflächendeaktiviert sind (z.B. Spherisorb-ODS 1 oder Hypersil), einen zufrieden stellend großen EOF liefern [32]. Vollständig oberflächendeaktivierte Phasen (endcapped) sind dagegen für die CEC ungeeignet. Das liegt daran, dass die Oberfläche der Partikel wesentlich größer ist als die der Kapillarwand, und der EOF hauptsächlich von der stationären Phase erzeugt wird.

Problematisch ist die Verwendung von Silika-Phasen bei niedrigen pH-Werten und neutralen Analyten, da aufgrund der Protonierung der Silanol-Gruppen der EOF drastisch reduziert wird. In solchen Fällen können so genannte Mixed-Mode-Phasen eingesetzt werden, welche zusätzlich zur trennenden Funktionalität (z.B. C_{18} -Gruppen) noch Sulfonsäuregruppen enthalten. Diese sind auch bei niedrigen pH-Werten negativ geladen und erzeugen einen ausreichend großen EOF [59].

Der EOF kann in der CEC – wie auch in der CE – umgekehrt werden, um eine anodische Detektion zu ermöglichen. Zu diesem Zweck benötigt man eine positive Ladung auf der Oberfläche der stationären Phase und – idealerweise – auch auf der Kapillarwand. Der EOF

bildet sich dann wie bisher beschrieben in Richtung Anode aus. Man erreicht diesen Effekt zum Beispiel durch Einsetzen so genannter „polar embedded“ Phasen, welche oberflächennah eine Aminogruppe in ihrer Alkylkette besitzen oder durch starke Anionentauscher [60]. Der Übersichtsartikel von EELTINK et al. [21] gibt einen sehr guten Überblick der eingesetzten Phasen und Anwendungsgebiete.

Die häufigste Methode Kapillaren zu packen, beruht auf einer Aufschlämmung (Slurry) des Packungsmaterials. Diese Slurry wird mit hohem Druck (ca. 600 bar) in die Kapillare eingebracht [61]. Das Packen gelingt auch mit Hilfe von superkritischem CO₂ [62, 63], Zentrifugalkräften [64, 65] und Elektrokinetik [66]. Die einzelnen Packungstechniken werden im Übersichtsartikel von COLON et al. verglichen [29].

Wie bereits unter den Nachteilen der CEC aufgeführt, kommt es gerade bei den partikulär gepackten Kapillaren aufgrund der Fritten immer wieder zur Luftblasenbildung, welche die Analysen im schlimmsten Fall unmöglich macht. Partikuläre Packungen werden deshalb meistens nur in Systemen eingesetzt, bei denen auf Ein- und Auslassgefäß ein Druck angelegt werden kann.

Monolithische Kapillaren

Unter Freihaltung eines Detektionsfensters wird in der Kapillare *in situ* ein polymeres Netzwerk gebildet, welches als stationäre Phase dient. In der Literatur ist eine Vielzahl von Monolithen beschrieben worden, die sich durch ihre Anwendung (z.B. Festphasenextraktion oder Trennung) oder die eingesetzten Monomere unterscheiden. Es werden z.B. Monolithen auf Polysaccharidbasis, Acrylamidbasis oder auch auf Silikabasis verwendet. Im Folgenden sollen die für diese Arbeit relevanten Formen beschrieben werden. Die Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Für umfassende Informationen sei auf das Buch „Monolithic Materials“ von SVEC hingewiesen [67].

Sol-Gel-Kapillaren

In Wasser lösliche Silikaderivate kondensieren unter Ausbildung einer festen Silikastruktur (Gel). Bei der Herstellung von Kapillaren, die unter Zuhilfenahme dieses Sol-Gel-Prozesses hergestellt werden, können zwei verschiedene Wege beschritten werden. So kann das Gel einen kontinuierlichen Monolithen auf Silikabasis in der Kapillare bilden, welcher zur stationären Phase derivatisiert wird (z.B. C₁₈-Ketten) [68, 69], oder das Gel wird als Matrix genutzt, in welche übliche, aus der HPLC bekannte, stationäre Phasen eingefügt werden [70].

Die Herstellung der Kapillaren für Monolithen nach dem Sol-Gel-Verfahren mit anschließender Derivatisierung erfolgt vereinfacht nach folgendem Schema:

Zunächst wird eine hydrolytische Polykondensation von Tetra-Alkoxysilanen (z.B. Tetramethoxysilan) in Gegenwart eines sauren Katalysators (z.B. wässrige Essigsäure) und eines wasserlöslichen Polymers als Porogen (z.B. Polyethylenglykol) durchgeführt [71, 72]. Bei dieser Reaktion kommt es durch Hydrolyse zur Bildung von Silanol-Gruppen, über die Siloxan-Oligomere und schließlich Polymere entstehen. Zusammenfassungen zu diesem Thema finden sich in den Übersichtsartikeln von TANAKA et al. [73, 74]. Nachdem der Monolith hergestellt wurde, erfolgt die Derivatisierung (beispielsweise mit Dimethyloctadecylchlorosilan, für eine RP-18-Phase), um die gewünschte Funktionalität zu erhalten [75]. Das Polymer bietet eine große Anzahl von Derivatisierungsmöglichkeiten, so dass auch auf einfache Weise die Richtung des EOF beeinflusst werden kann. Der Zusatz einer Base zum Reaktionsgemisch erhöht dabei die Ausbeute des reaktiven Intermediates, welches durch das Chlorsilan gebildet wird [75, 76].

Man unterscheidet zwei Arten von Poren im fertigen Monolithen, deren Größe im letzten Schritt optimiert wird. Die Makroporen, welche den Monolithen durchziehen, sind für eine gute Permeabilität verantwortlich. Die bei der Herstellung aus Mikroporen entstehenden Mesoporen sind notwendig, um eine große Oberfläche für maximale Wechselwirkungen bzw. um ein maximales Phasenverhältnis zwischen mobiler und stationärer Phase zu erhalten. Während die durchgängigen Makroporen durch die Bedingungen während der Kondensation beeinflusst werden, können die Mesoporen im Monolithen durch Austausch der flüssigen Phase modifiziert werden [77]. Wenn eine Lösung mit einem pH-Wert größer acht verwendet wird, so werden aus bereits vorhandenen Mikroporen Mesoporen. Diese Mesoporen besitzen dann einen Durchmesser von ca. 10 nm [77]. Dabei ist es entscheidend, dass die Lösung einen genau definierten und optimierten Zeitraum einwirkt, da bei zu langer Verweildauer dieser Lösung die Mesoporen zu groß werden und somit letztendlich wieder eine unerwünschte Oberflächenreduzierung stattfindet [75].

Derzeit werden nur wenige CEC-Applikationen mit dieser Phase durchgeführt. In der HPLC dagegen wird sie wesentlich häufiger eingesetzt [78].

Eine weitere Verwendungsmöglichkeit des Sol-Gel-Verfahrens liegt in der Immobilisierung der stationären Phase (z.B. 5 µm ODS 1-Partikel). Diese Kapillaren werden dann auch als „particle loaded“ bezeichnet [79]. Sie werden entweder mit einer Slurry gefüllt, welche aus den Sol-Gel-Ausgangssubstanzen und dem Packungsmaterial besteht [80] oder mit der gewünschten stationären Phase gepackt und anschließend mit den Sol-Gel-Monomeren gespült [63].

Das fertige Netzwerk verfügt über Poren, die groß genug sind, um eine Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Analyten zu ermöglichen, die Partikel selbst aber

unbeweglich einschließen [79]. Für einen Übersichtsartikel zu dieser Art von Kapillaren sei auf die Arbeit von ALLEN und EL RASSI verwiesen [79].

Monolithen auf der Basis von wasserlöslichen Acrylamid-Monomeren

Ursprünglich begann HJERTÉN mit der Herstellung von HPLC-Säulen auf diesem Gebiet [81]. Die Polymerisierung beruht auf der wässrigen Lösung eines Divinyl-Monomers (Vernetzer), eines Monovinyl-Monomers und eines Initiators. Der Nachteil bei diesem Verfahren ist, dass das Material hinterher schrumpft und so Totvolumina entstehen. Bei der Verwendung dieser HPLC-Säulen muss deshalb die stationäre Phase nach dem Schrumpfen zunächst komprimiert werden. Dadurch werden eventuell entstandene Hohlräume zur Säulenwand wieder geschlossen.

Bei der CEC wird die Polymerisierung in einer mit 3-trimethoxysilylpropyl-Methacrylat (Bindesilan) beschichteten Kapillare durchgeführt [67]. Das Bindesilan wird unter Freisetzung von Methanol kovalent an der Glasoberfläche gebunden. Die Methacrylliganden sind in der Lage, während der Polymerisation mit den Monomeren ein Copolymer zu bilden, wodurch ein Schrumpfen verhindert wird [82]. Dafür muss bei der CEC im Gegensatz zu Anwendungen in der HPLC noch ein Ladungsträger eingebracht werden, der zur Generierung des EOF beiträgt. Hier liegt einer der Vorteile der wasserlöslichen Monomere. Es ist kein Problem, in die Monomerenmischung geladene oder stark polare Substanzen einzubringen und so eine gleichmäßige Oberflächenladung im Monolithen zu erzeugen. Als Ladungsträger wird in den meisten Fällen Vinylsulfonsäure eingesetzt [67]. Die Porosität des Polymers wird mit Hilfe eines Salzes wie z.B. Ammoniumacetat eingestellt. Mit steigender Konzentration des Salzes wird die Porosität größer [83].

Die Wahl der Monomere bestimmt natürlich die Selektivität der stationären Phase. Eine ausführliche Studie zu den Eigenschaften der Monomeren und den Konsequenzen für die spätere Selektivität wurde von PETERS et al. durchgeführt [84, 85]. Dabei wurde die Trennung verschiedener Benzole unter Einsatz von Copolymeren aus Ethylendimethacrylat (EDMA) und Butylmethacrylat untersucht. Für die Selektivität der Kapillaren ist darüber hinaus die Struktur und Morphologie des Polymers von großer Bedeutung. Von HOEGGER und FREITAG wurden deshalb Versuche zur Strukturbildung der Polymere durchgeführt, bei denen der Einfluss der prozentualen Anteile einzelner Monomere untersucht wurde [83]. Eine Zusammenfassung über die Eigenschaften von Monolithen auf Acrylamid-Basis wurde von den gleichen Autoren veröffentlicht [86].

Die Vielfalt der einsetzbaren Monomere und die individuelle Zusammensetzung für die jeweilige Fragestellung macht eine erschöpfende Aufführung nicht möglich. Zum Einstieg sei auch hier auf das Lehrbuch „Monolithic Materials“ [67] verwiesen.

Molecular Imprinting Polymer – Kapillaren (MIP-Kapillaren)

Unter „Molecular Imprinting“ versteht man die Herstellung von Polymeren, welche eine individuell festlegbare Selektivität zeigen. Dabei wird ein Polymer in Gegenwart des späteren Analyten (Templat) erzeugt. Bei Wahl geeigneter Monomere bildet sich ein Netzwerk um den Analyten, und es entstehen hoch selektive Bindungsstellen für diese Substanz. Nach Ausspülen des Templaten erhält man eine chromatographische Phase mit hoher Selektivität. So können die MIPs selektiv für ein Enantiomer, eine bestimmte Substanz oder eine ganze Substanzgruppe hergestellt werden. Die meisten MIP-Studien haben sich mit chiralen Trennproblemen beschäftigt. Unter anderem wurden Arzneimittel [87, 88], Aminosäurederivate und auch Zucker getrennt [89-91].

Molecular Imprinting in seiner heutigen Form wurde 1970 von TAKAGISHI und KLOTZ [92] sowie WULFF und SARHAN [93] entwickelt. Sie berichteten in ihren Veröffentlichungen von der Möglichkeit, ein „Chemisches Gedächtnis“ in synthetischen Polymeren zu erzeugen. WULFF zeigte in den folgenden Arbeiten die Möglichkeit, MIPs unter Bildung von kovalenten Bindungen zwischen stationärer Phase und Analyten zu nutzen. Anfang der 80er Jahre führte die Gruppe um MOSBACH eine MIP-Methode mit nicht kovalenten Bindungsstellen ein [94]. Dabei entsteht die Selektivität aufgrund von nicht-kovalenten Wechselwirkungen wie zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen oder hydrophoben Wechselwirkungen. Diese Entwicklung weitete das Anwendungsgebiet der MIPs drastisch aus, da die Zahl der erfassbaren Analyten wesentlich vergrößert wurde. Eine dritte Methode nutzt Wechselwirkungen zwischen Metallionen und Chelaten [95]. In der CEC wird aber nur der Weg von MOSBACH, Trennungen über nicht-kovalente Wechselwirkungen zu erreichen, genutzt.

Zur Herstellung der Kapillaren für die CEC wird eine komplexe Monomerenmischung eingesetzt. Ein Schema zur Herstellung der MIP Kapillaren ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Die Monomerenmischung enthält den Templaten, funktionelle Monomere und den Vernetzer, die in einem unpolaren Lösungsmittel gelöst sind. Um eine gute Durchlässigkeit des entstehenden Polymers zu erhalten, wird noch ein Porogen hinzugefügt. Dabei muss das entstehende Polymer unlöslich im Porogen sein, während das Porogen die Wechselwirkungen zwischen Templat und funktionellem Monomer nicht beeinflussen soll. In der Mischung bilden die funktionellen Monomere mit den Templaten Komplexe. Die Stärke dieser

Komplexe entscheidet über die Selektivität der MIP-Kapillare, weshalb die Wahl geeigneter funktioneller Monomere sehr wichtig ist. Das funktionelle Monomer muss also in der Lage sein, nicht-kovalente Bindungen mit dem Templaten einzugehen. Am häufigsten finden Methacrylsäure (MAA) oder Vinylpyridin Verwendung. Als Vernetzer werden oft Ethylenglykol-dimethacrylat (EDMA) oder Trimethylolpropan-trimethacrylat (TRIM) genutzt. Als Porogen dient häufig iso-Oktan. Die Mischung wird dann mit einem thermo- oder photolabilen Radikalstarter (z.B. 2,2'-Azobisisobutyronitril) versetzt und in die Kapillare gefüllt. Die Verwendung eines photolabilen Radikalstarters hat den Vorteil, dass bei niedrigen Temperaturen (-20°C) polymerisiert werden kann. Es wurde gezeigt, dass dies einen großen Einfluss hat und bei -20 °C reproduzierbar Kapillaren mit höherer Selektivität entstehen als bei Raumtemperatur [96-98]. Die Kapillaren werden deshalb zunächst gekühlt und anschließend während der Reaktionszeit mit einer UV-Lampe bestrahlt. Die verwendeten Kapillaren müssen dementsprechend UV-durchlässig sein, was die Verwendung von beispielsweise Teflon-ummantelten Kapillaren bedingt. Die Zeit bis zur vollständigen Polymerisation beträgt zwischen 1 und 24 Stunden.

1.1.5 Detektionsarten in der CEC

Die Qualität einer analytischen Trennmethode wird nicht nur durch ihre Trenneffizienz beschrieben. Wichtige Kriterien sind die Empfindlichkeit und die Nachweisgrenze. Spektrophotometrische Detektionen, wie UV/VIS oder Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF), werden in der CEC am häufigsten genutzt. Die Limitationen bei Detektionen in der CEC wurden von DITTMANN et al. diskutiert [99].

1.1.5.1 CEC-UV/VIS

Beim UV/VIS-Detektor strahlt das Licht durch den Teil der Kapillare, bei der zuvor die Polyimidschicht entfernt wurde. Das Entfernen der Polyimidschicht macht die Kapillaren zerbrechlich. Davon abgesehen hat die UV/VIS Detektion zwei Nachteile, eine geringe Sensitivität und die Notwendigkeit chromophorer Gruppen bei der direkten UV-Detektion. Die geringe Sensitivität entsteht durch die eingesetzte online-Detektion und der dabei vorhandenen geringen Weglänge der „Zelle“. Die Detektion findet meistens nach der Fritte statt, obwohl REBSCHER und PYELL trotz unruhiger Basislinie die mögliche Detektion im gepackten Bereich der Kapillare zeigten [101]. Um die Sensitivität zu verbessern, können zur Vergrößerung der Weglänge die aus der CE bekannten Bubble- und Z-Zellen eingesetzt werden [102]. Durch Zugabe von Nitrat zum Eluenten können Analyten ohne chromophore

Gruppe indirekt detektiert werden. HILDER et al. konnten eine Trennung von anionischen Substanzen mit indirekter Detektion bei 214 nm realisieren [103]. Jedoch bereitet die indirekte Detektion bei vielen analytischen Fragestellungen enorme Probleme [104].

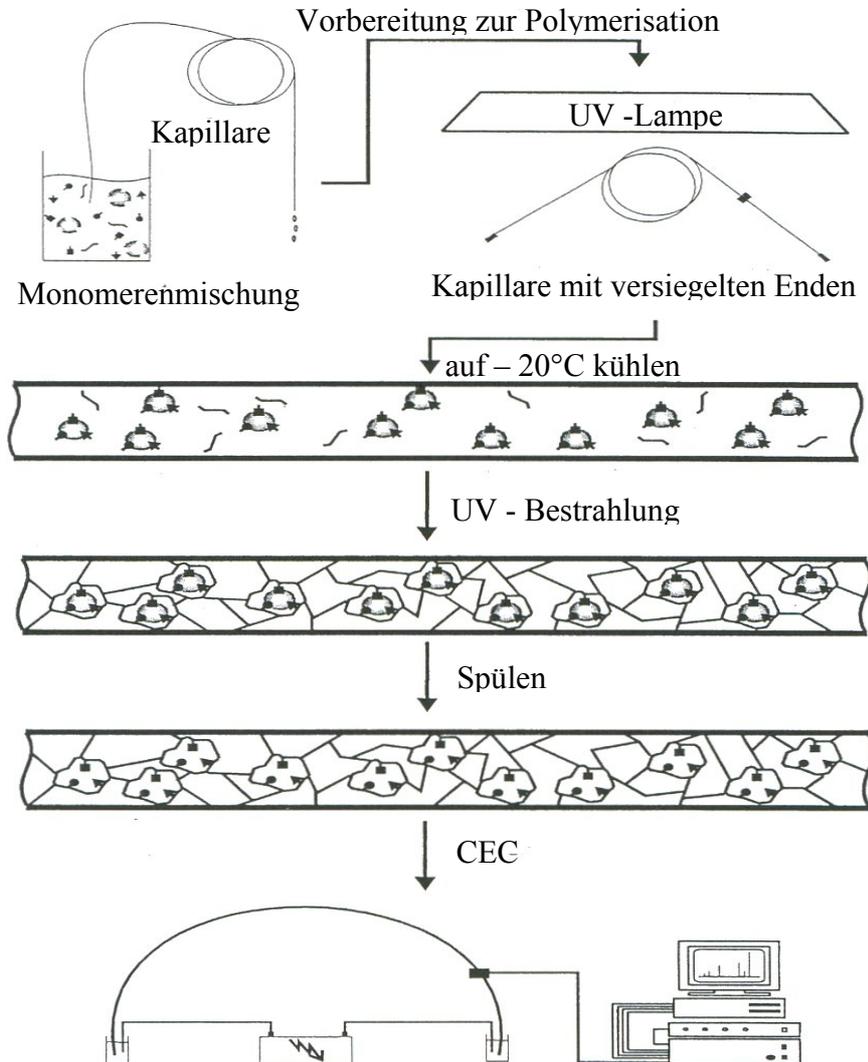


Abb. 1.4: Schema zur Herstellung eines MIP-Monolithen nach [100]

1.1.5.2 CEC-LIF

Die Fluoreszenzdetektion ist selektiver und sensitiver als die UV/VIS-Detektion. Die Fluoreszenz unterliegt nicht dem Lambert-Beerschen-Gesetz, weshalb eine Erhöhung der Intensität, beispielsweise durch Verwendung eines Lasers (laser-induzierte Fluoreszenz) als Lichtquelle, eine erhöhte Sensitivität ergibt. Die Leistungsfähigkeit der CEC in Kombination mit der laser-induzierten Fluoreszenz zeigten YAN et al., die 16 PAKs in 10 Minuten nach isokratischer Trennung detektierten und unter Ausnutzung der nativen Fluoreszenz bei 257 nm Nachweisgrenzen von 10^{-9} bis 10^{-11} M erreichten [105]. Da aber nur wenige Analyten eine nutzbare native Fluoreszenz besitzen, ist oftmals eine Derivatisierung des Analyten mit

einer fluoreszenz-aktiven Gruppe nötig. Dies kann die Analytik hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und des Probendurchsatzes sehr aufwendig machen.

1.1.5.3 CEC-MS

Seitdem es gelungen ist, Analyten aus Flüssigphasen zu ionisieren, entwickelte sich das Massenspektrometer (MS) zu einer starken Detektionsmethode. Das MS ist für die Kopplung mit kapillarelektrophoretischen Trennmethode ideal, da hier die Nachteile der geringen Sensitivität und der Notwendigkeit chromophorer Gruppen nicht vorhanden sind. Die zur Kopplung mit der CEC eingesetzten Ionisierungsmethoden werden als Atmospheric Pressure Ionisation (API)-Methoden bezeichnet. API-Methoden sind beispielsweise die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) [106], das Continuous Flow Fast Atom Bombardment (CF-FAB) [107] die Atmospheric Pressure Photo Ionisation (APPI) und die Electrospray Ionisation (ESI) [108].

Wenn neutrale Substanzen kapillarelektrophoretisch getrennt werden sollen, so stehen die MEKC und als mögliche Alternative die CEC, zur Verfügung. Bei der MS-Kopplung kann jedoch die MEKC nur unter großen Einschränkungen verwendet werden. Die in der MEKC eingesetzten Mizellenbildner stören bei der Spraybildung, reduzieren die Ionisierungseffizienz und belasten durch Ablagerung in der Quelle das MS [109].

Generelle Überlegungen zur Kopplung der CEC mit der MS

Die CEC-MS-Kopplung ist komplizierter als die HPLC-MS-Kopplung. Die CEC benötigt eine elektrische Verbindung am Auslassende der Kapillare, um einen geschlossenen Stromkreis herzustellen. Bei längeren Trennungen kann es zusätzlich zu einer Verarmung an Elektrolyten innerhalb der Kapillare kommen [110].

Wie bereits diskutiert, stellen in partikulär gepackten Kapillaren oftmals die Auslassfritten den Ursprungsort für Luftblasen dar [35]. Das Anlegen eines externen Druckes, wie bei den spektralphotometrischen Messungen, ist bei der Kopplung mit der MS nicht möglich.

Als MS-Detektor wurden bereits verschiedene Systeme genutzt: doppelt fokussierende Sektorfeld-Systeme [111], Ionen-Cyclotron-Resonanz- [112], Ionenfallen- [113], Quadropol- [114] und Flugzeit (TOF)-Spektrometer [115], wobei die beiden letztgenannten am häufigsten eingesetzt werden. Das Quadropol-MS bewährt sich wegen seiner geringen Kosten und Robustheit und das TOF-MS ist wegen der schnellen Scanrate gut geeignet. Dies ist bei den schmalen Peaks in der CE und CEC von Bedeutung.

CEC-API-Interfaces

Die ersten CEC-MS-Kopplungen wurden mit Hilfe des Continuous Flow Fast Atom Bombardment (CF-FAB) realisiert [111, 116]. Diese Technik wird aber nicht mehr eingesetzt, da der hohe chemische Hintergrund dieser Methode besonders bei Massen < 400 Dalton Schwierigkeiten bereitet. Besser geeignet sind ESI, APPI und APCI. Obwohl generell möglich, gibt es zur CEC-APCI-MS Kopplung keine und zur CE-APCI-MS Kopplung nur zwei Veröffentlichungen [117, 118].

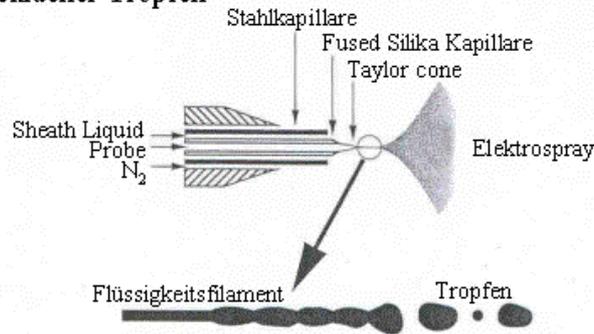
Die wichtigste Quelle bei CEC-MS Kopplungen ist die ESI-Quelle [119]. Der ESI-Prozess besteht aus drei Teilschritten, der Erzeugung geladener Tropfen an der Kapillarspitze des Elektrospray Interfaces, dem Schrumpfen der Tropfen durch Verdampfen des Lösemittels und der Ausstoß der Ionen in die Gasphase.

Der in mehreren Arbeiten untersuchte Prozess, ist in Abb. 1.5 schematisch dargestellt und lässt sich vereinfacht wie folgt beschreiben [120] :

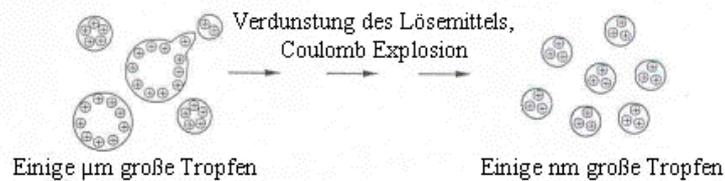
An der Kapillarspitze der Quelle wird eine Spannung im kV-Bereich angelegt, und das entstehende elektrische Feld wirkt auf die Flüssigkeit. Handelt es sich bei der Kapillarspitze um die Anode, werden elektrochemisch negativ geladene Ionen entfernt. Die positiven Ionen wandern zum Meniskus der Flüssigkeit, wo sie sich gegenseitig abstoßen. Dadurch kommt es zu einer Ausdehnung der Oberfläche, was zur Ausbildung der Taylor Cone führt. An der Spitze der Cone bildet sich bei einem entsprechend großen Feld ein feines Spray. Das Spray besteht aus kleinen geladenen Tropfen, deren Ladungsdichte durch verdampfendes Lösemittel stetig steigt. Die Ladung im Inneren des Tropfens wird so lange größer, bis das Raleigh-Stabilitätslimit erreicht wird und eine Coulomb-Explosion zu Tropfen von wenigen Nanometer Größe führt. Der abschließende Ionisierungsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Entweder enthalten die Tropfen nur noch ein Ion (Charged residue mechanism [121]), oder die Ionen werden von kleinen, hoch geladenen Tropfen emittiert (ion evaporation mechanism [122]).

Die Flussraten in der CEC betragen einige Nanoliter pro Minute, während ESI Quellen einen Fluss im unteren Mikroliter-Bereich für ein stabiles Spray benötigen. Deshalb wird in der Quelle ein zusätzlicher Flüssigkeitsstrom zugeführt. Dieser so genannte Sheath Flow muss leitfähig sein, um den Stromkreis der CEC zu schließen. Weit verbreitet ist ein Design, bei dem die Sheath Liquid durch eine zweite Röhre, welche die Kapillare umschließt, zugeführt wird. Die Flüssigkeiten kommen an der Kapillarspitze in Kontakt. Eine dritte konzentrische Röhre erlaubt das Zubringen eines Gases, wodurch das Verdampfen der Flüssigkeit erleichtert wird [123, 124].

a) Bildung geladener Tropfen



b) Schrumpfen der Tropfen



c) Bildung der Gasphasenionen

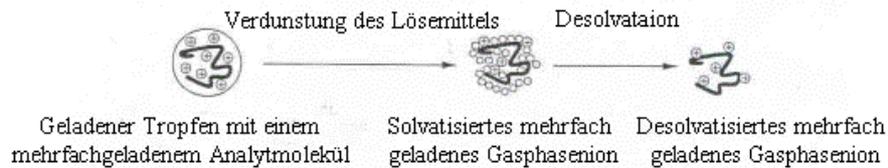


Abb. 1.5: Schematische Übersicht über den ESI-Prozess

Für die CEC Kopplung ist besonders ein ESI-Design geeignet, bei dem die Kapillarspitze der ESI-Quelle geerdet ist und das Potenzial des Sprays zur Cone aufgebaut wird. Dies ermöglicht die gleichzeitige Erdung beider Systeme [110]. Der Stromkreis des CEC-Gerätes ist somit geschlossen und das Potenzial für das Spray vom CEC-Gerät unabhängig. Wie auch die CF-FAB-Ionisierung ist ESI hauptsächlich zur Ionisierung von polaren Molekülen geeignet.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die CEC stellt eine interessante Ergänzung und Alternative zu den routinemäßig eingesetzten Trennmethode der CE und HPLC dar und soll in der Analytischen Chemie der Bergischen Universität Wuppertal etabliert werden.

Dazu sollen zunächst die klassischen Kapillaren mit partikulärem Material eingesetzt werden. Um das bekannte Problem der Luftblasenbildung an der Fritte zu reduzieren, wird eine mittels Lichtbogen verjüngte („getaperte“) Kapillare hergestellt und verwendet. Nach Etablierung der CEC mit bekannten, kommerziellen stationären Phasen und Trennung von neutralen Modellsubstanzen, wie polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs), sollen neue Packungsmaterialien getestet werden. Unter anderem ist geplant, durch Wahl geeigneter Phasen den EOF umzukehren und die Analyten am anodischen Ende der Kapillare zu detektieren. Seit kurzem sind auch endcapped Aminphasen kommerziell erhältlich, weshalb in dieser Arbeit der Einfluss eines Endcappings auf den EOF bei positiv geladenen Phasen erstmals untersucht werden soll.

Des Weiteren wird ein Vergleich der partikulären Kapillaren mit alternativen Packungsarten durchgeführt. Dazu werden monolithische Phasen auf Acrylamid- und Silika-Basis eingesetzt und die Trennleistung anhand von PAKs untersucht. Um diesen Anwendungsbereich und seine Möglichkeiten umfassend darzustellen, werden auch hochselektive Phasen auf der Basis von Molecular-Imprinted-Polymers (MIPs) getestet. Hierbei interessiert unter anderem, ob auch neutrale Verbindungen mit geringen Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbildung, wie Nikotin oder Cotinin, mit einer selbst hergestellten Phase getrennt werden können.

Im letzten Teil der Arbeit ist beabsichtigt, die CEC mit der Massenspektrometrie (MS) zu koppeln, um die Vorteile der MS gegenüber den spektrophotometrischen Detektionsmethoden auszunutzen. Wegen der geringeren Anfälligkeit zur Luftblasenbildung sollten für die MS-Kopplung besonders die monolithischen Kapillaren geeignet sein. Zur Kopplung der Kapillaren soll zunächst ein kommerzielles ESI-Interface eingesetzt werden. Um die Vorteile der CEC, die besonders zur Trennung neutraler und lipophiler Teilchen geeignet ist, zeigen zu können, soll die im Arbeitskreis entwickelte HPLC-APLI-Kopplung auf die CEC übertragen werden. Mit dieser neuen Kopplungstechnik soll die Trennung und selektive Ionisierung einer PAK-Mischung durchgeführt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Um einer Irritation beim Leser vorzubeugen, ist eine einheitliche Terminologie innerhalb dieser Arbeit wichtig. Da die Wirkungsweise der Trennungen eine größere Ähnlichkeit mit der HPLC besitzt, werden deren Begriffe zur Beschreibung von Trennungen verwendet.

3.1 Partikuläre Kapillaren für die CEC

In der CEC werden Kapillaren in den meisten Fällen mit partikulären Phasen, wie sie aus der HPLC bekannt sind, gepackt [21]. Dies hat den Vorteil, dass man eine große Auswahl an Phasen besitzt. Endcapped-Phasen sind jedoch nicht oder nur selten geeignet. Es ist auch möglich die Phasen dem aktuellen Trennproblem anzupassen, jedoch ist eine reproduzierbare Herstellung sehr kompliziert, und erfordert viel Erfahrung.

3.1.1 Herstellung der Trennkapillare

Zum Packen der Kapillare mit partikulärem Material gibt es eine Vielzahl von Methoden, [125] von denen zwei in dieser Arbeit Verwendung fanden. Beide Methoden nutzen einen Druckgradienten, um eine Aufschlämmung des Packungsmaterials (Slurry) in die Kapillare zu befördern. Der Unterschied besteht darin, wie das Packungsmaterial in der Kapillare zurückgehalten wird. Methode 1 verwendet gesinterte Fritten, Methode 2 konische Verjüngungen.

3.1.1.1 Slurry Packung mit gesinterten Fritten

Diese Methode wurde in [61] beschrieben und in dieser Arbeit leicht modifiziert, so dass eine reproduzierbare Packung realisiert werden konnte. Einen schematischen Überblick über die nachfolgend beschriebene Prozedur liefert Abbildung 3.1:

- Das Packungsmaterial wird mit einem geeignetem organischen Lösemittel (z. B. Aceton oder MeOH) aufgeschlämmt. Diese Aufschlämmung wird als Slurry bezeichnet.
- Die Slurry wird in einem Ultraschallbad beschallt, um ein Absetzen zu verhindern und eventuell vorhandene „Verklumpungen“ zu lösen.
- An einem Ende der zu packenden Kapillare wird eine temporäre Fritte (zum Beispiel ein Hochdruck-Inline-Filter) und an der anderen Seite eine Füllkammer befestigt. Als Füllkammer kann z. B. eine kurze HPLC Säule eingesetzt werden (a).
- Nach Füllen der Kammer mit der Slurry werden Kapillare und Kammer in ein Ultraschallbad gelegt und ein Druck von 600 bar appliziert. Dies muss schnell

geschehen, da es sonst zum Absetzen des Packungsmaterials kommt und die Kapillare verstopft. Durch den Druckgradienten füllt sich die Kapillare mit dem Packungsmaterial. Als Medium zum Packen der Kapillare wird Wasser verwendet.

- Zur Verbesserung der Packungsdichte wird die Kapillare eine Stunde unter Druck beschallt. Die Kapillare ist nun komplett mit Packungsmaterial gefüllt.
- Danach werden zwei Fritten hergestellt, eine etwa 10 cm von der temporären Fritte entfernt (Auslassseite) und eine zweite in einer Entfernung von meist 25 cm von der Auslassseite. Das Material wird am gewünschten Punkt „gesintert“, indem mit Hilfe eines Widerstanddrahtes bei angelegtem Druck die Kapillare lokal erhitzt wird (b). Die gewählten Temperaturen und Zeiten sind vom Packungsmaterial abhängig. Der Aufbau beim Sintern ist in Abbildung 3.2 gezeigt.
- Nach dem Entspannen wird die Kapillare an eine HPLC-Pumpe angeschlossen, mit mobiler Phase gespült und die temporäre Fritte entfernt. Das Material, welches sich zwischen gesinterteter Auslassfritte und der temporären Fritte befand, wird dabei ausgespült (c).
- Durch Entfernen der Polyimidschicht, im nun freien Bereich, wird möglichst nah an der Fritte auf der Auslassseite ein Detektionsfenster bereitet (d).

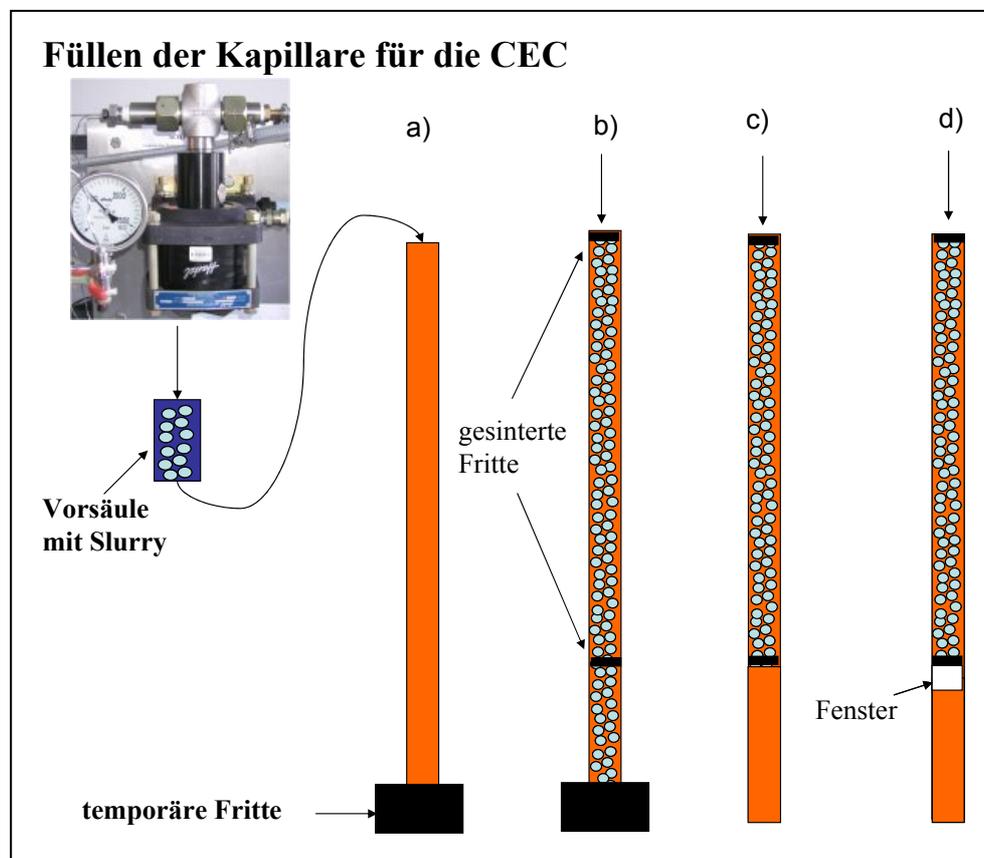


Abb. 3.1: Schematische Herstellung von partikulär gepackten CEC-Kapillaren

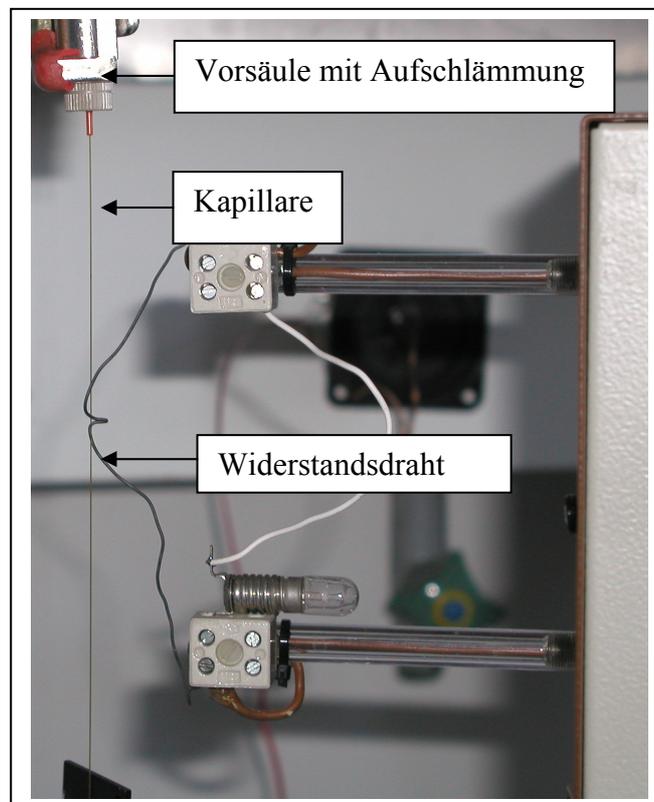


Abb. 3.2: Aufbau zum Packen der Kapillare und Sintern der Fritten

Problematisch bei den so hergestellten Kapillaren ist die Neigung zur Bildung von Luftblasen an der Auslassfritte [126, 127]. Ein Zusammenbrechen des Stromes macht Messungen unmöglich, und das Ausspülen der entstandenen Gasblasen ist sehr zeitaufwendig.

Beabsichtigt man, wie in dieser Arbeit, verschieden stationäre Phasen zu verwenden, müssen für jedes Packungsmaterial neue optimale Bedingungen gefunden werden, um stabile aber dennoch durchlässige Fritten zu erhalten. Eine alternative Methode stellen die im Folgenden beschriebenen, konisch zulaufenden Kapillaren (getaperten Kapillaren) dar.

3.1.1.2 Slurry Packung mit Querschnittsverengung und einer Fritte

Als Alternative zu den gepackten Kapillaren mit zwei Fritten bieten sich Kapillaren an, welche keine Fritten oder zumindest keine Auslassfritten besitzen. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, sind Kapillaren mit einer Querschnittsverengung (internal taper). Sie nutzen den so genannten „keystone“ Effekt. Durch Verringerung des Kapillardurchmessers auf das zwei- bis dreifache des Partikeldurchmessers, bei 3 und 5 μm Material auf $\sim 10 \mu\text{m}$, verkeilen sich die Partikel an der gebildeten Engstelle, und eine Fritte ist nicht mehr nötig. In der Literatur sind

zwei Arbeiten beschrieben, die diese Kapillaren verwenden [114, 128]. Zum Verjüngen der Kapillare wurde ein capillary-puller verwendet, der sonst zur Herstellung von Mikropipetten oder ESI-Spitzen eingesetzt wird. Dabei wird das Glas an einer Stelle erhitzt und beim Erhitzen auseinander gezogen, wodurch es zur gewünschten Verjüngung der Kapillare kommt. Obwohl sich die Parameter der capillary-puller genau und reproduzierbar einstellen lassen, erfordert die Handhabung des Pullers bei wechselnden Kapillardurchmessern Erfahrung.

In dieser Arbeit wurde zum Verjüngen der Kapillare ein Lichtbogen eingesetzt. Die Kapillare wird dazu in ein optisches Spleißgerät eingespannt, und ein Lichtbogen erzeugt. Durch die hohe Temperatur des Lichtbogens schmilzt die Kapillare an der gewünschten Stelle. Es kommt zu einer Verjüngung, die durch ein aufgebautes Okular verfolgt werden kann (siehe Abbildung 3.3). Sobald der angestrebte Durchmesser erreicht ist, wird der Lichtbogen abgeschaltet, und da die Kapillare sofort wieder erstarrt, kann jeder beliebige Wert zwischen 5 und 50 μm eingestellt werden.

Die in der CEC normalerweise eingesetzten Kapillaren haben einen AD von 360 μm . Und da beim Spleißen die Polyimidschicht verbrennt, wird hinterher eine Kapillare mit einem Innendurchmesser größer 360 μm als Bruchschutz an der labilen Stelle übergestülpt und mit Epoxidharzkleber befestigt.

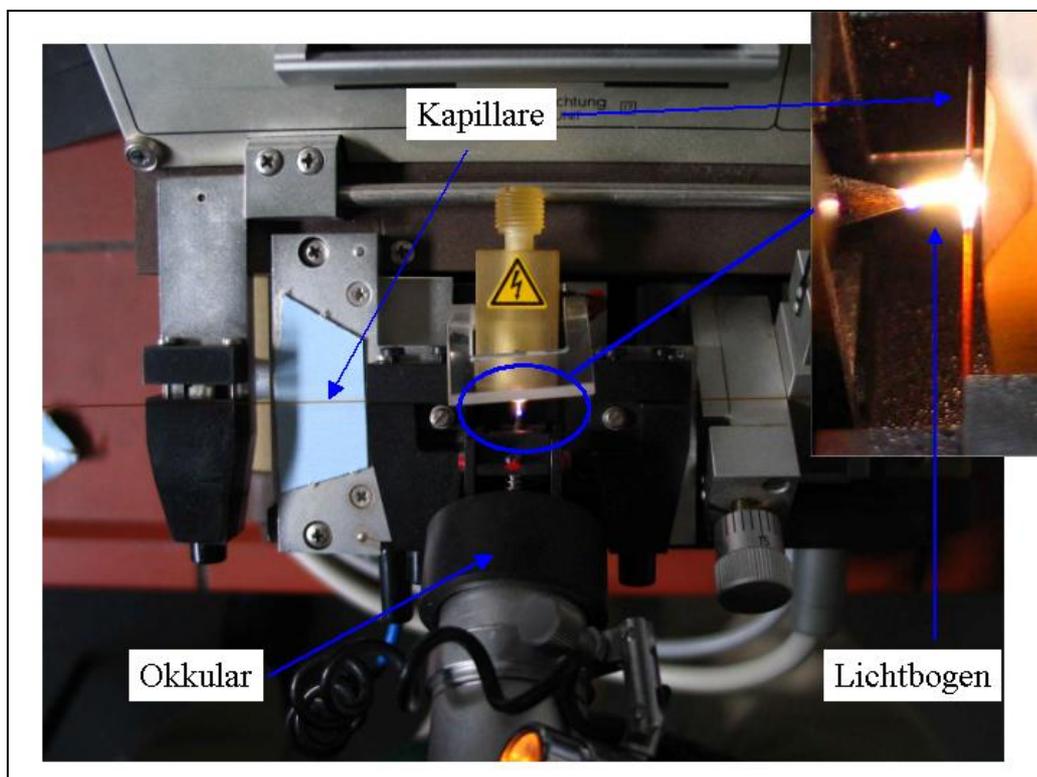


Abb. 3.3: Abbildung eines optischen Spleißgerätes mit eingespannter Kapillare

Die so vorbereitete Kapillare wird analog zur ersten Methode gepackt, lediglich die Verwendung der temporären Fritte ist nicht mehr erforderlich. Ohne gesinterte Auslassfritte ermöglichen diese Kapillaren eine stabile Messung, und die Entstehung von Luftblasen ist deutlich reduziert. An der Einlassseite muss jedoch eine Fritte gesintert werden, da das Packungsmaterial aufgrund seiner negativen Oberflächenladung bei angelegter Spannung sonst aus der Kapillare wandern könnte.

Die Abbildung 3.4 zeigt einen schematischen Vergleich der beiden Kapillaren.

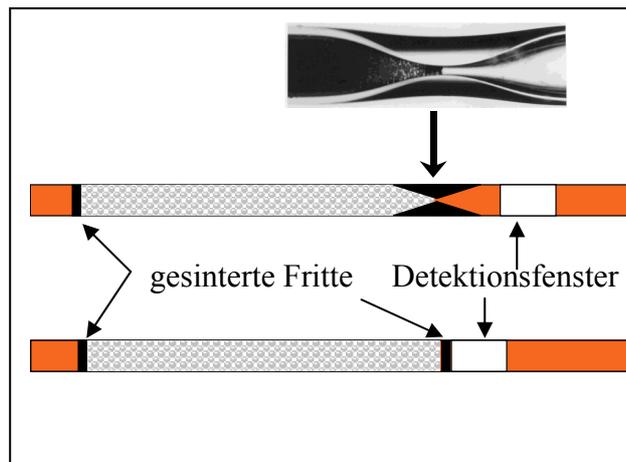


Abb. 3.4: Schematischer Vergleich zwischen verjüngter und klassischer Kapillare, oben: Originalaufnahme einer getaperten Kapillare mit Packungsmaterial links von der Verjüngung

Vor dem Einsatz in der CEC werden die Kapillaren mit mobiler Phase konditioniert. Dazu werden sie mehrere Stunden mit Hilfe einer HPLC Pumpe gespült. Um die Luftblasenbildung während der Messung zu reduzieren, ist eine gute Entgasung der mobilen Phase notwendig. Entgast wurde im Ultraschallbad, weil beispielsweise Helium die im Puffer vorkommenden hohen Anteile an organischem Lösemittel (bis 80 % Acetonitril) austreiben würde. Aufgrund der UV-Undurchlässigkeit der Polyimidschicht, muss diese im letzten Schritt im Detektionsbereich entfernt werden. Standardmäßig brennt man die Polyimidschicht durch kurzzeitiges Erhitzen (z.B. mit einem Feuerzeug) weg. Dies ist bei gepackten Kapillaren aber unmöglich, da das Erhitzen zum Zusammenschmelzen des Packungsmaterials führen würde. Um das zu verhindern, kann die Polyimidschicht auch mit einem Skalpell freigekratzt werden, wobei jedoch die Bruchgefahr sehr groß ist. Deshalb wurde das Detektionsfenster während des Spülvorgangs mit heißer, 98 %iger H_2SO_4 in die Polyimidschicht geätzt. Dabei wird ein Tropfen konzentrierter Schwefelsäure auf die Spitze eines 250 °C heißen LötKolbens positioniert. Die heiße Schwefelsäure ätzt bei Kontakt sofort die Polyimidschicht weg. Dies

hat den Vorteil, dass sich die nahe liegende Packung nicht erhitzt und zusammenschmilzt. Die so vorbereiteten Kapillaren sind für die CEC einsatzbereit.

3.1.2 Einsatz von Kapillaren mit gesinterter Fritte gegenüber konischer Verjüngung an der Auslassseite

Um die Leistungsfähigkeit der beiden Designs zu vergleichen, wurden Messungen mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) durchgeführt. Während sich die Frittentechniken unterschieden, wurden die restlichen Parameter konstant gehalten, um eine gute Vergleichbarkeit zu erzielen.

Kapillare 1 wurde nach Methode 1 (siehe Kapitel 3.1.1) gepackt. Als Packungsmaterial wurde ODS 1 (5 μm) von Waters mit Aceton aufgeschlämmt und durch Anlegen von Druck in die Kapillare befördert. Die gefüllte Kapillare wurde für 60 Minuten beschallt, um dann für 10 Sekunden bei 450 $^{\circ}\text{C}$ die Fritten in einem Abstand von 25 cm zu brennen. Die Kapillare hatte eine Gesamtlänge von 35 cm und einen Innendurchmesser von 75 μm . Nach dem Entfernen der temporären Fritte wurde die Kapillare bei 100 bar Druck über Nacht mit der mobilen Phase gespült. Als mobile Phase diente eine Mischung aus 80 % Acetonitril und 20 % 5 mM Tris-Puffer, pH 7,5.

Das eingesetzte ODS 1-Material hatte lipophile Eigenschaften durch C_{18} -Gruppen und war nicht endcapped. Als EOF Marker diente Thioharnstoff. Injiziert wurde eine Mischung aus Thioharnstoff (1), Naphthalin (2), Fluoren (3), Phenanthren (4), Fluoranthen (5) und Pyren (6). Die Konzentrationen der PAK betragen circa 1mM (je 0,2 g/l). Die Injektion erfolgte elektrokinetisch bei 5 kV für 3 Sekunden. Zur Trennung wurden 20 kV angelegt (Abb. 3.5) und die PAKs bei 214 nm mittels eines Dioden-Array-Detektors (DAD) nachgewiesen.

Die Zuordnung der Rohdaten zu den entsprechenden Messungen kann in dieser Arbeit immer durch die achtstellige Zahl unten links im Chromatogramm erfolgen.

Das Chromatogramm in Abbildung 3.5 zeigt, dass das Packungsmaterial eine gute Trennung der Aromaten ermöglicht. Auch die wesentlich größere Leistungsfähigkeit gegenüber der HPLC wird anhand der Basislinientrennung in nur 8 Minuten deutlich. Die Trennung basiert, genauso wie in der HPLC, auf lipophilen Wechselwirkungen zwischen den C_{18} -Gruppen der stationären Phase und den Analyten, jedoch führt das stempelförmige Flussprofil zu einer deutlich besseren Effizienz. Um eine Luftblasenbildung und somit einen Zusammenbruch des Stroms zu verhindern, war es wichtig, sowohl Einlass- als auch das Auslassgefäß mit einem externen Druck von 10 bar zu belegen.

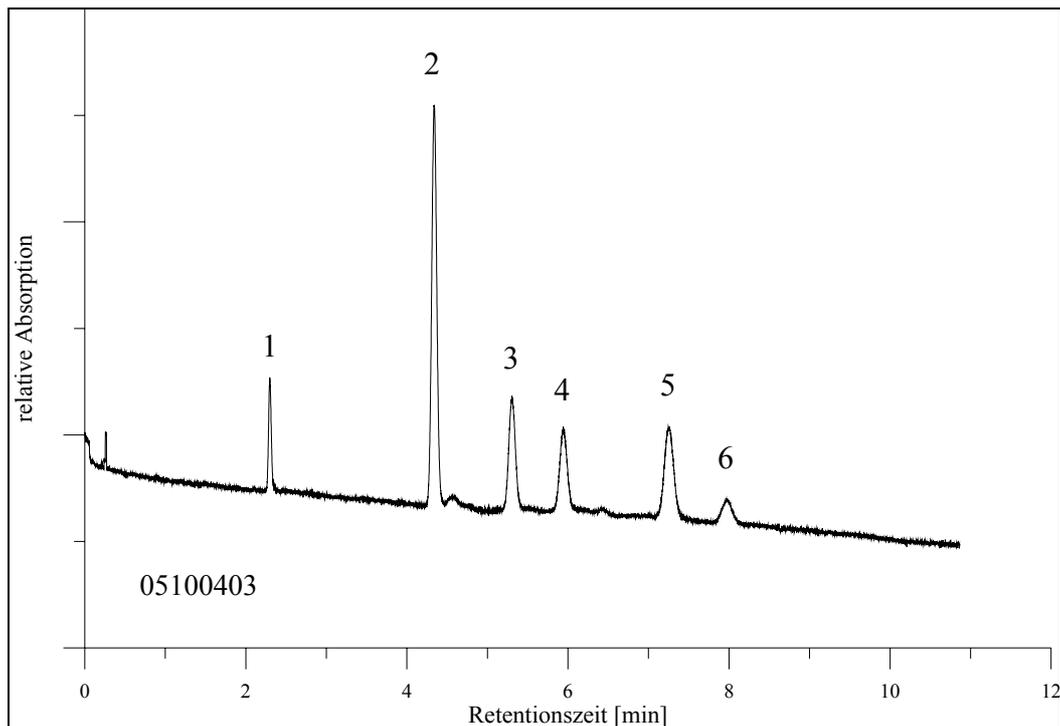


Abb. 3.5: Trennung einer PAK-Mischung auf einer Kapillare mit zwei gesinterten Fritten (5µm ODS 1)

Diese Messung wurde dann zum Vergleich mit einer getaperten Kapillare wiederholt. Die Packung des ODS 1-Materials erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema. Nach Beschallung wurde in 25 cm Entfernung von der Verjüngung eine Fritte gebrannt (450°C für 10 Sekunden) und die Kapillare oberhalb der Fritte abgeschnitten.

Die Messung wurde sonst unter identischen Bedingungen durchgeführt und das Chromatogramm ist in Abbildung 3.6 gezeigt.

Den Abbildungen 3.5 und 3.6 ist zu entnehmen, dass die Trennleistung der beiden Kapillaren nahezu gleich ist. Die Herstellung von druckstabilen Fritten nach Methode 1 erforderte viele Versuche, während das Einfügen der Engstelle nach Methode 2 nur eine Minute dauerte. Bei Arbeiten mit verschiedenen Phasenmaterialien ist das ein wichtiger Vorteil. Dem in der Literatur beschriebenen Fazit, dass diese „Fritten“ weniger zur Bildung von Luftblasen neigen, kann zugestimmt werden. Die Kapillaren waren ohne Auslassfritte stabiler, aber auch hier ist im Dauerbetrieb das Anlegen von einem externen Druck vorteilhaft. Ein weiterer Vorteil der getaperten Kapillaren liegt darin, dass das Phasenmaterial nicht durch die Frittenbildung verändert wird. Dadurch können keine aktiven Silanolgruppen entstehen, welche die Trennleistung herabsetzen [129]. Des Weiteren kann ein beliebiges Phasenmaterial (zum Beispiel Polymere) verwendet werden, da anders als beim Sintern von Fritten keine Silanolgruppen benötigt werden.

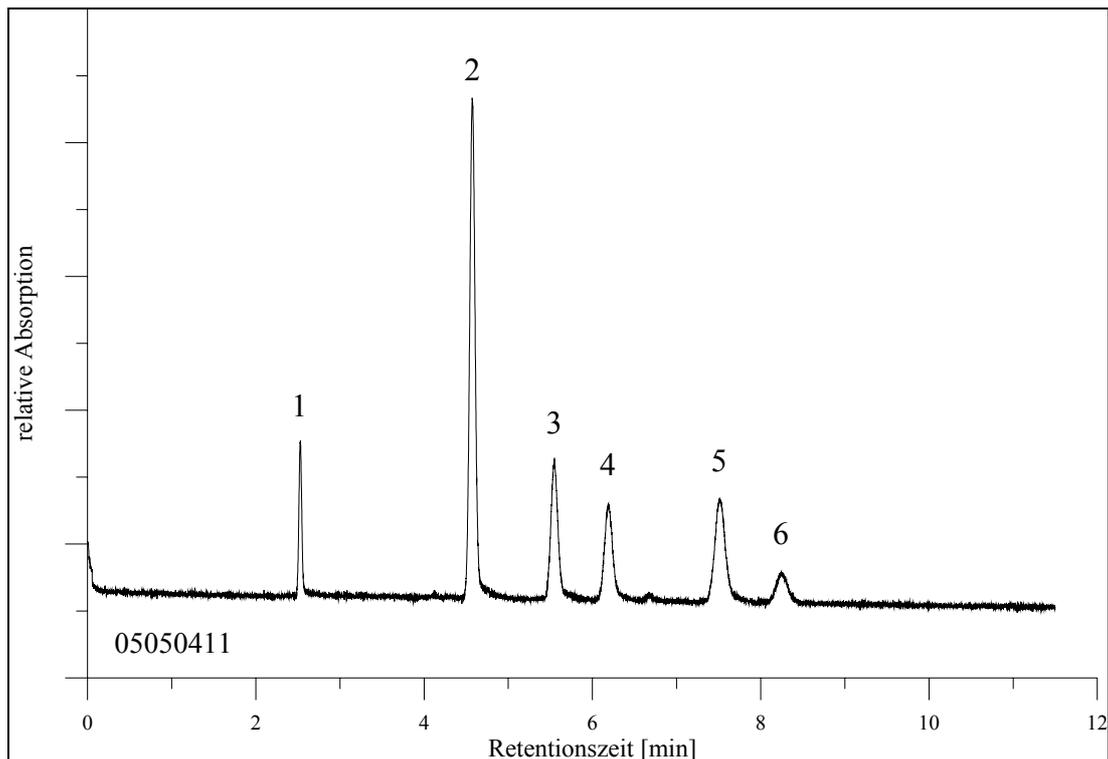


Abb. 3.6: Trennung einer PAK-Mischung auf einer getaperten Kapillare (5µm ODS 1)

Um die Leistungsfähigkeit der CEC mit partikulär gepackten Kapillaren zu zeigen, wurde eine Kapillare mit 3 µm Packungsmaterial (ODS 1) nach Methode 2 gefertigt und die gleiche PAK-Mischung erneut analysiert. Die Injektion erfolgte wieder elektrokinetisch bei 5 kV für 3 Sekunden. Es wurde der gleiche Elektrolyt eingesetzt, allerdings erfolgte die Trennung bei einer Spannung von 30 kV. Das erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Durch die höhere Spannung wurde die Analysezeit reduziert und aufgrund der kleineren Partikelgrößen wurden höhere Bodenzahlen erreicht. Die Trennung der PAKs dauerte weniger als sechs Minuten. Aufgrund der Luftblasenbildung konnten bei Verwendung von Kapillaren mit zwei gesinterten Fritten bei 30 kV Trennungsspannung keine Ergebnisse erzielt werden. Die durchgeführten Messungen haben ergeben, dass das verwendete Phasenmaterial, die Packungsmethode und die konischen „Fritten“ sich in der CEC von PAKs bewährt haben. An diesem Beispiel wird außerdem die Leistungsfähigkeit der CEC für lipophile, ungeladene Substanzen deutlich.

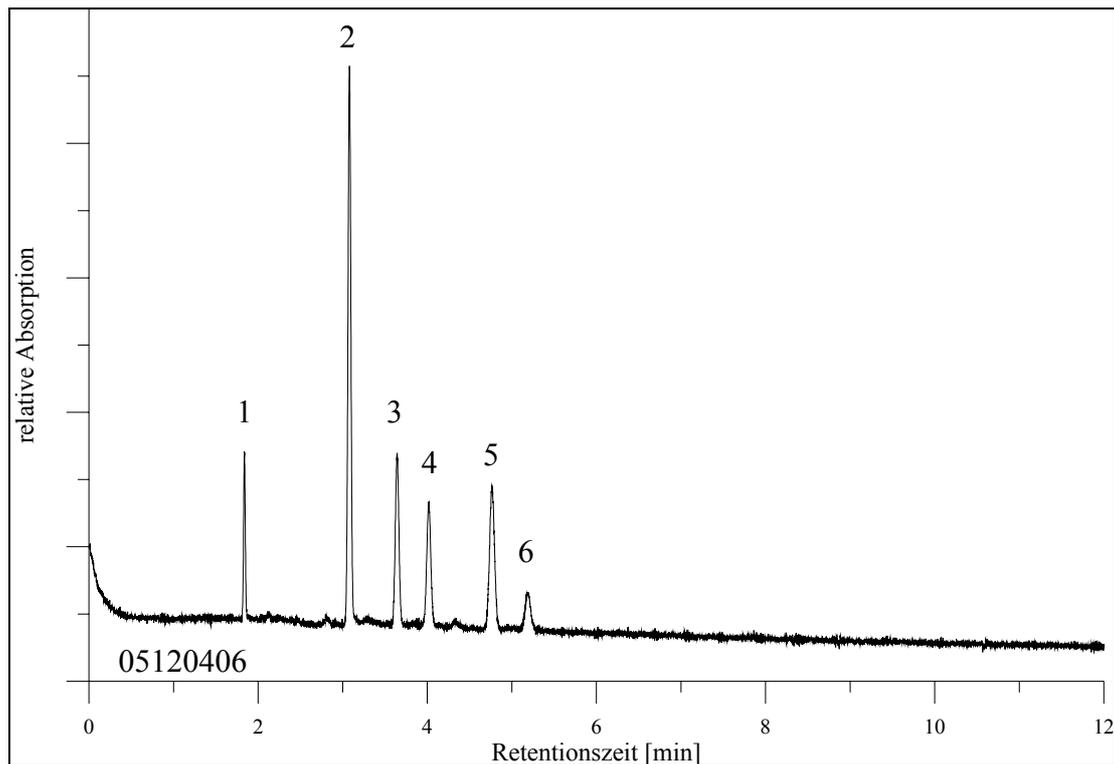


Abb. 3.7.: Trennung einer PAK-Mischung auf einer getaperten Kapillare (3 µm ODS 1)

Eine Übersicht über die erreichten Bodenzahlen pro m ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Substanz	CEC-Kapillare mit gesinterten Fritten	CEC-Kapillare mit konischer Verjüngung (getapert)	
	5 µm ODS 1 20kV Bodenzahl · m ⁻¹	5 µm ODS 1 20kV Bodenzahl · m ⁻¹	3 µm ODS 1 30kV Bodenzahl · m ⁻¹
Thioharnstoff	6,7 · 10 ⁴	8,2 · 10 ⁴	8,5 · 10 ⁴
Naphtalin	1,2 · 10 ⁵	1,2 · 10 ⁵	1,5 · 10 ⁵
Fluoren	9,0 · 10 ⁴	9,8 · 10 ⁴	1,8 · 10 ⁵
Phenanthren	7,8 · 10 ⁴	1,1 · 10 ⁵	1,5 · 10 ⁵
Fluoranthren	8,0 · 10 ⁴	8,0 · 10 ⁴	9,2 · 10 ⁴
Pyren	5,3 · 10 ⁴	7,1 · 10 ⁴	7,0 · 10 ⁴

Tabelle 3.1: Bodenzahlen in der CEC mit partikulärem Material

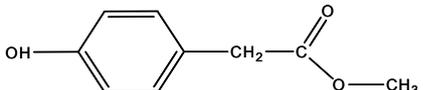
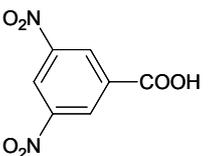
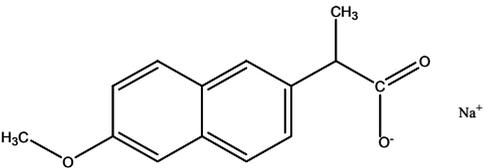
3.1.3 Einsatz weiterer partikulärer Phasenmaterialien

Im Theorieteil wurde bereits ausführlich auf die pH-Abhängigkeit des EOF eingegangen (siehe dazu Kapitel 1.2.1). Bei niedrigen pH-Werten nimmt der EOF sehr stark ab. Für Analyten mit einer Carboxylgruppe ist die CEC-Analyse oftmals schwierig, wenn die elektrophoretische Mobilität der Carboxylationen in Richtung Anode größer ist als der

kathodisch gerichtete EOF und die Analyten somit nicht detektiert werden können. Eine Lösung dieses Problems könnte darin bestehen, den pH-Wert des Elektrolyten so weit zu verringern, dass die Carboxylfunktion der Analyten undissoziiert vorliegt. Bei Silikaphasen führt dies aufgrund der dann ebenfalls stark ansteigenden Anzahl undissoziierter Silanolgruppen zu so geringen EOF-Werten, dass die Analysenzeit extrem verlängert würde. Deshalb ist es günstiger die Richtung des EOF durch positiv geladene Packungsmaterialien umzukehren.

3.1.3.1 Trennung einer Testmischung an einer endcapped-Aminphase

In dieser Arbeit wurde erstmals eine endcapped-Aminphase (e-NH₂) eingesetzt. Die Funktionalität der Phase basiert auf einer Propylamingruppe, die in einem großen pH-Bereich über eine positive Ladung verfügt. Die in der Literatur bisher eingesetzten Phasen waren nicht endcapped, weshalb die freien Silanolgruppen einer effektiven EOF-Umkehr entgegenwirkten. Bei endcapped-Phasen können dagegen keine Silanolgruppen stören, und es bildet sich ein anodisch gerichteter EOF über einen großen pH-Bereich aus. Die Trenneigenschaften dieser Phase wurden mit einer Testmischung der in Tabelle 3.2 aufgelisteten Substanzen mit unterschiedlichen pKs-Werten untersucht.

Substanz	Name	Struktur	pKs
7	p - Hydroxyphenyllessigsäuremethylester		~ 9,9
8	3,5 Dinitrobenzoesäure		2,2
9	Naproxen		4,2

Um den Trennmechanismus zu untersuchen, wurden der pH-Wert, der organische Anteil und die Ionenstärke des Elektrolyten systematisch verändert.

Eine getaperte Kapillare (25 cm gepackte Länge, 35 cm Gesamtlänge, Innendurchmesser 75 µm) wurde mit der e-NH₂ Phase gepackt. Als Slurry wurden 15 mg einer 5 µm e-NH₂

Phase in 300 μ L Aceton eingesetzt. Bei allen Versuchen in diesem Kapitel erfolgte die Injektion des Testgemisches elektrokinetisch bei -5 kV für 3 Sekunden, die Trennungsspannung betrug -10 kV. Die Konzentrationen betragen 6,0 mM für **7**, 4,7mM für **8** und 4,0mM für **9**.

Einfluss des pH-Wertes

Zur Trennung wurde ein Elektrolyt bestehend aus 50 % Acetonitril und 50 % 10 mM Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten eingesetzt (Abb. 3.8). Die anodische Detektion erfolgte mit einem DAD, wodurch die Zuordnung der Substanzen anhand ihrer Absorptionsspektren ermöglicht wurde.

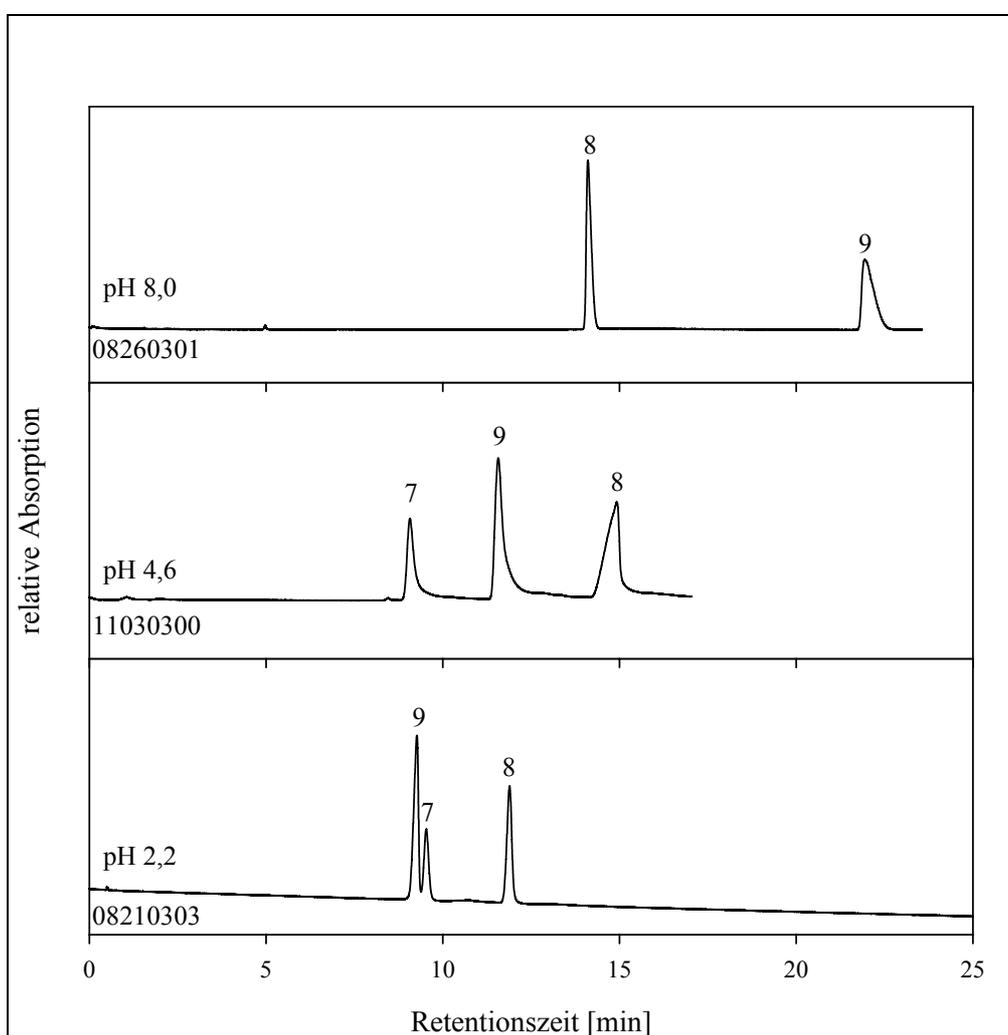


Abb. 3.8: Trennung des Testgemisches bei unterschiedlichen pH-Werten

7 = p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester, **8** = 3,5-Dinitrobenzoesäure, **9** = Naproxen

pH 2,2

Fast zur gleichen Zeit werden die bei diesem pH-Wert neutralen Substanzen **7** und **9** eluiert, gefolgt von der zu 50 % negativ geladenen 3,5-Dinitrobenzoesäure (**8**). Die Trennung der

beiden neutralen, durch den EOF transportierten Substanzen erklärt sich durch lipophile Wechselwirkungen mit dem Propylrest der Aminphase. Die negativ geladene Substanz **8** müsste theoretisch vor den neutralen Substanzen detektiert werden, da sich die Wanderungsgeschwindigkeit aus der vektoriellen Addition des EOF und der eigenen elektrophoretischen Migration ergibt. Da dies nicht der Fall ist, lässt dies auf eine starke ionische Wechselwirkung zwischen dem Benzoat-Anion und der positiven Aminphase schließen. Diese Wechselwirkung ist stärker als die lipophile Wechselwirkung des Naproxen und des p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylesters, weshalb **8** als letzte Substanz eluiert wird. Demnach sind bei dieser Phase sowohl schwache lipophile als auch starke ionische Wechselwirkungen (bei Anionen) von Bedeutung.

pH 4,6

Bei diesem pH-Wert ist die 3,5-Dinitrobenzoesäure vollständig, das Naproxen zu mehr als 50 % deprotoniert und der p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester liegt weiterhin neutral vor. Die Elutionsreihenfolge p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester – Naproxen - 3,5-Dinitrobenzoesäure bestätigt die Ergebnisse der Messung bei pH 2,2. Die Retentionszeit des neutralen Esters ändert sich kaum, was auf einen recht konstanten EOF und nur schwache lipophile Wechselwirkungen mit der Aminphase schließen lässt. Das Naproxen wird aufgrund der teilweisen negativen Ladung deutlich später eluiert. Dies ist auf eine nun möglich gewordene ionische Wechselwirkung der Phase mit dem Analyten zurückzuführen. Diese Wechselwirkung ist es auch, die zur starken Retention der vollständig deprotonierten 3,5-Dinitrobenzoesäure führt und die lange Analysezeit erklärt.

pH 8,0

Bei diesem pH-Wert ist der neutrale p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester nicht mehr zu detektieren, da kein oder nur noch ein sehr geringer EOF vorhanden ist und die neutrale Substanz elektrokinetisch nicht injiziert werden kann. Aufgrund der eigenen elektrophoretischen Mobilität bleiben die negativ geladenen Substanzen detektierbar. Der kleine Peak zu Beginn der Messung (bei $t = 5$ Minuten) konnte nicht zugeordnet werden. Es handelt sich wahrscheinlich um eine Verunreinigung. Die Elutionsreihenfolge der Substanzen **8** und **9** kehrt sich um. Die Reduzierung des EOF zeigt eine beginnende Deprotonierung der Ammoniumgruppen der stationären Phase an. Es finden also nur noch geringe ionische Wechselwirkungen statt, und die Substanzen eluieren hauptsächlich aufgrund der eigenen elektrophoretischen Mobilität. Aufgrund der höheren Ladungsdichte ist diese bei **8** größer.

Zwei Arten von Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase konnten beobachtet werden. Lipophile Wechselwirkungen ermöglichen die Trennung zweier neutraler Substanzen. Diese lipophilen Wechselwirkungen sind schwach und lassen sich auf den Propylrest der funktionellen Gruppe zurückführen. Die zweite, wesentlich stärkere Wechselwirkung beruht auf dem ionischen Charakter der Phase und der Analyten. Die Phase besitzt trotz des Endcappings einen pH-abhängigen EOF oberhalb von pH 7. Dies zeigt die beginnende Deprotonierung der Propylammonium-Gruppen. Wenn das Endcapping der Phase unvollständig ist, kann es auch zu einem störenden Einfluss durch unprotonierte Silanolgruppen des Phasenmaterials kommen.

Die Kapillarwand wurde bei diesen Versuchen nicht belegt, sodass weiterhin freie Silanolgruppen zur Verfügung standen. Über den Beitrag dieser Silanolgruppen zu der Höhe des EOF bei partikulär gepackten Kapillaren gehen die Meinungen in der Literatur auseinander. So stellten ZHANG und EL RASSI fest, dass mit ODS-Material gepackte Kapillaren, die mit Sulfonsäuregruppen belegt waren, einen höheren EOF lieferten als unbehandelte fused silica Kapillaren [130]. Dem widersprechen die Ergebnisse von DITTMANN und ROZING [131] sowie SMITH und EVANS [132], die feststellten, dass der EOF unabhängig von der Kapillaroberfläche ist und hauptsächlich von den Partikeln geprägt wird. Diese Arbeiten wurden mit Phasen durchgeführt, die einen EOF erzeugen, der in die gleiche Richtung weist wie der der unbehandelten Kapillare. Mit positiv geladenen Phasen, deren EOF dem der Kapillare entgegen gerichtet ist, führten SCHERER und STEINER Versuche durch [60]. Diese zeigten, dass der EOF wesentlich von der Phase bestimmt wird. Als Erklärung wird herangezogen, dass die Oberfläche des Packungsmaterials deutlich größer als die Kapillaroberfläche ist und der EOF überwiegend vom Packungsmaterial abhängt.

Einfluss des Modifizieranteils

10 mM Na-Phosphat-Lösungen mit einem konstanten pH-Wert von 4,6 wurden als Elektrolyt eingesetzt. Lediglich die Konzentration an organischem Lösungsmittel wurde in 10 % Schritten von 60 auf 20 % verringert. Die erhaltenen Chromatogramme zeigt Abbildung 3.9. Die Retentionszeit des ungeladenen p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylesters ändert sich kaum. Dies zeigt, dass die Konzentration des organischen Modifiers nur einen geringen Einfluss auf den EOF hat. Die Retentionszeiten der geladenen Analyten sind dagegen deutlich vom Gehalt an organischem Modifier abhängig. Der Einfluss ist so groß, dass sich die Elutionsreihenfolge umkehrt. Anhand der Strukturen und der pKs-Werte von Naproxen und 3,5-Dinitrobenzoesäure wird die Ursache hierfür deutlich. Bei einem pH-Wert von 4,6 ist die 3,5-Dinitrobenzoesäure vollständig und das Naproxen zu 50 % deprotoniert. Das Naproxen

besitzt deshalb eine größere Lipophilie als die Dinitrobenzoesäure, was die deutliche Abhängigkeit gegenüber dem Zusatz des organischen Modifiers erklärt.

Einfluss der Ionenstärke

Die Ionenstärke des Puffers wurde verändert, während der pH-Wert bei 4,6 und der Anteil an ACN mit 50 % konstant blieb. Die Auswirkungen auf die Trennung der Substanzen sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Der neutrale p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester (**7**) wird mit 5 und 10 mM Phosphatpuffer zuerst eluiert. Dagegen erfolgt die Elution des Esters mit 20 mM Phosphatpuffer wesentlich später. Dies kann damit erklärt werden, dass durch die Erhöhung der Ionenstärke das Zeta-Potenzial verringert wird, was zu einer Reduzierung des EOF führt. Die Abnahme der Retentionszeit von 3,5-Dinitrobenzoesäure (**8**) bei Einsatz von 20 mM Phosphatpuffer ist darauf zurückzuführen, dass mit ansteigender Ionenstärke ionische Wechselwirkungen reduziert werden, was zu einer Erhöhung der Elutionskraft des Elektrolyten führt. Zwischen 5 und 10 mM ändert sich die Retentionszeit von **8** nicht, was bedeutet, dass dieser Effekt erst bei einer starken Erhöhung der Ionenstärke eine Rolle spielt. Die Retentionszeit des zu ca. 50% deprotonierten Naproxen (**9**) dagegen, ändert sich bereits bei der Erhöhung der Ionenstärke von 5 auf 10 mM mit einer Elutionsumkehr von **8** und **9**. Das weniger stark geladene **9** reagiert früher und somit empfindlicher auf die Veränderung der Ionenstärke als die vollständig deprotonierte 3,5-Dinitrobenzoesäure.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Retentionszeit von vielen Faktoren bestimmt wird. Zum einen ist die analytspezifische elektrophoretische Mobilität zu beachten. Diese sollte bei der 3,5-Dinitrobenzoesäure aufgrund der höchsten Ladungsdichte der im Testgemisch vorhandenen Substanzen am größten sein. Eine höhere Ladungsdichte bedeutet aber auch, dass die ionischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase stärker werden und so die Retentionszeit ansteigt. Wird die Ionenstärke erhöht, sinkt der EOF, und gleichzeitig steigt die Elutionskraft des Puffers aufgrund reduzierter ionischer Wechselwirkungen. Diese Faktoren können sich gegenseitig aufheben. Wie stark sich welcher Faktor auswirkt, hängt von der Substanz ab und kann durch das einfache Testgemisch nicht vollständig beantwortet werden.

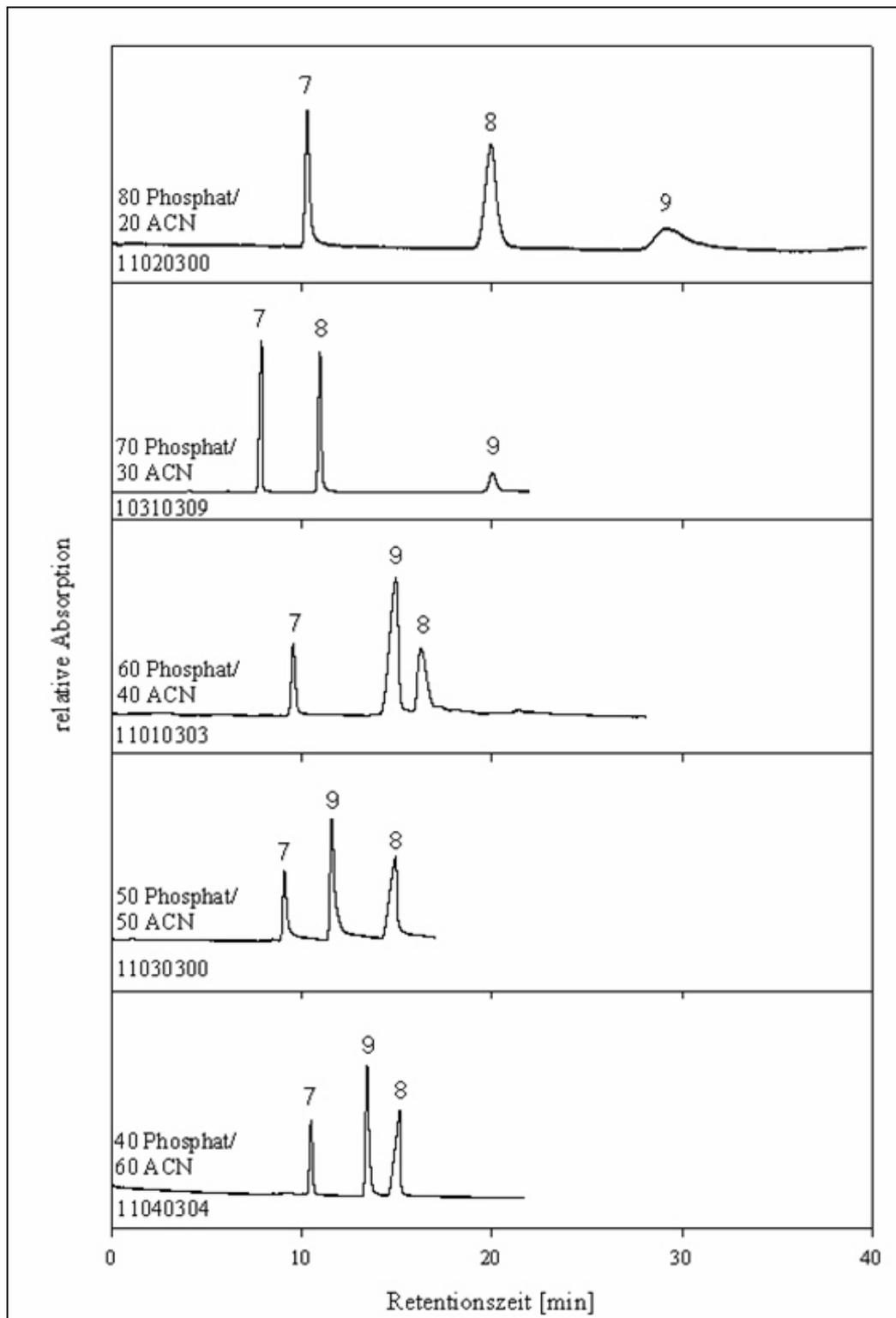


Abb. 3.9: Trennung des Testgemisches bei variierendem Anteil von Acetonitril

7 = p-Hydroxyphenylessigsäuremethylester, 8 = 3,5-Dinitrobenzoesäure, 9 = Naproxen

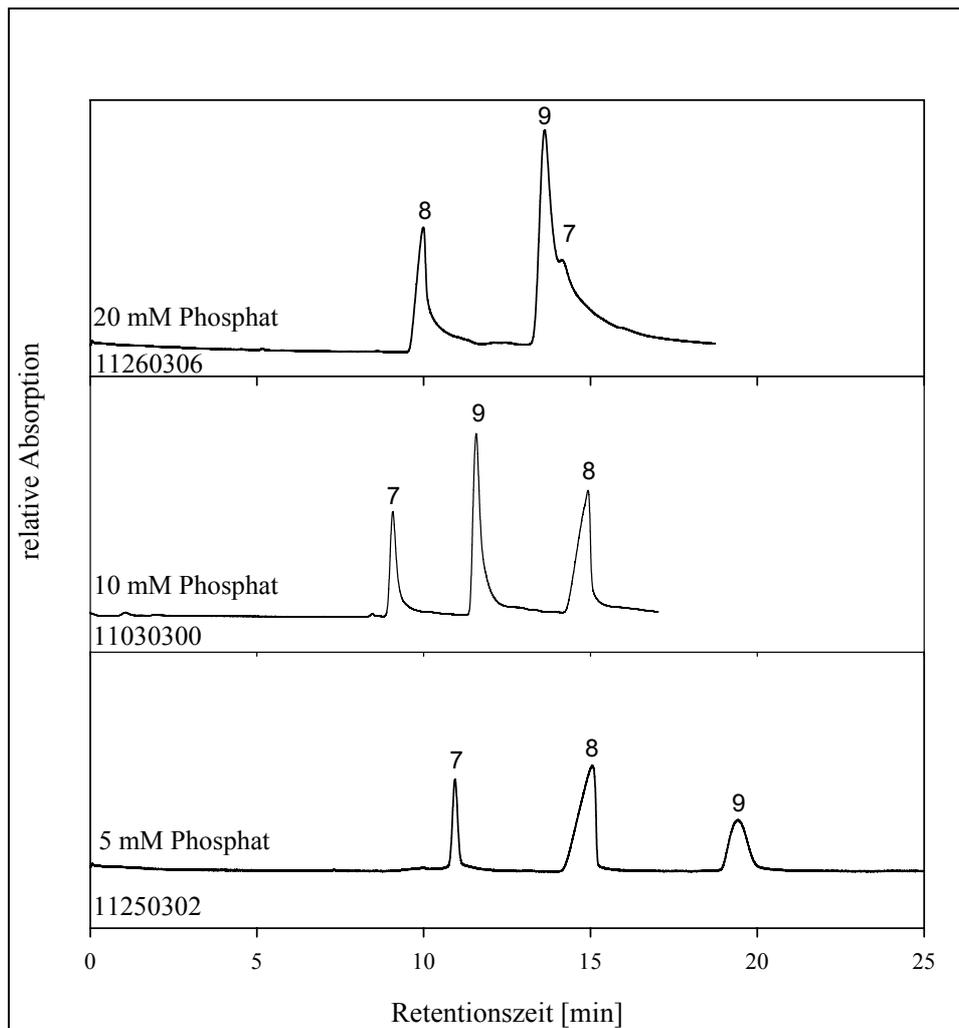


Abb.3.10: Trennung eines Testgemisches bei variierender Ionenstärke

7 = p-Hydroxyphenylessigsäuremethylester, 8 = 3,5-Dinitrobenzoesäure, 9 = Naproxen

Fazit

Durch systematische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die endcapped-Aminphase eine interessante Alternative zu C₁₈-Phasen darstellt. Sie besitzt einen anodisch gerichteten EOF, der aufgrund des Endcappings über einen weiten pH-Bereich konstant bleibt. Lediglich bei hohen pH-Werten ist ein Einfluss auf die Stärke des EOF zu beobachten. Viele Wechselwirkungen und Größen beeinflussen die Messung, was eine Vorhersage der Elutionsreihenfolge zwar erheblich erschwert, jedoch auch eine Vielzahl von Möglichkeiten bietet, eine Trennung zu erzielen bzw. zu optimieren. Weiterhin kann beobachtet werden, dass die ionischen Wechselwirkungen bei den eingesetzten Analyten einen stärkeren Einfluss auf die Retentionszeit besitzen als die lipophilen Wechselwirkungen.

3.1.3.2 Trennung eines Wirkstoffgemisches an einer endcapped-Aminphase

Die bisherigen Erfahrungen sollten nun für die Trennung einer Wirkstoffmischung (Tabelle 3.3) mit der Aminphase eingesetzt werden. Bei den Wirkstoffen handelte es sich um nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Lipidsenker. Diese Substanzen werden häufig verschrieben und gelangen in die aquatische Umwelt. Deshalb ist eine Analytik dieser Substanzen sehr interessant. Als gemeinsames Strukturelement besitzen alle Substanzen ein aromatisches System und eine Carboxylfunktion. Dadurch ergeben sich für die Wirkstoffe pKs-Werte um 4,6. DESIDERIO und FANALI [133] gelang es bereits die durch Reduzierung des pH-Wertes protonierten Substanzen an einer C₁₈-Phase zu trennen. Da ein niedriger pH-Wert nicht ideal ist, um Phasen auf Silikabasis für die CEC einzusetzen, wurden die Untersuchungen mit der Aminphase durchgeführt.

Das Chromatogramm in Abbildung 3.11 wurde mit einem Elektrolyt bestehend aus einer Mischung von 50 % Acetonitril und 50 % 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 2,2 erhalten. Bei diesem pH-Wert besitzt die Aminphase einen großen EOF (siehe auch Kapitel 3.1.3.1), und die Analyten sind protoniert. Unter diesen Bedingungen findet eine Coelution aller Wirkstoffe statt. Die auf der Propylgruppe basierende lipophile Wechselwirkung der Aminphase reicht im Gegensatz zu den C₁₈-Phasen für eine Trennung nicht aus. Um stärkere Wechselwirkungen und somit eine Trennung zu erzielen, muss der pH-Wert angehoben werden. Wie in den vorherigen Versuchen gezeigt, ist die Aminphase in der Lage, mit negativ geladenen Substanzen starke ionische Wechselwirkungen einzugehen. In der nächsten Messung wurde ein Na-Phosphatpuffer mit einem pH von 4,6 eingesetzt (Abb. 3.12). Die Ionenstärke und der Anteil ACN blieben konstant. Die Erhöhung des pH-Wertes auf den ungefähren pKs-Wert der Substanzen ermöglichte nun aufgrund von ionischen Wechselwirkungen und der elektrophoretischen Mobilität der Substanzen eine Trennung von sechs der sieben Arzneimittel. In dem verwendeten pH-Bereich ist der EOF stabil, weshalb eine Erhöhung des pH-Wertes keinen Einfluss auf die Dauer der Trennung hat. Veränderungen der Ionenstärke oder des Acetonitrilanteils brachten keine weitere Verbesserung der Trennung. Die Substanzen wurden mit Hilfe von Aufstockexperimenten zugeordnet.

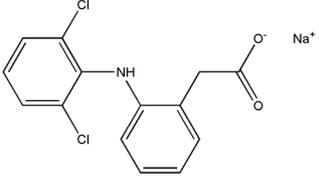
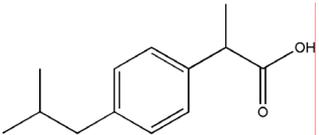
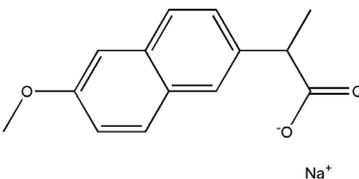
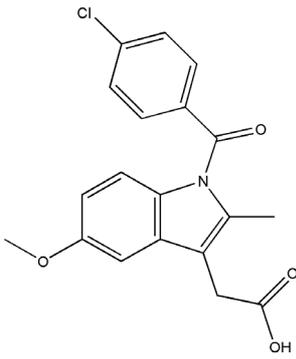
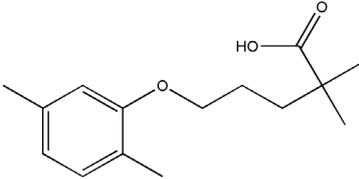
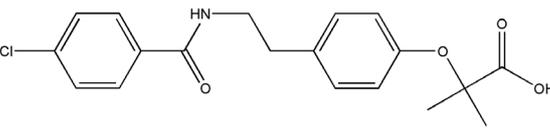
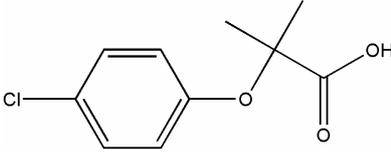
Substanz	Name	Struktur
10	Diclofenac (NSAR)	
11	Ibuprofen (NSAR)	
12	Naproxen (NSAR)	
13	Indomethacin (NSAR)	
14	Gemfibrozil (Lipidsenker)	
15	Bezafibrat (Lipidsenker)	
16	Clofibrinsäure (Lipidsenker)	

Tabelle 3.3: Wirkstoffe aus der Gruppe der NSAR und Lipidsenker

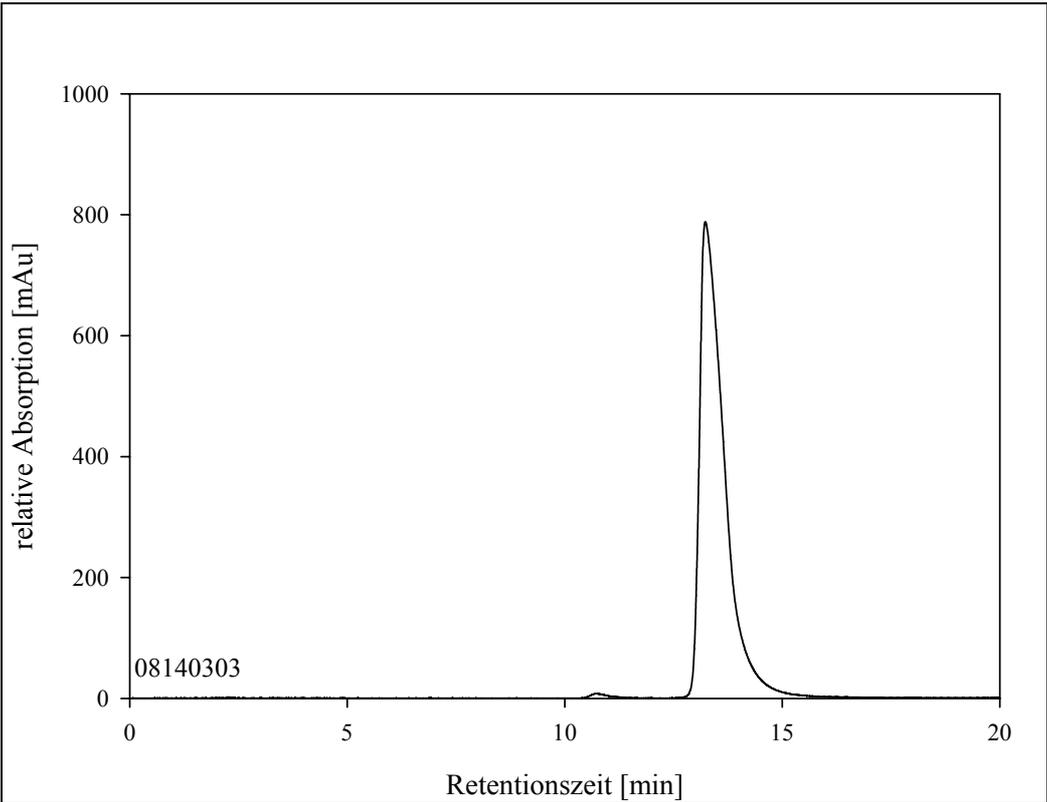


Abb.3.11: Chromatogramm einer Wirkstoffmischung bei pH 2,2

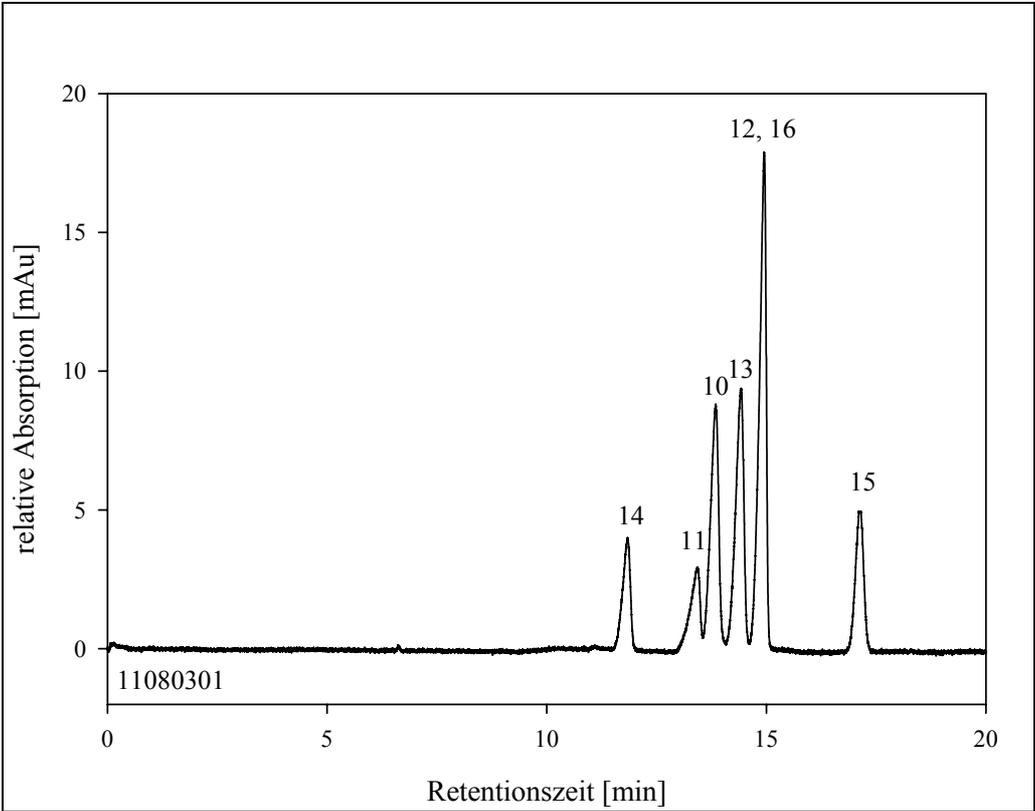


Abb. 3.12: Chromatogramm einer Wirkstoffmischung bei pH 4,6

3.1.3.3 Trennung einer PAK-Mischung an einer BS-C23-Phase

Eine weitere interessante Variation der Trennsysteme bieten die so genannten „polar embedded“-Phasen. Diese Phasen wurden ursprünglich für die HPLC entwickelt. Aufgrund einer polaren Funktionalität in den Alkylketten nahe der Silikaoberfläche der Teilchen sind diese besonders für mobile Phasen geeignet, die einen hohen Anteil an Wasser besitzen. So sind Messungen mit C₁₈-Ketten bei 100 % Wasseranteil möglich. Die verwendete Stability-BS-C23 Phase der Dr. Maisch GmbH (Ammerbuch-Entringen, Deutschland) besitzt eine Aminfunktion an der C₁₈-Kette und ist „endcapped“.

Beim Einsatz dieser Phase in der CEC kommt es zur Umkehr des EOF aufgrund der positiv geladenen Amingruppe in der Alkylkette. Der Versuch die Wirkstoffmischung aus Tabelle 3.3 zu trennen verlief erfolglos. Die Substanzen waren nicht, oder nur mit sehr starkem Tailing detektierbar. Eine Erklärung konnte trotz der Erfahrung und Erfolge mit der Aminphase nicht gefunden werden. Die gegenüber der Aminphase wesentlich größere Lipophilie der BS-C23-Phase wurde in nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt um völlig unpolare Substanzen, wie polyaromatische Kohlenwasserstoffe, zu trennen. Dazu wurde eine getaperte Kapillare mit 25 cm gepackter Länge (Gesamtlänge: 35 cm) und einem Innendurchmesser von 75 µm verwendet. Als Packungsmaterial diente 5 µm BS-C23. Der Elektrolyt bestand aus 80 % Acetonitril und 20 % 5 mM Phosphat-Puffer, pH 2,5. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch mit –5 kV für 3 Sekunden, und die Trennungsspannung betrug –20 kV.

Abbildung 3.13 zeigt die sehr schnelle und gute Trennung einer PAK-Mischung mit anodisch gerichtetem EOF. Die lipophile Wechselwirkung ist erwartet groß, und das Ergebnis lässt sich mit den Trennungen auf der ODS 1-Phase vergleichen. Für Substanzen, die bei einem niedrigen pH-Wert protoniert vorliegen, bietet diese Phase eine vielversprechende Einsatzmöglichkeit. Gerade der starke EOF garantiert kurze Analysezeiten.

3.1.3.4 Fazit zu den partikulär gepackten Phasen

Der große Aufwand, den die CEC mit partikulär gepackten Phasen darstellt, kann für unpolare neutrale Substanzen lohnend sein. Die Gruppe der PAK lässt sich mit den selbst hergestellten Kapillaren isokratisch schnell trennen und die erreichten Bodenzahlen übertreffen die Möglichkeiten der HPLC bei weitem. Erfahrung ist notwendig, um die Kapillaren reproduzierbar zu packen. Die entwickelte Technik zur Herstellung von verjüngten Kapillaren vereinfacht den Gesamtaufwand. Das auch bei diesem Kapillartyp auftretende Problem der Luftblasenbildung kann dadurch behoben werden, dass das System unter Druck gehalten wird. Die routinemäßige Kopplung mit massenspektrometrischen Detektoren ist

jedoch nicht möglich. Des Weiteren ist der Methode durch die Zerbrechlichkeit der Kapillaren und der häufigen Luftblasenbildung eine geringe Robustheit gegeben, welche die Routineanalytik mit der CEC als ungeeignet erscheinen lässt. Für verschiedene Aufgaben im Forschungsbereich bleibt die CEC mit partikulären Phasen jedoch interessant.

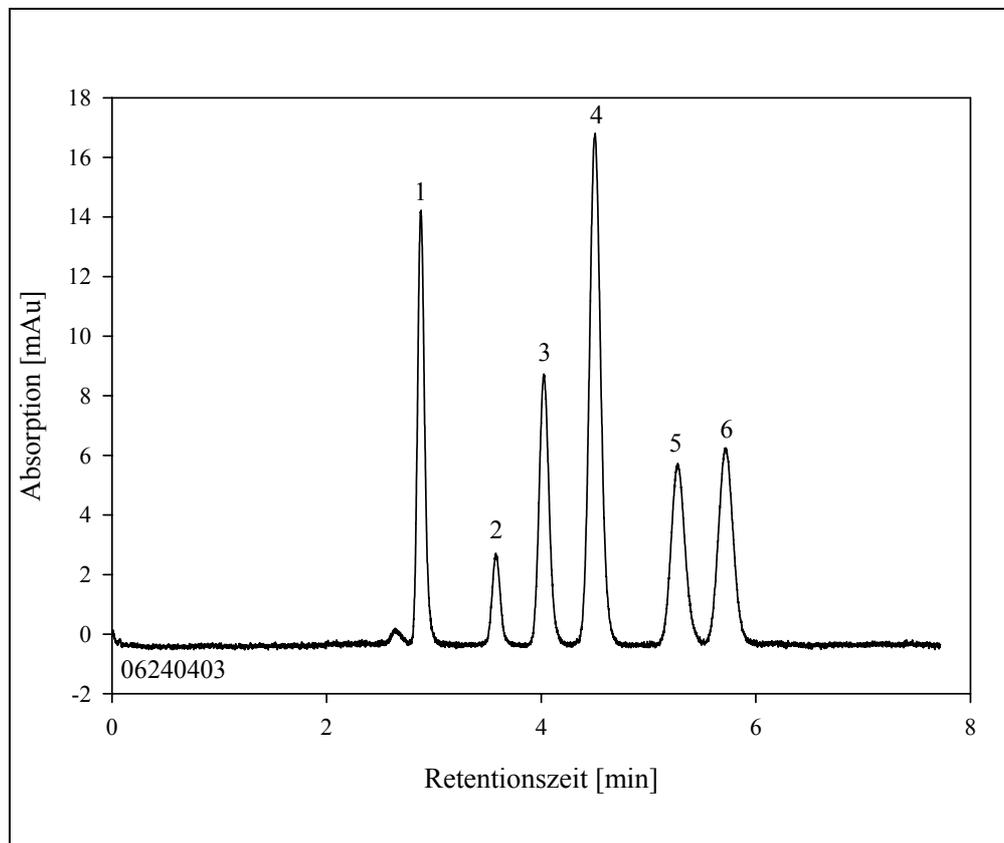


Abb. 3.13: Trennung einer PAK-Mischung an einer BS-C23-Phase
Thioharnstoff (1), Naphthalin (2), Fluoren (3), Phenanthren (4), Fluoranthren (5) und Pyren (6)

3.2 Monolithische Kapillaren für die CEC

Die beschriebenen Probleme der CEC mit partikulär gepackten Kapillaren haben zu Alternativmethoden geführt. Zu den wohl vielversprechendsten Entwicklungen zählen monolithische Kapillaren, bei denen die stationäre Phase *in situ* polymerisiert wird. Diese monolithischen Kapillaren scheinen den partikulär gepackten Kapillaren überlegen zu sein. So ist insbesondere die Bildung von Luftblasen reduziert, was Kopplungen zwischen CEC und MS vereinfacht. Des Weiteren ist auch die Herstellung hoch selektiver Phasen möglich – den MIPs. Obwohl jede MIP-Trennung eine eigene Phase erfordert, besteht der Vorteil darin, dass sich sehr schnelle und selektive Trennungen erreichen lassen und dass auch die Trennung von racemischen Gemischen kein Problem darstellt.

3.2.1 Molecular Imprinted Polymer - MIP

Mit Hilfe der Molecular Imprinting-Technik ist es gelungen neue stationäre Phase zu erzeugen, die eine bei der Herstellung festlegbare Selektivität besitzen. Viele der literaturbekannten MIP-Arbeiten wurden mit dem Ziel der Enantiomerentrennung von Wirkstoffen der Pharmaindustrie durchgeführt.

Wie in der Einleitung bereits vorgestellt, unterscheiden sich verschiedene MIP-Phasen durch die Art der Bindung zwischen stationärer Phase und Analyten (siehe auch monolithische Kapillaren in Kapitel 1.1.4.2). Wie bei allen Arbeiten in der CEC mit MIPs wurden auch in dieser Arbeit nicht-kovalente Bindungen ausgenutzt. Es wurde eine *in situ* Polymerisierung in Kapillaren mit 75 µm Innendurchmesser durchgeführt. Durch die UV-durchlässige Ummantelung (Teflon) der Kapillaren war eine photoinitierte Polymerisierung möglich. Zur Bindung der Phase an die Kapillarwand wurde diese zunächst mit 3-trimethoxysilylpropyl-Methacrylat (Bindesilan) belegt (Vorschrift siehe Kapitel 5.1). Zuvor wurde die Kapillare mit NaOH aktiviert, um das Silan effektiv an die Kapillarwand zu binden. Die Doppelbindung des eingesetzten Silans stellt bei der Polymerisierung eine kovalente Bindung mit dem Polymer her. Diese kovalente Bindung verhindert ein Schrumpfen und Ausspülen der stationären Phase.

Zur Herstellung und Überprüfung der Leistungsfähigkeit einer selbst hergestellten MIP-Kapillare für S-Propranolol wurde die von SCHWEITZ und NILSSON beschriebene Methode angewandt [134]. Danach enthielt die Monomerenmischung:

- Methacrylsäure (MAA)
- Methylmethacrylat (MMA)
- [1,1,1-Tris(hydroxymethyl)-propantrimethacrylat] (TRIM)
- S-Propranolol als Templat
- 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN) als Radikalstarter

Als Radikalstarter wurde AIBN eingesetzt, das sich unter UV-Einwirkung in Radikale zersetzt. Der Vorteil der photoinitierten Polymerisation ist, dass das spätere Detektionsfenster der Kapillaren lediglich mit einem UV-undurchlässigen Material abgedeckt werden muss (z. B. mit einer PVC-Hülse oder Alufolie) und die Polymerisation auch unter 0 °C durchgeführt werden kann. Durch die niedrige Temperatur wird den Monomeren viel Zeit gegeben, sich nach den Templaten auszurichten, was die Selektivität verbessert.

Die Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase beruhen unter anderem auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Wenn während der Polymerisation im

Reaktionsgemisch Wasser vorhanden ist, wird die selektive Ausbildung von Brückenbindungen zwischen Phase und Analyten stark gestört. Deshalb müssen die verwendeten Lösemittel vor Verwendung mit Hilfe eines aktivierten Molekularsiebes getrocknet werden. Nach Mischung der Monomeren wurde die Lösung in die Kapillare gefüllt und mit viskosem Schliff fett verschlossen, um ein Verdampfen zu verhindern. Die Kapillare wurde am späteren Detektionsfenster mit Hilfe einer PVC-Hülse abgedeckt und in ein auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiertes Tiefkühlfach gelegt. Nach 15 Minuten wurde eine UV-Lampe ($\lambda = 254\text{ nm}$) eingeschaltet. Diese Wartezeit ist erforderlich, damit die gefüllte Kapillare komplett auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abkühlen kann. Die UV-Strahlung zersetzt das photolabile AIBN und die Polymerisation startet.

Nach erfolgter Polymerisation über Nacht wurden die nicht vernetzten Monomere und das Templat aus der Kapillare gespült und die Kapillare anschließend mit Elektrolyt konditioniert. Die so hergestellte Kapillare ist bis auf den abgedeckten Teil (Detektionsfenster) mit stationärer Phase gefüllt und für die CEC einsatzbereit.

Als Elektrolyt wurde gemäß [134] eine Mischung aus 80 % Acetonitril und 20 % 25 mM Triethanolaminphosphat-Puffer, pH 3,0 eingesetzt. Elektrokinetisch wurde eine $500\text{ }\mu\text{M}$ racemische Propranolol-Lösung mit 5 kV für 10 Sekunden injiziert. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 15 kV und einer Temperatur von $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Abbildung 3.14 zeigt in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von SCHWEITZ und NILSSON [134] die Leistungsfähigkeit

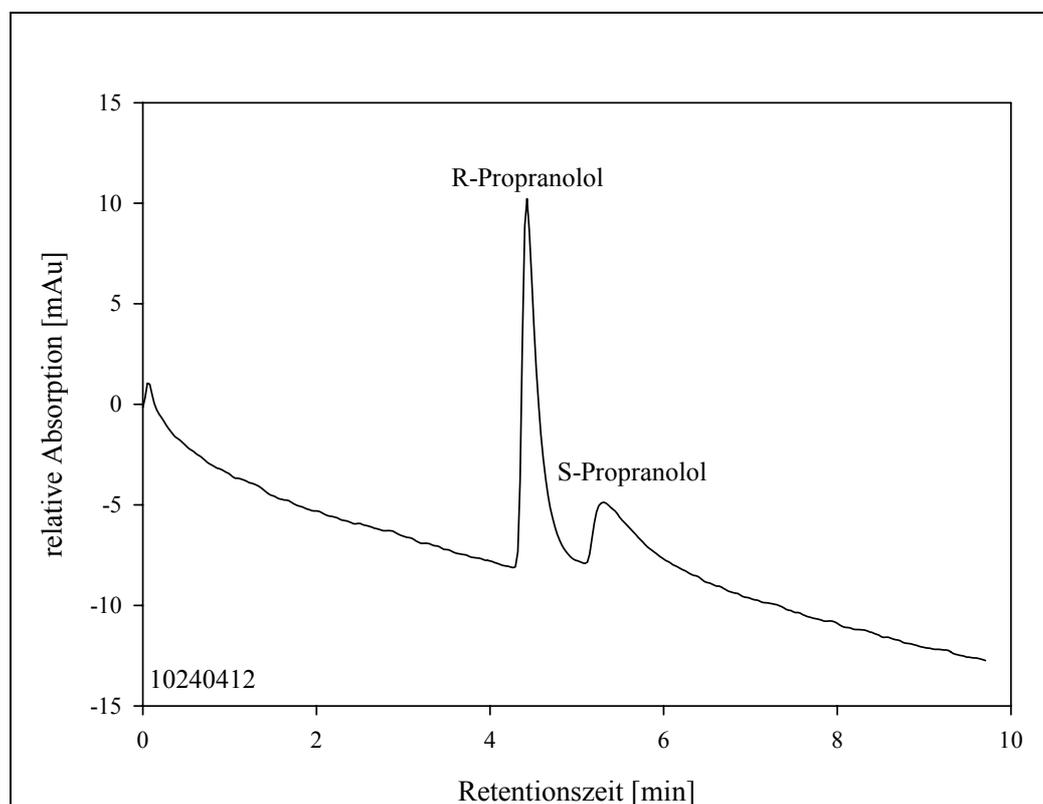


Abb. 3.14: Trennung von racemischen Propranolol; S-Propranolol als Templat, Detektion bei 215 nm.

der Kapillare. Die größere Retentionszeit von S-Propranolol erklärt sich mit der stärkeren Wechselwirkung des als Templat eingesetzten S-Enantiomers. Nachteilig bei der Verwendung der MIP-Technik ist das methodentypische Tailing des Templaten. Allerdings erhält man mit einfachen Mitteln eine hoch selektive Phase

Die Selektivität der MIP-Technik sollte nun genutzt werden, um Substanzen mit ähnlicher Struktur zu trennen. So wurde versucht, Cotinin in einer Mischung mit Nikotin und Myosmin zu analysieren. Cotinin ist der Hauptmetabolit von Nikotin und wird über den Urin aus dem Körper ausgeschieden. Zum detaillierten Metabolisierungsweg sei auf den Review von HUKKANEN verwiesen [135]. Cotinin wird häufig als Markersubstanz verwendet, um das Rauchverhalten von Patienten zu überwachen [136]. Aus analytischer Sicht hat es gegenüber dem Nikotin den Vorteil, dass es eine 10-fach höhere Halbwertszeit besitzt und deshalb länger nachweisbar ist [137]. So kann der Nachweis von Cotinin beispielsweise in Studien genutzt werden, um Raucher von Nichtrauchern zu unterscheiden. Myosmin ist ein weiterer Metabolit von Nikotin. Die Strukturen sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

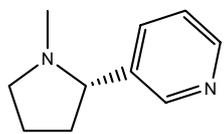
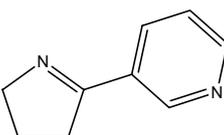
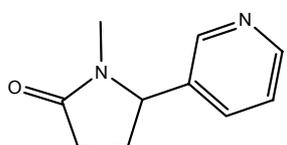
Substanz	Name	Struktur
17	Nikotin	
18	Myosmin	
19	Cotinin	

Tabelle 3.4: Strukturen von Nikotin, Myosmin und Cotinin

Die Polymerisationsbedingungen wurden im Vergleich zum Propranolol-Versuch nicht verändert. Lediglich das Templat Propranolol wurde durch Cotinin ersetzt. Cotinin sollte demnach die stärkste Wechselwirkung zeigen. Da die Selektivität auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beruht, ist Cotinin kein idealer Kandidat für eine MIP-Wechselwirkung. Die Möglichkeiten der drei strukturverwandten Substanzen Wechselwirkungen mit der stationären Phase einzugehen, sind daher begrenzt.

Abbildung 3.15 zeigt das Chromatogramm einer Probe ($c(17) = 6,2 \text{ mM}$, $c(18) = 6,8 \text{ mM}$, $c(19) = 5,7 \text{ mM}$), die mit 50 mbar für 10 Sekunden injiziert wurde. Die Trennung erfolgte bei 15 kV und $60 \text{ }^\circ\text{C}$, als Elektrolyt wurde eine Mischung aus 80 % Acetonitril und 20 % 25 mM Triethanolaminphosphat-Puffer, pH 3,0 eingesetzt. Erwartungsgemäß ist die Wechselwirkung des Templaten **19** mit der stationären Phase am stärksten. Die strukturverwandten Verbindungen **17** und **18** werden aufgrund geringerer Wechselwirkungen zuerst eluiert. Für alle drei Verbindungen konnte eine gute Trennung erreicht werden. Wie bei den MIP-Trennungen üblich, zeigen die Peaks ein leichtes Tailing. Die schlechte Peakform des Myosmin ist nicht zu erklären. Von einer Überladung der Phase kann nicht ausgegangen werden, da auch weitere Verdünnungen der Analyten gleiche Peakformen erzeugten. Mittels UC-Detektion ($\lambda=214\text{nm}$) konnten Gehalte der reinen Standards bis zu $0,2 \text{ g/L}$ ($\sim 1,3 \text{ mM}$) nachgewiesen werden.

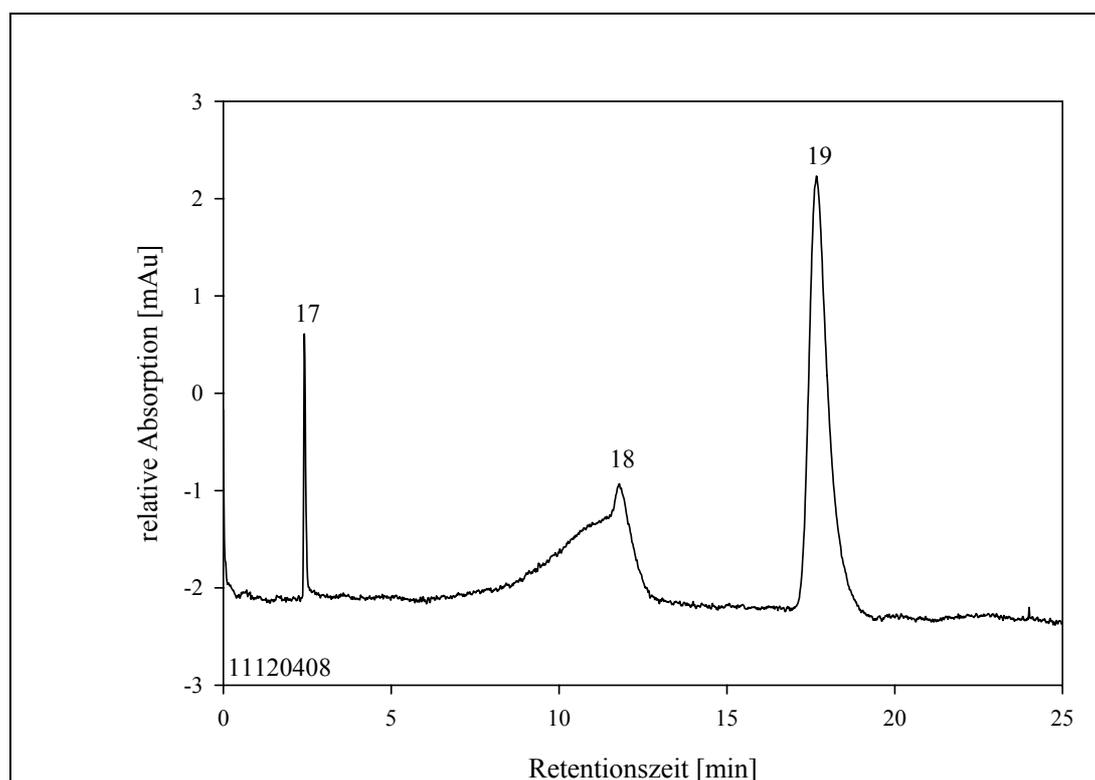


Abb. 3.15: Trennung von Nikotin (**17**), Myosmin (**18**), Cotinin (**19**) auf einer MIP Kapillare

Mit Hilfe der hergestellten Kapillare wurde versucht, Cotinin im Urin von Rauchern nachzuweisen. Die erwarteten Cotiningehalte liegen bei $0,5$ bis 2 mg/L [138], weshalb eine Anreicherung der Proben mittels SPE erforderlich war. Dazu wurde eine Morgenurin-Probe eines Rauchers zunächst zentrifugiert und 30 mL des Überstands mit Hilfe einer Nexus SPE-Kartusche der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) angereichert, und anschließend mit MeOH eluiert. Das Eluat wurde bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in $30 \mu\text{L}$

Elektrolyt aufgenommen. Diese Lösung wurde dann mit der oben beschriebenen Methode untersucht. Das erhaltene Chromatogramm zeigte, wie erwartet, viele Signale zu Beginn, da die in der Matrix enthaltenen Substanzen eine schlechtere Wechselwirkung mit der stationären Phase besitzen als das Templat Cotinin. Cotinin selbst konnte nicht detektiert werden. Vermutlich war die Sensitivität trotz der vorgenommenen Anreicherung nicht ausreichend.

Fazit:

Es konnte eine MIP-Phase hergestellt werden, die sich trotz der geringen Wechselwirkungsmöglichkeiten zum Cotinin durch eine hohe Selektivität auszeichnete. Ihr Einsatz in der CEC ist aufgrund des Säulenblutens, des Tailings und der notwendigen Anreicherung bei Realproben im Vergleich zu bekannten HPLC [139]-, GC- und Immunassay-Methoden [140] nicht sinnvoll. Aufgrund der hohen Selektivität dieser Phase erscheint aber eine verstärkte Anwendung im Bereich der Festphasenextraktion sinnvoll, wie sie für Propranolol bereits gezeigt werden konnte [141]. Der Einsatz von MIP-Kapillaren oder MIP-SPE-Kartuschen in der Spurenanalytik muss aber generell kritisch betrachtet werden, da bei der Herstellung des Polymers große Mengen des späteren Analyten in der Phase vorhanden sind. Es ist sehr schwierig, diese rückstandsfrei aus der Kapillare zu entfernen, so dass ein ständiges Ausbluten des Analyten auftritt, was falschpositive Gehalte vortäuschen kann.

3.2.2 Monolithische Kapillaren auf Basis wasserlöslicher Acrylamid-Monomere

Um Monolithen für die CEC herzustellen, wurde eine *in situ* Polymerisierung basierend auf der Veröffentlichung von HOEGGER und FREITAG [83] genutzt. Da PAKs getrennt werden sollten, musste eine möglichst unpolare Phase hergestellt werden. Dies ist bei der Verwendung von wasserlöslichen Monomeren aber nur begrenzt möglich. Nach Belegen der Kapillare mit Bindsilan, um eine kovalente Bindung des Polymers zur Kapillarwand zu ermöglichen, wurden zur Polymerisation eingesetzt:

- Piperazindiacrylamid (PDA) als Crosslinker
- Isopropylacrylamid (IPA) als funktionelles Monomer
- Ammoniumsulfat als Porogen
- Ladungsträger (Vinylsulfonsäure (VSA) für kathodischen EOF, Dimethylallylamin (DMAL) für anodischen EOF)

Die Lösung der Substanzen in Phosphatpuffer pH 7,0 wurde zunächst im Ultraschallbad entgast. Dies ist besonders wichtig, damit durch eventuelle Luftblasen keine Fehlstellen in der

Packung entstehen und kein Sauerstoff in der Monomerenmischung vorhanden ist, welcher den Radikalstarter abfangen könnte. Als Radikalstarter diene Ammoniumperoxidisulfat (APS) mit N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator, der eine Polymerisierung bei Raumtemperatur ermöglicht. Der postulierte Mechanismus von GUO *et al.*, bei dem zwei Radikale entstehen [142], ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

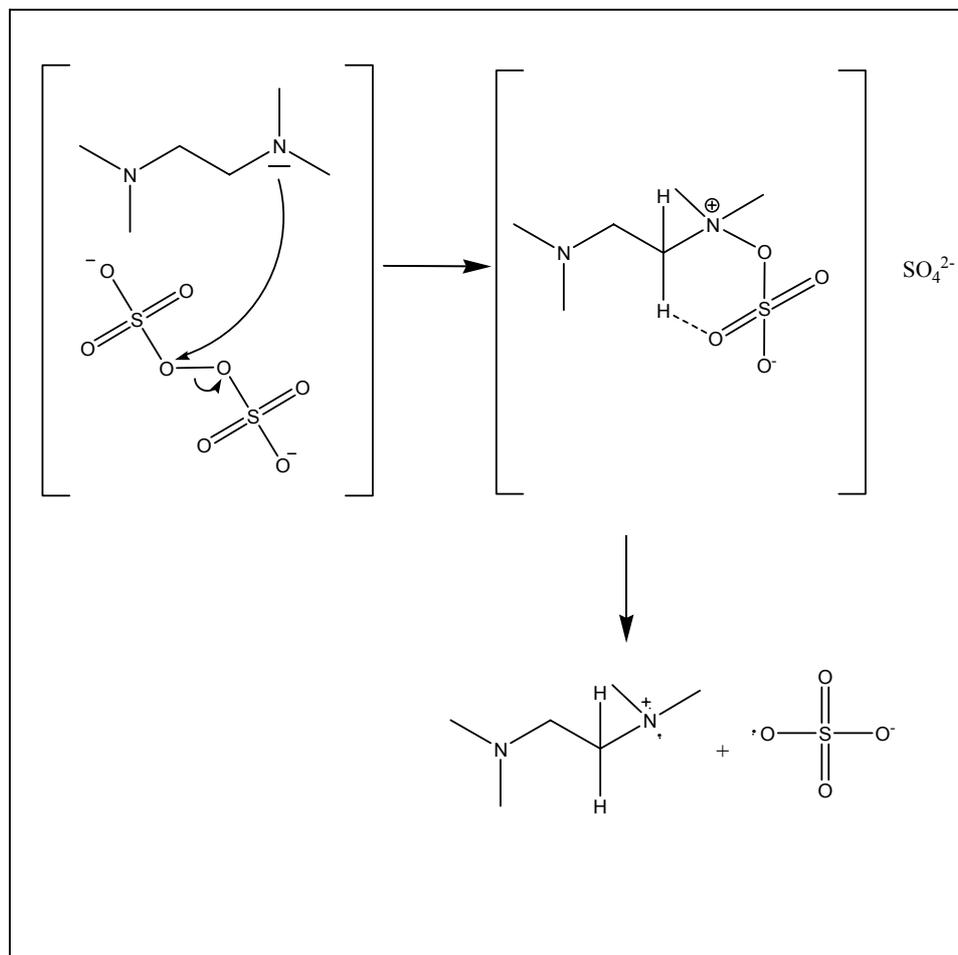


Abb. 3.16 Postulierter Reaktionsmechanismus von APS in Anwesenheit von TEMED

Nach dem Entgasen wurde der Radikalstarter mit Katalysator zur Monomerenmischung gegeben, kurz vermischt und die Kapillare mit der Lösung gefüllt. Dies geschah mit Hilfe einer Belegungsapparatur, mit der über Anlegen eines Druckes das Pre-Polymerisat aus einem Vorratsgefäß in die Kapillare gedrückt wurde (Abb. 3.17). Sobald die Polymerisierung sichtbar im Vorratsgefäß gestartet war, wurde die Kapillare entnommen und die Enden mit Silikonfett versiegelt. Limitierend bei der Herstellung von monolithischen Kapillaren auf Acrylamidbasis ist die Geschwindigkeit der Reaktion. Um eine gleichmäßige Polymerisierung zu erreichen, kann die Kapillare erst nach Zugabe des Radikalstarters gefüllt werden. Bei schnellen Polymerisierungsreaktionen ist es schwierig, die Kapillare vollständig zu füllen. Mit

der verwendeten Reaktionsmischung war es jedoch möglich, 60 cm lange Kapillaren gleichmäßig zu füllen, bevor die Polymerisierung einsetzte.

Nach Reaktion über Nacht (bei Raumtemperatur) wurden die versiegelten Enden abgeschnitten und die Kapillare mit Wasser gespült. Während des Spülvorgangs wurde die Polyimidschicht im Bereich des Detektionsfensters weggeätzt. Da das Polymer UV-Strahlung absorbieren kann, musste es an der Stelle des Detektionsfensters ebenfalls entfernt werden. Dies gelang, indem ein heißer Widerstandsdraht kurz an die Kapillare gehalten wurde. Das Acrylamidpolymer ist thermolabil, so dass beim Erhitzen sofort Pyrolyse einsetzt und das Fenster zur Detektion freigelegt wird.

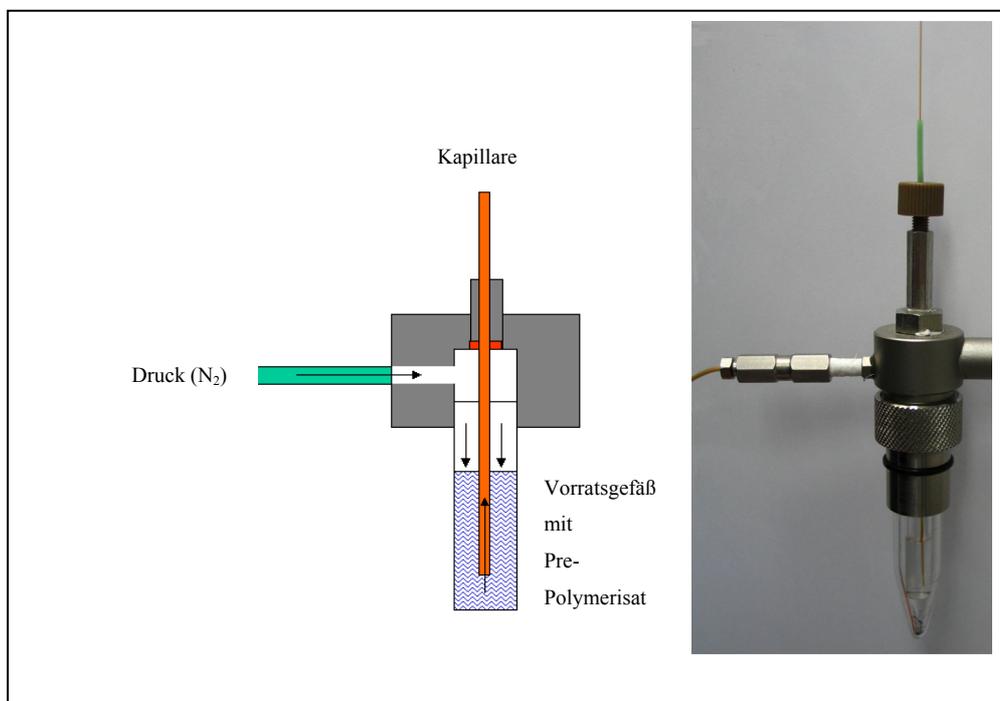


Abb. 3.17: Apparatur zum Befüllen einer Kapillare mit Pre-Polymerisat

Es wurden zwei Kapillaren identischer Konzentration an funktionellem Monomer (IPA) und Vernetzer (PDA), aber unterschiedlichem Ladungsträger hergestellt. Dadurch ergab sich für eine Kapillare ein kathodisch gerichteter EOF (Kapillare 1, VSA als Ladungsträger), für die andere ein anodisch gerichteter EOF (Kapillare 2, DMAL als Ladungsträger).

Beide Kapillaren sollten aufgrund des IPA eine lipophile Wechselwirkung zeigen. Um die Trennleistung zu überprüfen, wurde eine PAK-Mischung aus Naphthalin (2), Fluoren (3), Phenanthren (4), Fluoranthren (5), Pyren (6) und Thioharnstoff (1) als EOF Marker analysiert. Die Analyse mit Kapillare 1 wurde mit einem Elektrolyten bestehend aus einer Mischung von 70 % Methanol, 20 % 25 mM Ammoniumacetat, pH 7,0, und 10 % Millipore-Wasser

durchgeführt. Die PAK-Mischung (Konzentration cirka 5 mM, Einwaage je PAK 1 g/L) wurde elektrokinetisch bei 10 kV für 10 Sekunden injiziert. Die anschließende Analyse erfolgte bei 20 °C und 25 kV mit UV-Detektion ($\lambda = 254 \text{ nm}$) und ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Die lipophile Wechselwirkung ist ausreichend, um eine Trennung nach 22 Minuten zu erreichen. Des Weiteren war es möglich, die Messung ohne Anlegen eines externen Druckes durchzuführen. Als Puffer wurde Ammoniumacetat eingesetzt, der aufgrund seiner Flüchtigkeit besonders gut für später geplante MS-Untersuchungen genutzt werden kann. Die Kapillare zeigte eine gute Druckstabilität, bei den CEC-Messungen war keine Neigung zur Bildung von Luftblasen zu erkennen. Trotz der Tatsache, dass wasserlösliche Monomere eingesetzt wurden, war das entstandene Polymer ausreichend lipophil, um eine PAK-Mischung zu trennen.

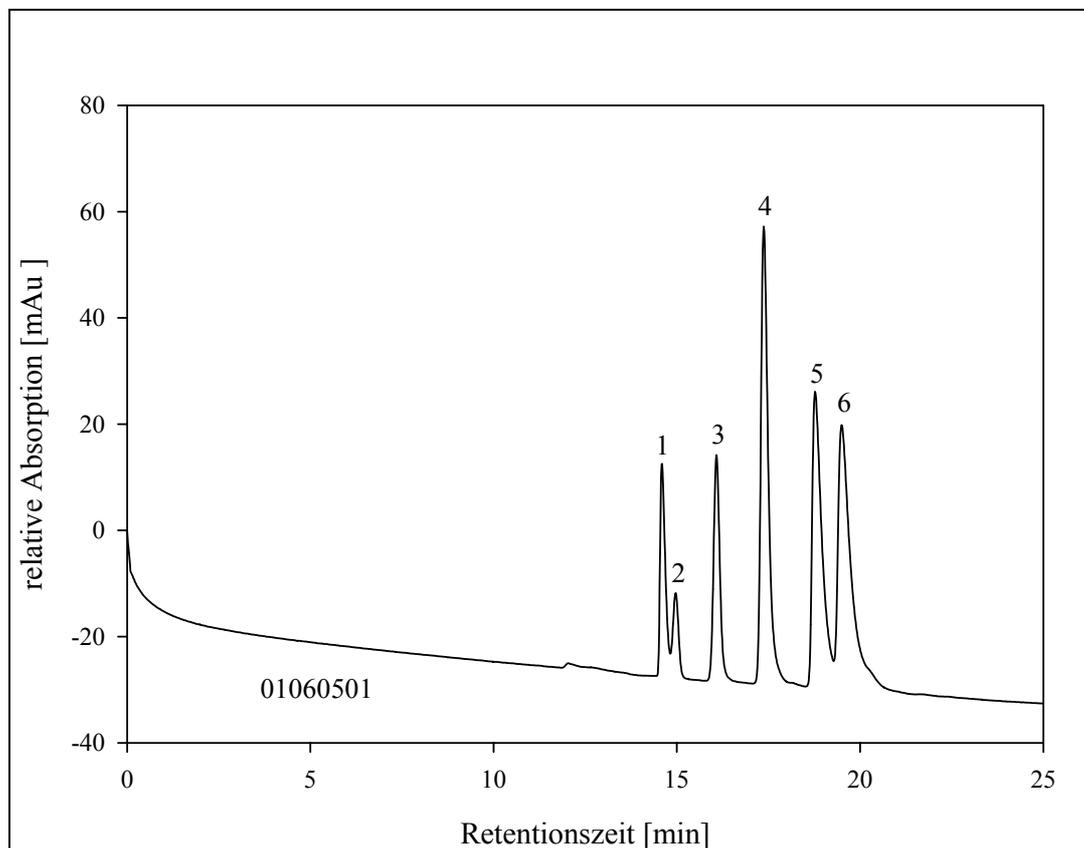


Abb. 3.18: PAK-Trennung an einer Acrylamidphase (Ladungsträger VSA, kathodischer EOF)

Zum Vergleich wurde die Analyse mit Kapillare 2 durchgeführt (Abb. 3.19). Als Elektrolyt wurde eine Mischung aus 80 % Methanol und 20 % 25 mM Triethanolaminphosphat, pH 3,0, eingesetzt. Die PAK-Mischung wurde elektrokinetisch bei -10 kV für 10 Sekunden injiziert. Die anschließende Trennung erfolgte bei 20 °C und -25 kV.

Aus dem Chromatogramm ist zu erkennen, dass die Umkehr des EOF erfolgreich war. Die Trennleistung der Kapillare ist mit dem verwendeten Elektrolyten jedoch unzureichend. Beispielsweise koeluierten der EOF-Marker Thioharnstoff und Naphthalin. Die Tatsache, dass sich die Elutionsreihenfolge der Analyten bei Umkehr des EOF nicht ändert, deutet darauf

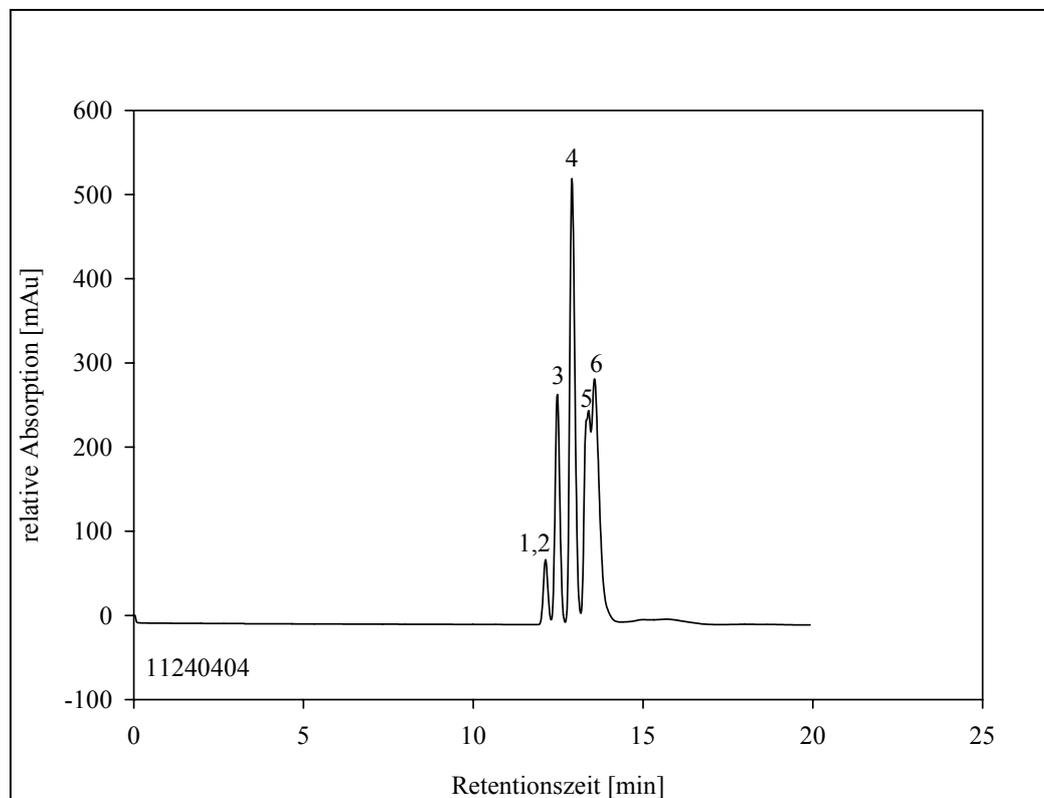


Abb. 3.19: PAK-Trennung an einer Acrylamidphase (Ladungsträger DMAL, anodischer EOF)

hin, dass die Wechselwirkungen lipophiler Art sind. Um dies zu bestätigen, wurde der organische Anteil im Elektrolyten und damit seine Elutionskraft für lipophile Substanzen verringert. Zur Analyse wurde ein Elektrolyt bestehend aus 60 % MeOH, 20 % 25 mM Triethanolaminphosphat, pH 3,0 und 20 % Millipore Wasser eingesetzt. Injiziert wurde elektrokinetisch bei -10 kV für 10 Sekunden und die Trennung erfolgte bei -25 kV. Abbildung 3.20 zeigt erwartungsgemäß die Erhöhung der Retentionszeiten und eine Basislinientrennung der Analyten. Damit konnte die These von HOEGGER und FREITAG bestätigt werden, dass der Trennmechanismus lipophile Wechselwirkungen zurückzuführen ist [83].

Fazit

Die Trennleistung für lipophile Analyten ist gegenüber den zuvor untersuchten ODS-Materialien deutlich schlechter. Jedoch ist vorteilhaft, dass auch Messungen ohne Anlegen eines externen Druckes stabil und damit über einen längeren Zeitraum verlaufen können.

Auch ist die größere Permeabilität positiv, wodurch das Konditionieren und Spülen der Kapillaren vereinfacht wird. Die monolithische Phase auf Acrylamidbasis ist wahrscheinlich

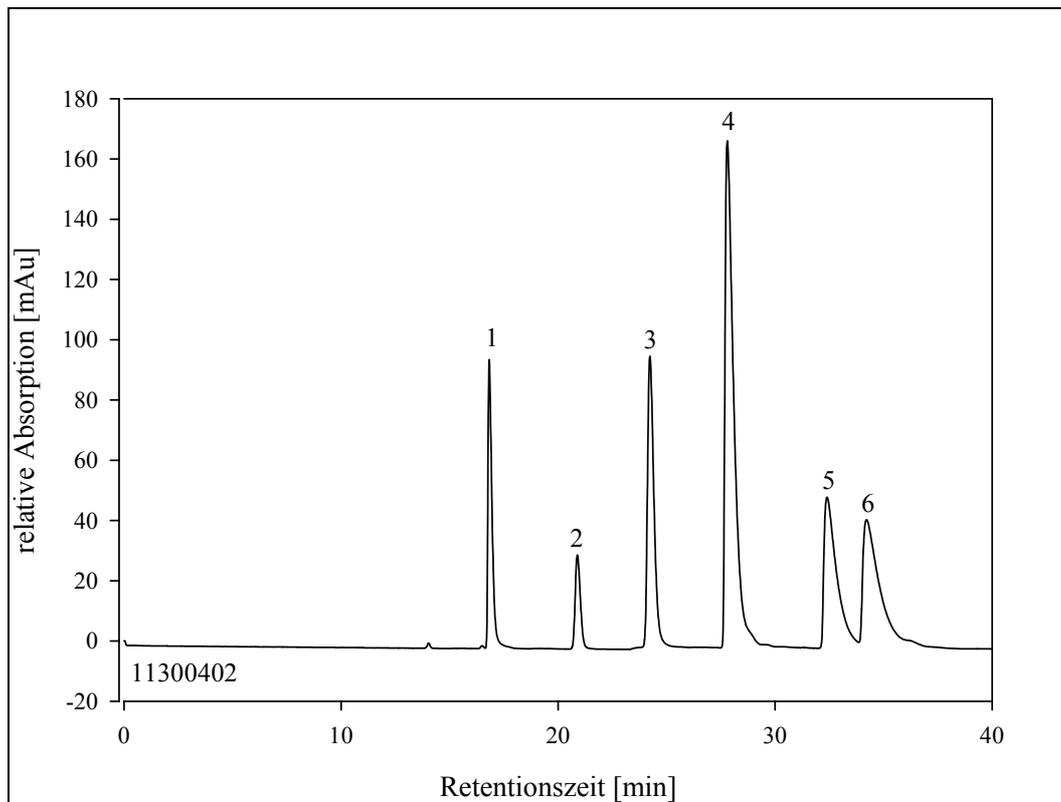


Abb.3.20: Optimierte PAK-Trennung an einer Acrylamidphase (Ladungsträger DMAL, anodischer EOF)

besser als Normalphase zu verwenden, da aufgrund der Wasserlöslichkeit der Monomeren nur eine begrenzte Lipophilie erreicht wird. Dennoch konnten mit den vorhandenen Isopropyl-Gruppen Trennungen von PAKs verwirklicht werden.

Ein weiterer Vorteil von Polymeren auf Acrylamidbasis ist die gleichmäßige Verteilung von Ladungsträgern an der Oberfläche. Ein pH-Wert von größer 7, wie er zur Erzeugung eines großen EOF bei Silikaphasen benötigt wird, ist nicht unbedingt erforderlich, da die genutzten Sulfonsäure-Gruppen auch bei tieferen pH-Werten noch deprotoniert vorliegen und einen zufriedenstellenden EOF erzeugen. Dies ermöglicht eine größere Flexibilität bei der Elektrolytwahl für MS-Kopplungen. Zusätzlich kann der EOF durch Verwendung von Aminen als Ladungsträger sehr wirksam umgekehrt werden. Die Phase ist vielseitig einsetzbar und kann eventuellen Trennproblemen angepasst werden. Hierbei ist einschränkend zu bemerken, dass die Problemlösung in der Literatur oftmals empirisch erfolgt. Eine Vorhersage, wie sich eine Veränderung der Monomerenzusammensetzung auf und die Morphologie des Polymers und die Trennleistung auswirkt, ist derzeit nur schwer möglich.

3.2.3 Monolithen auf Silikabasis

Monolithen auf Silikabasis sind nur schwer reproduzierbar herzustellen. Für die HPLC werden jedoch von der Firma Merck (Darmstadt) Chromolith CapROD-Kapillaren angeboten, die eine C₁₈-Funktionalität besitzen. Diese Kapillaren werden in Anlehnung an eine Vorschrift von TANAKA [68] hergestellt und zeigen hervorragende lipophile Eigenschaften. Im Gegensatz zur HPLC müssen in der CEC Kapillaren ohne endcapping eingesetzt werden, damit sich ein EOF generieren lässt.

3.2.3.1 Trennung von PAKs und UV-Detektion

Um die Leistungsfähigkeit des Monolithen mit den partikulären Phasen zu vergleichen, wurde zunächst eine PAK-Mischung auf einer 25 cm langen CapROD-Säule getrennt und ein UV-Detektor eingesetzt. Zur einfachen Detektion, wurde die komplett gefüllte Kapillare mit einer freien Kapillare gekoppelt. Die Kopplung dieser beiden Kapillaren erfolgte mit einer PVC-ummantelten Teflonhülle (Abb. 3.21), wie sie von SCHMITZ *et al.* zur totvolumenfreien Kopplung zweier Kapillaren verwendet wurde [143].

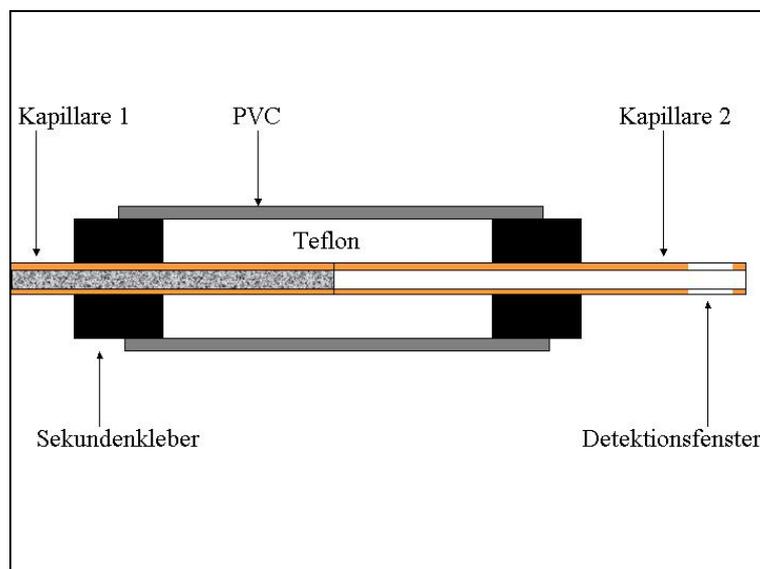


Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Kapillarkopplung

Kapillare 1 = monolithische Kapillare (ID = 100 µm); Kapillare 2 = freie Kapillare (ID = 75 µm) mit Detektionsfenster

Zur Analyse wurde eine PAK-Mischung bestehend aus je 1 g/l Naphtalin (2), Fluoren (3), Fluoranthen (5), Pyren (6), Anthracen (20) und Benz[a]pyren (21) im Trennelektrolyten gelöst. Dieser bestand aus 80 % Acetonitril und 20 % 5 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 8,0. Injiziert wurde elektrokinetisch mit 5 kV für 3 Sekunden, die Trennungsspannung betrug 30 kV.

Das in Abbildung 3.22 dargestellte Chromatogramm zeigt die Basislinientrennung der PAKs mit Hilfe der CapROD-RP-18-Kapillare in nur 12 Minuten. Wie erwartet besitzt die Kapillare gute Trenneigenschaften für lipophile Verbindungen und erzeugt aufgrund des fehlenden Endcappings einen starken EOF. Die Bildung von Luftblasen ist stark reduziert und die Kapillare somit hervorragend für die Analyse lipophiler Analyten mittels CEC geeignet.

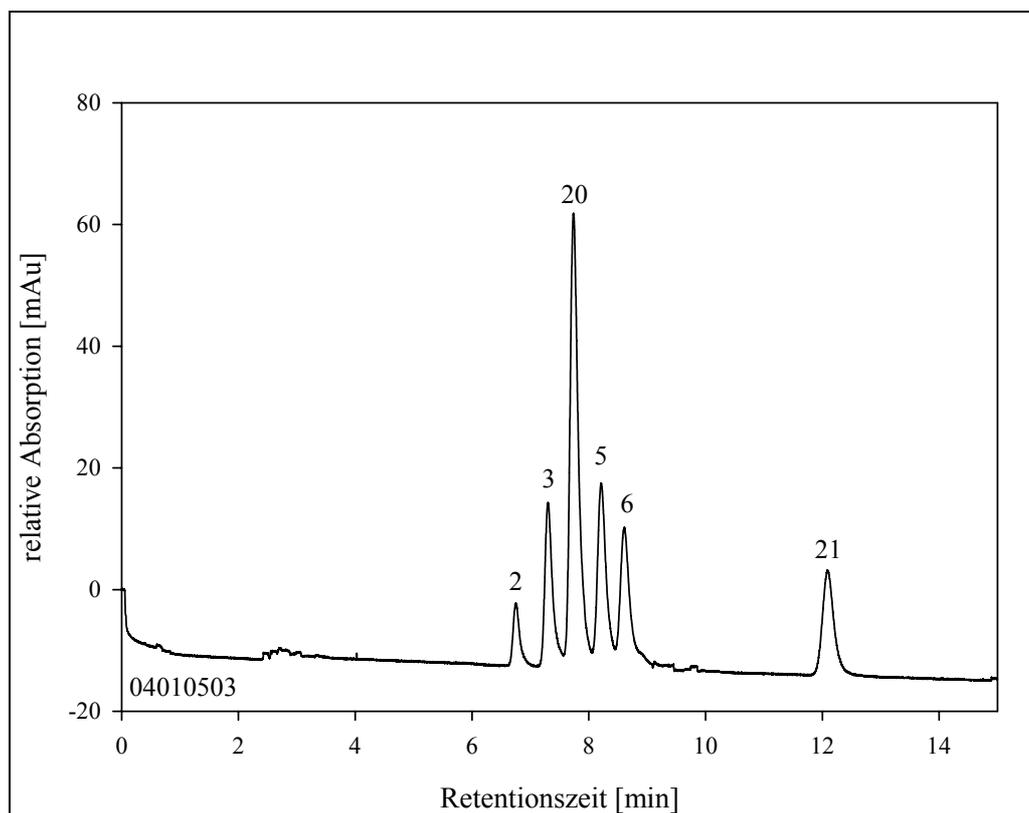


Abb. 3.22: Trennung der PAKs mit CapROD Kapillare

3.2.3.2 Trennung von derivatisierten Wirkstoffen und LIF-Detektion

Wie bei den MIP-Untersuchungen in Kapitel 3.2.1 festgestellt wurde, ist eine der größten Limitationen in der CEC die schlechte Sensitivität. Dieses Problem könnte beispielsweise durch den Einsatz von LIF-Detektoren gelöst werden (siehe Kapitel 1.1.5.2). Um auch Substanzen ohne native Fluoreszenz detektieren zu können, sind aber oft Derivatisierungen mit einem Fluoreszenzmarker erforderlich.

Die in Kapitel 3.1.3.1 untersuchten Wirkstoffe haben, wie dort bereits erwähnt, eine große Bedeutung für die Belastung von Gewässern mit anthropogenen Stoffen. In der Arbeit von MÖSCHTER [144] wurden die Wirkstoffe zur Verbesserung der Nachweisgrenze mit einem Fluoreszenzmarker derivatisiert. Aus den dort analysierten Wirkstoffen wurden Naproxen, Bezafibrat, Ibuprofen und Clofibrinsäure beispielhaft ausgewählt. Wie aus der Reaktionsgleichung in Abbildung 3.23 zu entnehmen ist, sind die derivatisierten Arzneimittel

neutral, und eine Trennung mit Hilfe der CZE ist nicht mehr möglich. Deshalb wurde in der Arbeit von MÖSCHTER die MEKC zur Trennung eingesetzt. Alternativ sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob die CEC mit dem CapROD-Monolithen ebenfalls zur Trennung der derivatisierten Wirkstoffe geeignet ist.

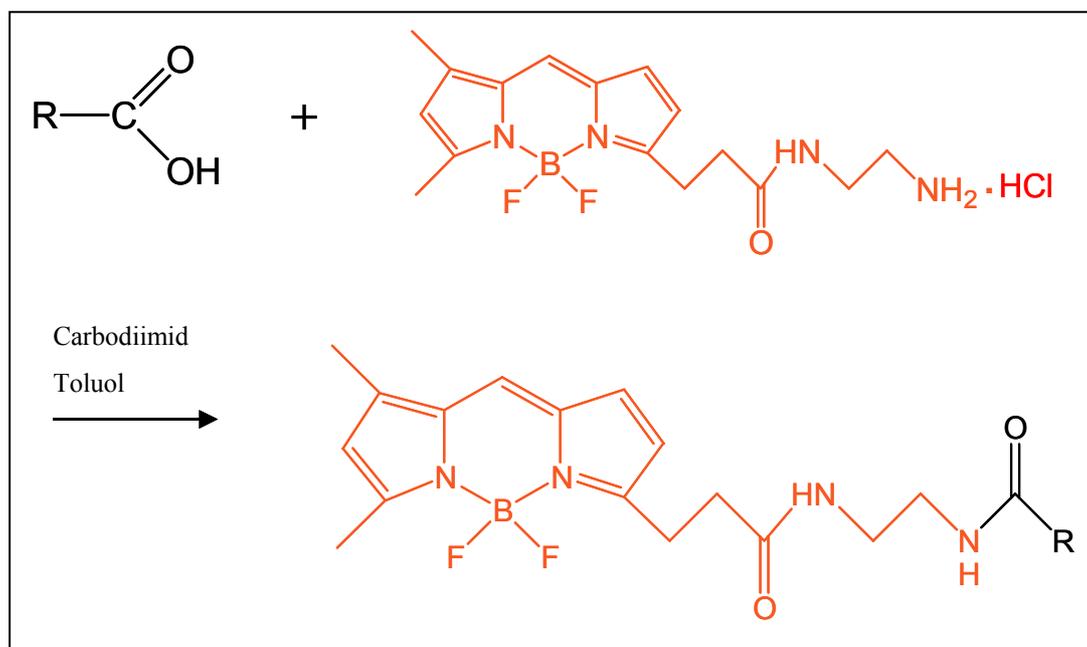


Abb. 3.23 : Derivatisierungsreaktion von BODIPY FL EDTA mit Wirkstoffen nach MÖSCHTER [144]

Als Detektor wurde ein externer LIF-Detektor der Firma Picometrics mit einem Ar-Ionen Laser ($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$) verwendet. Die Kapillare wurde wie in Abbildung 3.24 gezeigt mit einer freien Kapillare verlängert, um eine problemlose online Detektion zu ermöglichen. Die eingesetzte Chromolith CapROD-RP-18-Kapillare hatte eine Länge von 55 cm und einen Innendurchmesser von 100 μm und wurde mit einer 10 cm langen Detektionskapillare mit einem I.D. von 75 μm verlängert. Der reduzierte Durchmesser der freien Kapillare soll einen konstanten Volumenstrom zum Detektor ermöglichen, da die monolithische Kapillare Packungsmaterial enthält. So wird eine Durchmischung gerade getrennter Analyten am Detektor verhindert. Es wurden Lösungen je 250 μM Wirkstoff derivatisiert und der optimierte Elektrolyt bestand aus 50 % Acetonitril, 20 % 5 mM Phosphatpuffer, pH 8,0 und 30 % Millipore-Wasser. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch mit 25 kV für 5 Sekunden. Das in Abbildung 3.26 gezeigte Chromatogramm bestätigt die hohe Selektivität der Phase, die sich durch gute Effizienz, selbst bei langen Analysenzeiten, auszeichnet. Die Nachweisgrenze betrug 25 μM . Aufgrund der großen Permeabilität der monolithischen Struktur ist bei der CapROD-Kapillare im Gegensatz zu partikulär gepackten Kapillaren auch eine

Druckinjektion möglich. Mit einer Druckinjektion (10 bar für 1 Minute) konnte die Nachweisgrenze um den Faktor 5 auf 5 μM gesenkt werden (Abb. 3.26).

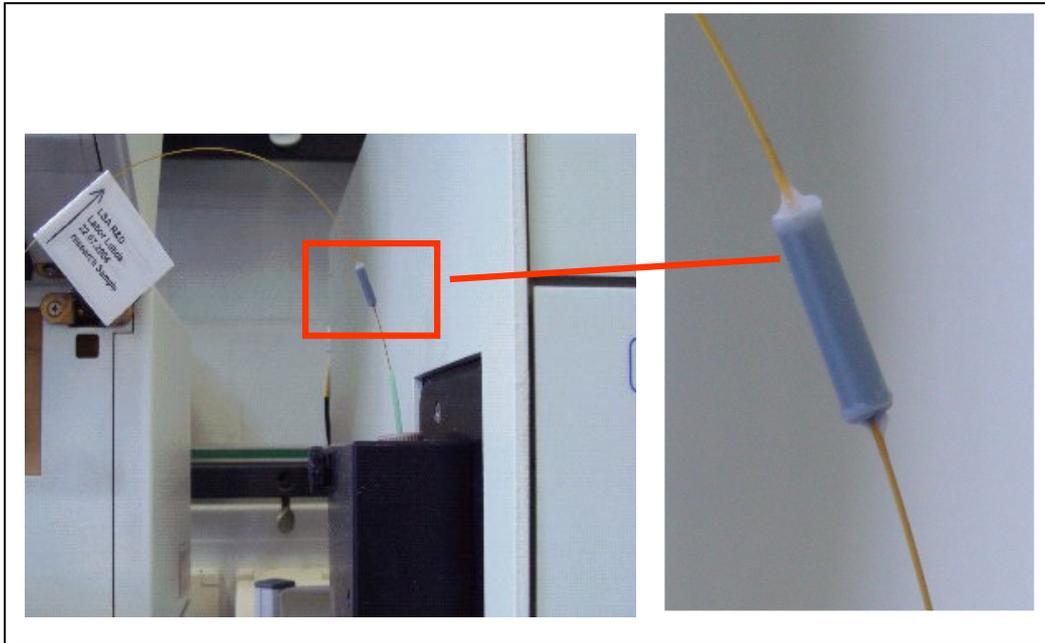


Abb. 3.24: Kopplung der monolithischen Kapillare mit einer freien Kapillare zur LIF-Detektion

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Derivatisierung nicht vollständig verläuft und die Nachweisgrenze der reinen BODIPY-Derivate noch deutlich besser sein sollte. Um die Analysenzeiten zu reduzieren wurde die CapROD-Kapillare um 5 cm gekürzt (vgl. Abb. 3.25 und 3.26). Durch die Druckinjektion wandern die Substanzen schon eine gewisse Strecke in die Kapillare hinein. Die Trennstrecke ist somit kürzer, und die Retentionszeiten sind dementsprechend kleiner.

Vergleich von monolithischer und partikulärer Kapillare und Fazit:

Mit der Kopplung der CapROD-Kapillare an den LIF-Detektor war eine empfindliche Detektion der derivatisierten Wirkstoffe möglich. Unbefriedigend war die lange Analysenzeit, die eine Folge der Kapillarlängen war. Bei dem verwendeten Design des externen Detektors waren Gesamtkapillarlängen von 60 cm notwendig. Auch wenn die monolithischen gegenüber den partikulären Kapillaren deutlich weniger anfällig für Luftblasenbildung sind, kann es bei sehr langen Analysen vorteilhaft sein, einen externen Druck auf Ein- und Auslassgefäß zu legen.

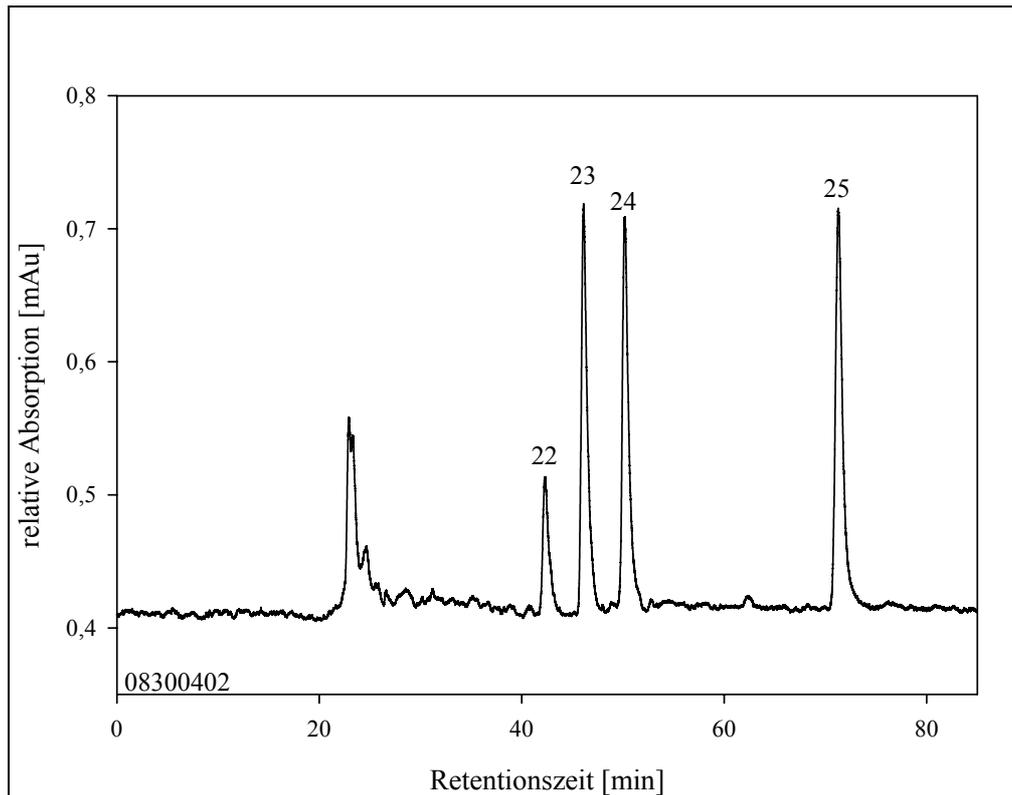


Abb. 3.25: Analyse von derivatisierten Wirkstoffen mittels CEC-LIF: Naproxen-BODIPY(**22**), Bezafibrat-BODIPY(**23**), Clofibrinsäure-BODIPY(**24**) und Ibuprofen-BODIPY(**25**)

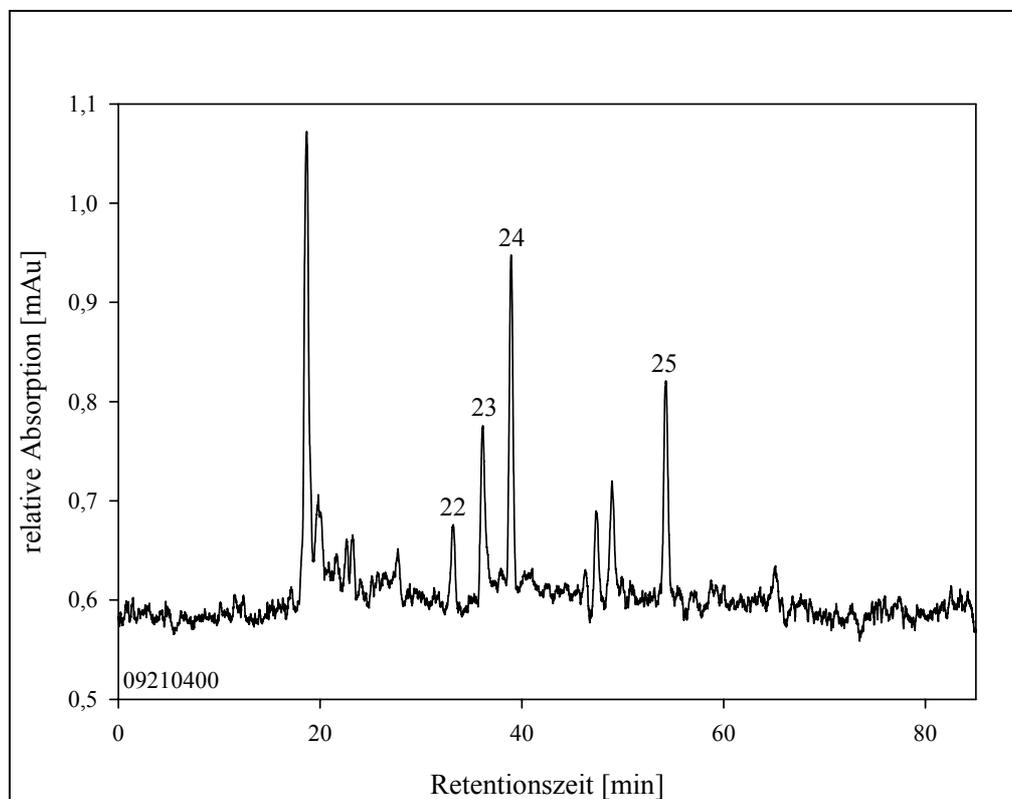


Abb. 3.26: Analyse der derivatisierten Wirkstoffe mittels CEC-LIF nach Druckinjektion.

Die Trennleistung der monolithischen Kapillare wurde mit der einer partikulär gepackten Kapillare verglichen. Zu diesem Zweck wurde eine 55 cm Kapillare mit einer konischen Verjüngung als Auslassfritte gepackt. Als stationäres Material diente hierbei 5 μm ODS 1. Aufgrund der Kapillarlänge ist das Anlegen eines externen Druckes auf das Einlass- und Auslassgefäß bei partikulär gepackten Kapillaren unbedingt erforderlich. Da das Anlegen eines Drucks bei dem kommerziell erhältlichen Detektor von Picometrics jedoch nicht möglich war, musste ein Puffergefäß mit Gewinde konstruiert werden, welches den erforderlichen Drücken standhielt. Es musste ebenfalls stabil gegenüber organischen Lösungsmittel sein, da die Elektrolyten hohe Anteile an Acetonitril oder Methanol aufwiesen. Abbildung 3.27 zeigt ein Schema und Abbildung 3.28 ein Foto der konstruierten Auslasszelle.

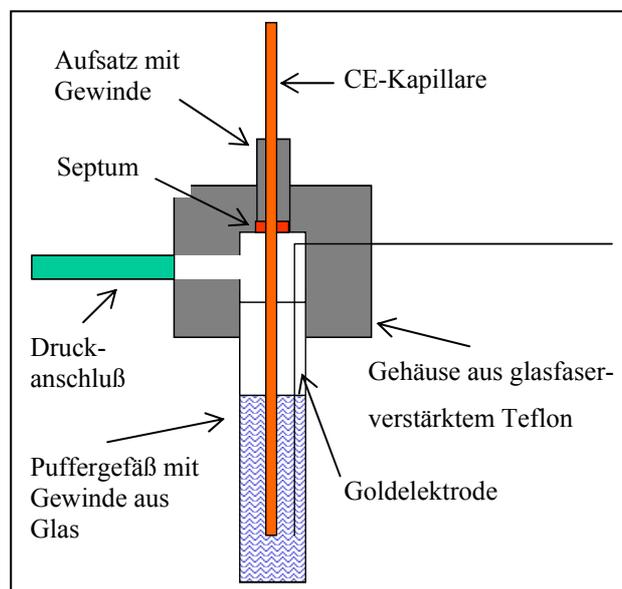


Abb. 3.27: Schematische Darstellung der selbst gebauten Auslasszelle

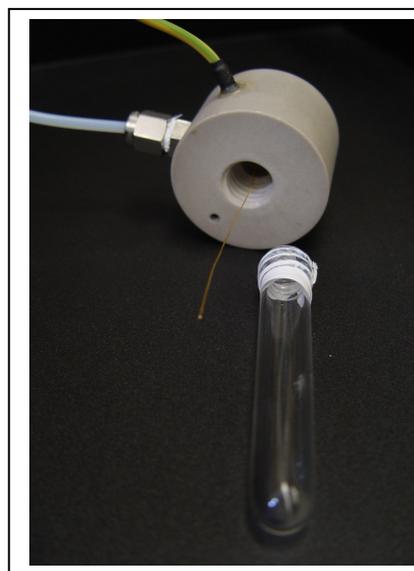


Abb. 3.28: Auseinandergeschraubte Auslasszelle des LIF-Detektors

Bei allen Analysen mit einem LIF-Detektor und partikulär gepackten Kapillaren wurde dieses modifizierte Outlet genutzt, um bei langen Analysezeiten die Bildung von Luftblasen zu verhindern.

Zur Trennung der derivatisierten Wirkstoffe diente als Elektrolyt ein Gemisch aus 80 % Acetonitril und 20 % 5 mM Phosphatpuffer pH 8,0. Die mit 5 μm ODS 1 gepackte Kapillare war 55 cm lang (ID = 100 μm) und war mit einer 10 cm langen freien Kapillare (ID = 75 μm) gekoppelt. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch bei 25 kV für 5 Sekunden und die Trennung wurde bei 25 kV durchgeführt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Naproxen und Bezafibrat waren nicht basisliniengetrennt. Durch Variation der Pufferstärke hätte dies wahrscheinlich erreicht werden können. Die geringe Permeabilität der partikulär gepackten Kapillare macht eine Elektrolytoptimierung allerdings deutlich zeitaufwendiger als eine Optimierung der monolithischen Kapillaren. Aufgrund der größeren Oberfläche ist der EOF der partikulären Kapillare größer, wodurch die Analysenzeit reduziert wird. Das fehlstellenfreie Packen der 55 cm langen partikulären Kapillare war schwierig und von diversen Fehlversuchen begleitet. Auch der Umbau der Auslasszelle, der sich als notwendig erwies, war aufwendig.

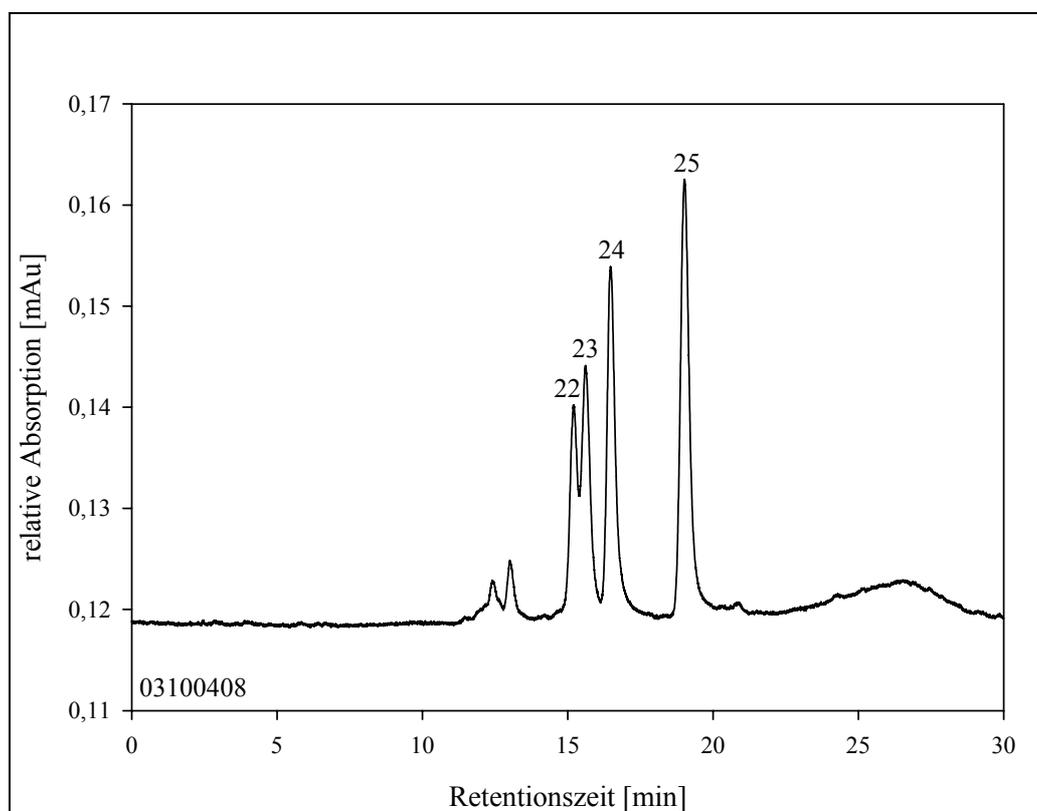


Abb. 3.29: Trennung derivatisierter Wirkstoffe an 5 μm ODS 1

Naproxen-BODIPY (**22**), Bezafibrat-BODIPY (**23**), Clofibriensäure-BODIPY (**24**) und Ibuprofen-BODIPY (**25**)

Die Trennung der derivatisierten Arzneimittel konnte mit beiden Kapillaren gezeigt werden. Die empfindliche Detektion nach Kopplung mit einem LIF-Detektor ist sowohl mit der monolithischen Kapillare, durch Verlängerung mit einer Detektionskapillare, als auch mit einer partikulären Kapillare nach Modifikation des Outlets gelungen. Die mögliche Druckinjektion verbesserte die Nachweisgrenze bei den monolithischen Kapillaren.

3.3 Einsatz der CEC-MS

3.3.1 Trennung von Alkylpolyglykosiden (APGs) mittels CEC-ESI-MS

APGs sind ökologisch verträgliche, neutrale Tenside und werden aus erneuerbaren Rohstoffen gewonnen. Aufgrund ihrer synergistischen Effekte mit anderen Tensiden sind sie vielseitig einsetzbar. Die hergestellten Mengen der APGs übersteigen 60.000 Jahrestonnen, was sie zu den wichtigsten Tensiden auf Zuckerbasis macht. Ihre Grenzflächenaktivität wird von einem unpolaren Alkylrest und einer polaren Polyglykosidgruppe geprägt (Abb. 3.30). Da

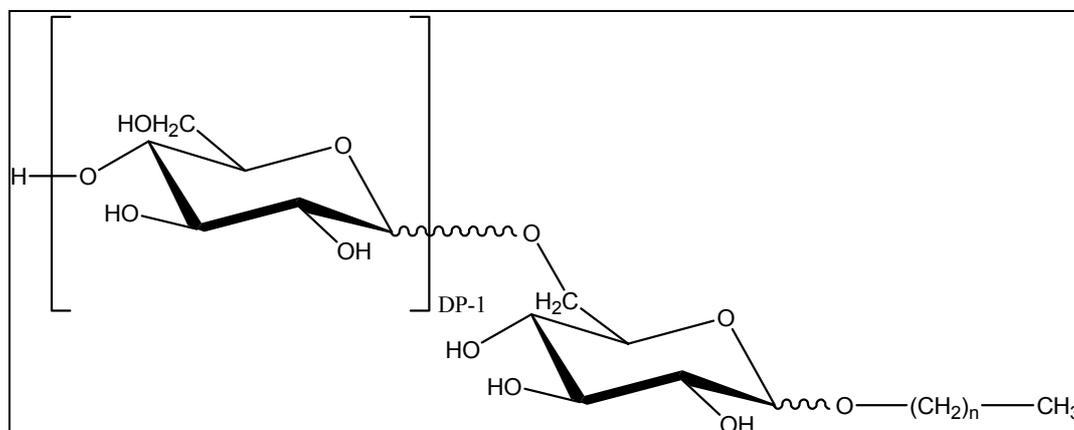


Abb.3.30: Allgemeine Strukturformel der APGs; DP = Polymerisierungsgrad; n = 7-17

APG-Formulierungen häufig komplex zusammengesetzt sind, wird eine effektive Analytik benötigt. Aufgrund der Tatsache, dass APGs keine chromophoren Gruppen besitzen, gibt es nur wenige geeignete Analysemethoden. Die GC der zu untersuchenden Proben erfordert häufig sehr zeitaufwendige Derivatisierungen, während die Trennleistung der verwendeten HPLC-Methoden oft unzureichend ist.

In der Analytischen Chemie der Bergischen Universität Wuppertal wurde eine MEKC-Methode entwickelt, bei der die APGs mit Hilfe eines gepulsten amperometrischen Detektors (PAD) erfasst werden [145]. Zur elektrochemischen Detektion ist es notwendig, die Zucker

mittels 0.1 M NaOH zu deprotonieren. Allerdings ist aufgrund der hohen Lipophilie eine MEKC-Trennung von APGs mit Alkylketten größer als C₁₂ nicht möglich. Um eine vollständige Trennung zu erreichen, sollte deshalb die CEC eingesetzt werden. Dabei musste beachtet werden, dass die Kopplung eines PAD mit einer gepackten Kapillare aufgrund der extremen pH-Werte (pH 13 bei 0,1 M NaOH) nicht möglich ist.

Als alternativer Detektor steht der CEC grundsätzlich das Massenspektrometer zur Verfügung. Die CEC-Kapillare (vgl. 3.2.2 Polyacrylamidphase) wurde zunächst mit einem kommerziell erhältlichen Mikro-ESI-Interface an das MS gekoppelt. Mit einem Sheathflow wurde der erforderliche Volumenstrom (im $\mu\text{l}/\text{min}$ Bereich) eingestellt. Der Sheathliquid, bestehend aus 50 % MeOH und 50 % Wasser, wurde zusätzlich 1 mL Essigsäure beigelegt, um den elektrischen Stromkreis schließen zu können und die CEC-Kopplung zu ermöglichen. Beim verwendeten ESI-Interface der Firma Micromass liegt das Ionisierungspotenzial an der Kapillarspitze des Interfaces an und die MS-Cone ist geerdet. Zu dem ESI-Potenzial addiert sich das Potenzial, welches am Ende der CEC-Kapillare anliegt. Bei hohen Potenzialen und Strömen in der CEC kann es vorkommen, dass das Gesamtpotenzial (ESI + CEC) an der Kapillarspitze zu groß wird und Spraybildung sowie Ionisierungseffizienz negativ beeinflusst werden. In solchen Fällen muss das Potenzial durch Anbringen eines geerdeten Widerstandes (z.B. 100 M Ω) an der Kapillarspitze reguliert werden. Bei den eigenen Messungen war dies aber nicht erforderlich, da die Ströme und Spannungen in der gepackten Kapillare so gering waren, dass die Spannung des ESI-Interfaces nicht beeinflusst wurde. Da die Stahlkapillare zum Transport der Sheathliquid einen Innendurchmesser von $\sim 200 \mu\text{m}$ besaß, wurde als Trennkapillare eine 60 cm lange Kapillare mit einem Außendurchmesser von 192 μm und 75 μm Innendurchmesser verwendet. Dies ermöglichte eine Führung der Trennkapillare durch die Sheathliquidkapillare bis an die Spitze der ESI-Quelle. Die Vermischung der beiden Flüssigkeiten fand demnach erst an der Spitze der Quelle statt, und eine Verdünnung der Analyten wurde so verhindert. Die monolithische Phase bestand aus Polyacrylamid und hatte die gleiche Zusammensetzung wie in Kapillare 1 (vgl. Kapitel 3.2.2). Der Aufbau des Interfaces ist in Abbildung 3.31 schematisch dargestellt. Das Okular dient zur Überprüfung des Sprays und der optimalen Positionierung der Kapillare. Als Trennelektrolyt wurde eine Mischung aus 70 % MeOH und 30 % 25 mM Ammoniumacetat, pH 7,0, eingesetzt. Dieser Elektrolyt ist aufgrund seiner Flüchtigkeit gut für MS-Kopplungen geeignet. Die APGs (Tabelle 3.5) wurden im Elektrolyten aufgenommen, bei 20 kV für 12 Sekunden injiziert und anschließend bei einer Trennungsspannung von 25 kV analysiert. Die Konzentration der APGs betrug circa 1 mM (Einwaage der Standards je 0,5g/l).

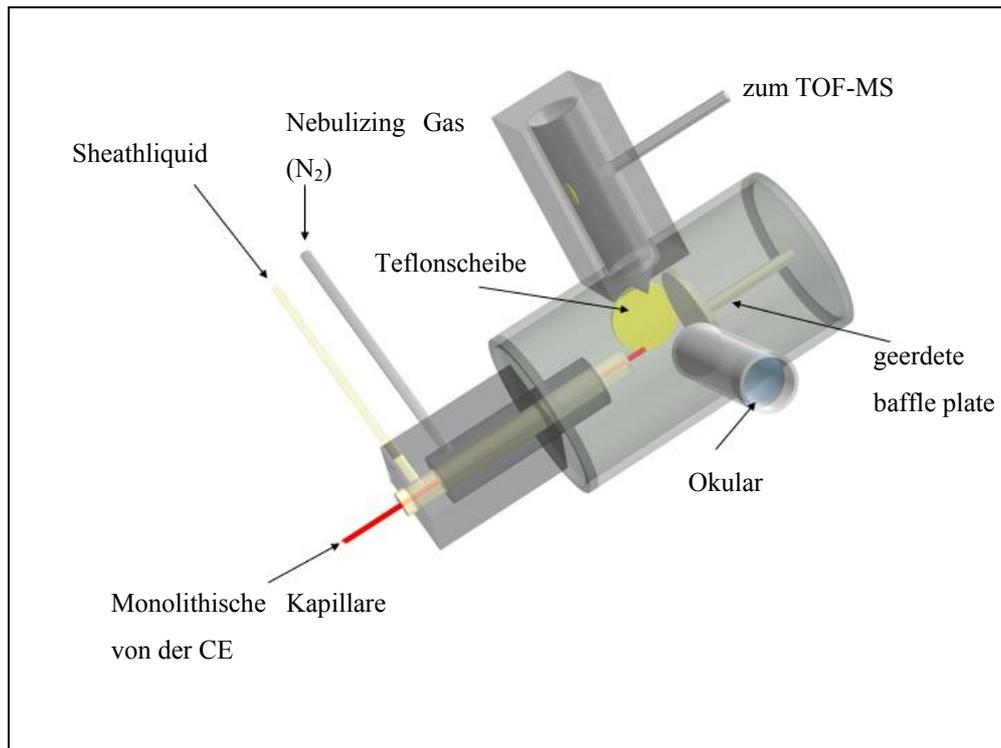


Abb.3.31: Schematischer Aufbau des CEC-ESI-MS-Interfaces

APG	Abkürzung	Polymerisierungsgrad
n-Octyl- β -D-glucoopyranosid	APG-C ₈	1
n-Decyl- β -D-glucoopyranosid	APG-C ₁₀	1
n-Dodecyl- β -D-glucoopyranosid	APG-C ₁₂	1
n-Tetradecyl-D-glucoopyranosid	APG-C ₁₄	1,3
n-Hexadecyl-D-glucoopyranosid	APG-C ₁₆	unbekannt
n-Octadecyl-D-glucoopyranosid	APG-C ₁₈	unbekannt

Tabelle 3.5 : Bezeichnung und Polymerisationsgrad der APGs

APG-C₁₄,-C₁₆ und -C₁₈ waren nicht als reine Standards erhältlich und wurden von der Firma Cognis (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Es handelt sich dabei um eine Mischung der α - und β -Glucoopyranoside. Der genaue Polymerisationsgrad (DP) ist unbekannt, zur Auswertung wurde jedoch immer nur die Masse mit DP = 1 betrachtet. Abbildung 3.32 zeigt die erhaltenen Massenspuren der APG-Analyse.

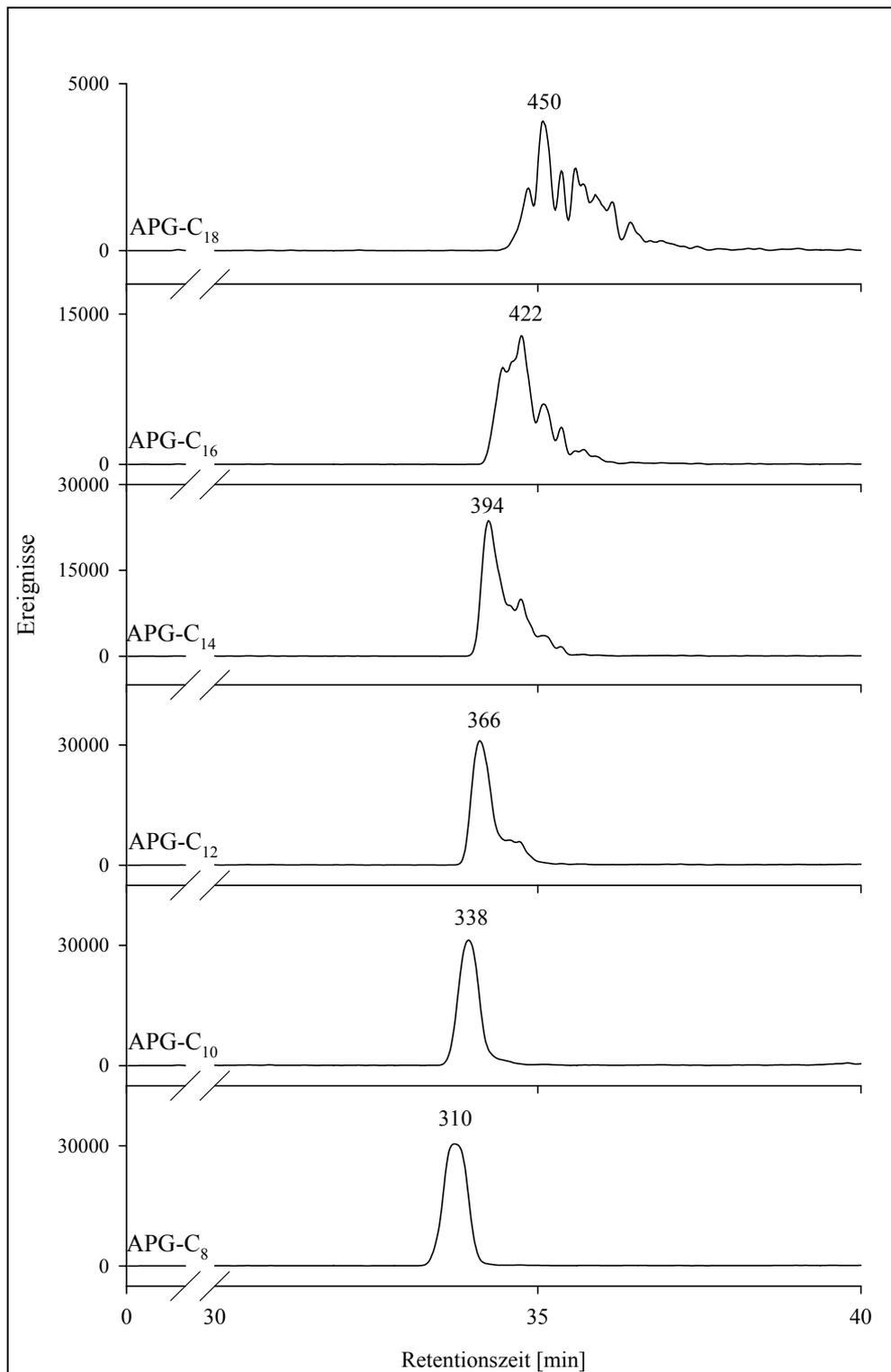


Abb.3.32: Massenspektren APG-C₈, -C₁₀, -C₁₂, -C₁₄, -C₁₆, -C₁₈ APG mit DP=1 nach Trennung an Acrylamidphase. Die optimierten Sprayereinstellungen waren: Kapillarspannung: 3 kV; Quelltemperatur: 80 °C; Sheath Liquid 50 % MeOH, 50 % Wasser + 1 mL Essigsäure (4 µL/min); Nebulizing-Gas: N₂; 20 psi

Die APGs konnten erfolgreich im positiven ESI-Modus nachgewiesen werden. Dabei waren die Moleküle $[M+H]^+$ detektierbar, aufgrund der größeren Intensität wurden jedoch die

Ammoniumaddukte $[M+NH_4]^+$ zur Detektion genutzt. Die geringe Signalintensität der langkettigen APGs (C_{16} und C_{18}) beruhte auf der schlechten Löslichkeit im Elektrolyten. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass sich die Länge der Alkylketten (beginnend bei APG- C_{14}) ungünstig auf die Spraybildung auswirkt. Die Langkettigen APGs stören die Tropfenbildung und führen zu einem unregelmäßigen Spray, womit die schlechte Signalform erklärt werden kann. Die vermessenen APGs unterscheiden sich lediglich durch eine C_2H_4 -Gruppe, was eine geringe Änderung der Lipophilie zur Folge hat und eine Basislinientrennung mit der eingesetzten Kapillare erschwert. Eine Optimierung wurde nicht durchgeführt.

Laut Literatur kann auch ein Natriumphosphatpuffer bei der Verwendung eines Sheathflows genutzt werden [110]. Es wird vermutet, dass der Sheathflow den Phosphatgehalt so verdünnt, dass keine negative Beeinflussung des Elektrosprays stattfindet. Dies konnte bei eigenen Versuchen nicht bestätigt werden, da sich an der Spitze der Sheathflowkapillare ein weißer Kristall bildete, welcher letztendlich zum Verstopfen führte. Aufgrund der geringen Menge konnte die Zusammensetzung des Kristalls nicht bestimmt werden. Da dieses Problem beim Ammoniumacetatpuffer aber nicht auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass die Verdünnung nicht ausreichend war und sich festes Natriumphosphat abgeschieden hatte.

3.3.2 Entwicklung einer CEC-ES-APLI-MS-Kopplung

Die Kopplung der CEC mit der ESI erlaubt nicht die Ionisierung von unpolaren Substanzen wie den PAKs. Diese unpolaren Substanzen können aber mit Hilfe der Photoionisation detektiert werden. Im Jahr 2000 beschrieben SYAGE et al. die Photoionisation bei Atmosphärendruck (APPI, Atmospheric Pressure Photo Ionization) als eine neue Ionisationsmethode für unpolare Verbindungen in der LC-MS [146]. Die APPI nutzt dabei die Energien von 10,0 eV und 10,6 eV, die von Kryptonlampen (VUV-Lampen) ausgestrahlt werden. Verbindungen, die diese Strahlung absorbieren und eine Ionisierungsenergie unter 10 eV besitzen, werden von den Photonen ionisiert. Unter der Annahme, dass die Ionisierungsenergie aller anderen Matrixbestandteile höher als 10 eV liegt, ist dieser Vorgang selektiv.

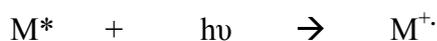
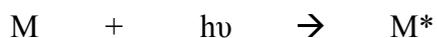
Wenn der Analyt die Strahlung absorbiert, bildet sich das Radikalkation M^+ . Ist die Protonenaffinität der M^+ -Ionen größer als die des umgebenden protischen Lösemittels, können MH^+ -Kationen gebildet werden. Im Jahre 2000 wurde die APPI von BRUINS et al. erweitert [147], indem der Eluent mit einer leicht ionisierbaren Verbindung dotiert wurde (dopant assisted-APPI). Die in großer Anzahl gebildeten Dopant-Photoionen können durch

Ladungstransfer oder durch Protonenübertragung eine Ladung auf die im Ionisationsvolumen vorhandenen Analyten induzieren. Typische Dotiersubstanzen sind Aceton, Toluol [148] und Anisol [149]. Die dopant assisted-APPI erweitert die Anwendungsmöglichkeiten und erhöht auch die Sensitivität, jedoch werden die Spektren durch die ablaufenden Molekül-Ionen-Reaktionen zum Teil sehr unübersichtlich.

Die Vorteile der APPI im Vergleich zur ESI konnten für die CE bereits gezeigt werden [148]. Beispielsweise können Substanzen im Puffer verwendet werden, die sonst stören würden [148, 150]. So ist dabei unter anderem die Kopplung der MEKC mit der APPI gezeigt worden. Nachteilig ist dabei jedoch, dass das MS-Gerät auf Dauer stark durch anwesende Mizellenbildner belastet wird. Um neutrale Verbindungen kapillarelektrophoretisch zu trennen und massenspektrometrisch zu detektieren, ist auch weiterhin die CEC-MS die wichtigste Methode.

Vor kurzem wurde in unserem Arbeitskreis in Kooperation mit der Physikalischen Chemie der Bergischen Universität Wuppertal eine neue Photoionisierungsmethode entwickelt, bei der anstelle einer Kryptonlampe ein Laser eingesetzt wird [151]. Die Laserionisation bei Atmosphärendruck (APLI) basiert im Gegensatz zur APPI auf der resonanten Mehrphotonen-Ionisation (REMPI).

Aromaten können durch (1+1)-REMPI effektiv ionisiert werden [152]. Sie besitzen im nahen UV hohe Absorptionsquerschnitte und verfügen über erste elektronisch angeregte Zustände mit relativ langen Lebenszeiten. Dadurch wird die Absorption eines zweiten Photons ermöglicht. Wenn die Energie beider Photonen die Ionisationsenergie der Analyten übersteigt, bilden sich M^+ -Radikalkationen.



mit: M= Molekül, M*= angeregtes Molekül, M⁺= Radikalkation

Beim traditionellen REMPI-Aufbau strahlt der Laser in den Vakuumbereich der Quelle hinein. Für klassische REMPI-Versuche ist dies wichtig, da durch die adiabatische Abkühlung der Analyten nur wenige Rotationszustände besetzt sind. Es kommt zu scharf abgegrenzten Absorptionen, und mit Hilfe eines durchstimmbaren Lasers werden sehr selektive Anregungen der Analyten ermöglicht.

Bei der APLI-MS findet die Anregung bei Atmosphärendruck statt, und durch die größere Verteilung der Rotationszustände sind die Absorptionsbanden der Aromaten breiter. Aus

diesem Grund kann ein Excimerlaser mit einer Emissionswellenlänge von 248 nm zur Anregung der Aromaten eingesetzt werden.

Im Vergleich zur APPI ist der Photonenfluss und vor allem die Energiedichte des Lasers während des Ionisationsvorgangs wesentlich größer als mit einer VUV-Lampe, wodurch eine höhere Ionenausbeute resultiert. LORENZ zeigte, dass die normalerweise in der HPLC und CEC verwendeten Lösemittel ACN und MeOH bei 248 nm im Gegensatz zu den in der APPI üblichen Wellenlängen um Größenordnungen kleinere Absorptionskoeffizienten besitzen [153]. Die vom Laser ausgestrahlten Photonen stehen somit vollständig im Ionisationsvolumen zur Verfügung. Leider konnte ein direkter Vergleich der beiden Methoden in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da keine APPI-Quelle zur Verfügung stand. Nach der aufgezeigten Theorie sollte die APLI für Aromaten empfindlicher und selektiver als die APPI sein.

Die hohe, bereits gezeigte, Trennleistung der CEC für unpolare Substanzen, wie z.B. den PAKs, motivierte zur Kopplung der CEC mit der APLI-MS. Im Gegensatz zur Arbeit von CONSTAPEL et al. [151], bei der der Laserstrahl in das durch Erhitzen in einer APCI-Einlassstufe verdampfte Eluatgemisch eingekoppelt wurde, wurde bei der CEC-Kopplung in das Spray einer Mikro-ESI-Quelle gestrahlt. Die Kopplung der CEC mit der APCI wurde nicht in Betracht gezogen, da die hohen Temperaturen in der Einlassstufe der APCI eine Transferline erforderlich machen würden. Es macht zwar aus analytischer Sicht kaum Sinn, zwei Methoden zu kombinieren, die polare und unpolare Verbindungen gleichzeitig ionisieren, allerdings liegt die Stärke des Systems gegenüber der APCI-Kopplung in der Erzeugung eines „kalten“ Sprays. Dies erlaubt auch die Detektion thermolabiler Verbindungen. Das Einkoppeln des Lasers in das bestehende System bereitete keine Schwierigkeiten und ist in den Abbildungen 3.22 und 3.23 dargestellt. Lediglich das Okular, welches eigentlich zur Beobachtung des Sprays diente, wurde abgebaut und durch diese Öffnung der Laserstrahl in die Quelle geführt.

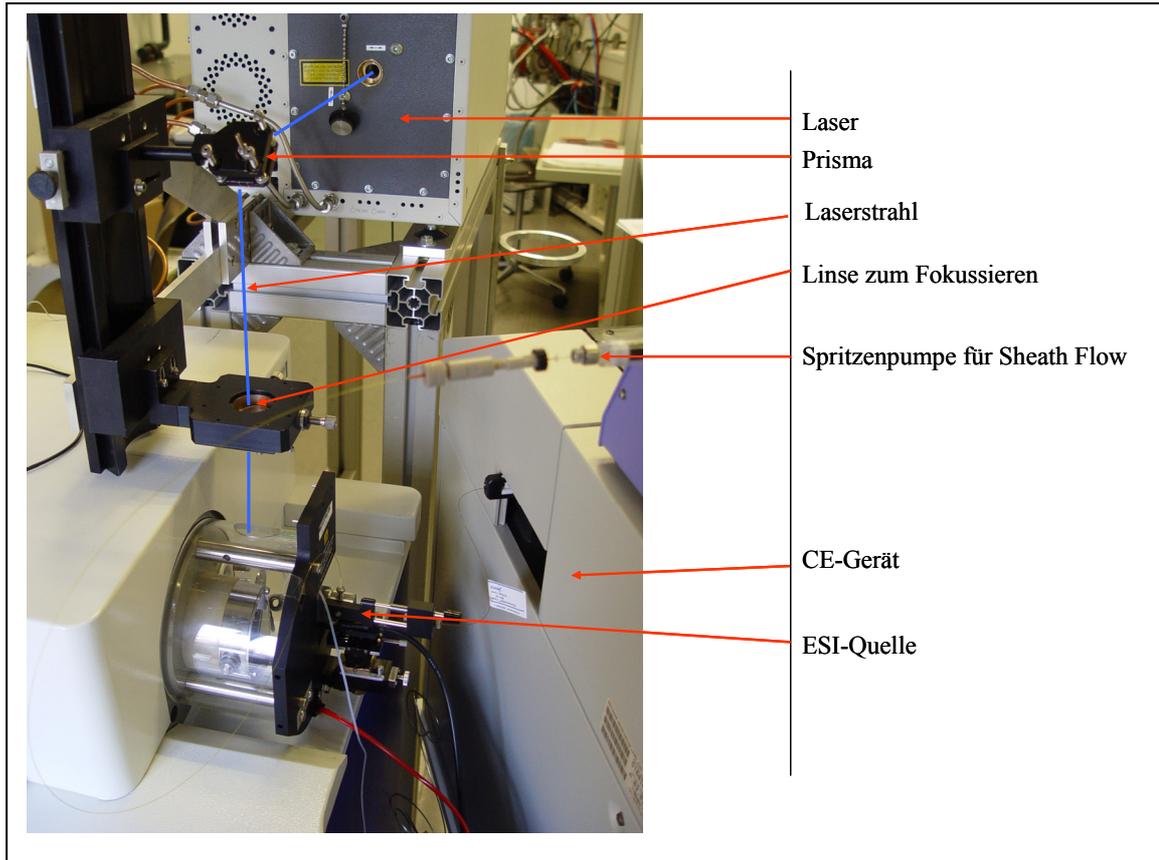


Abb. 3.33: Aufbau der CEC-ES-APLI-MS im Labor

Um den Strahlengang zu verdeutlichen, zeigt Abbildung 3.34 ein Schema der Quelle.

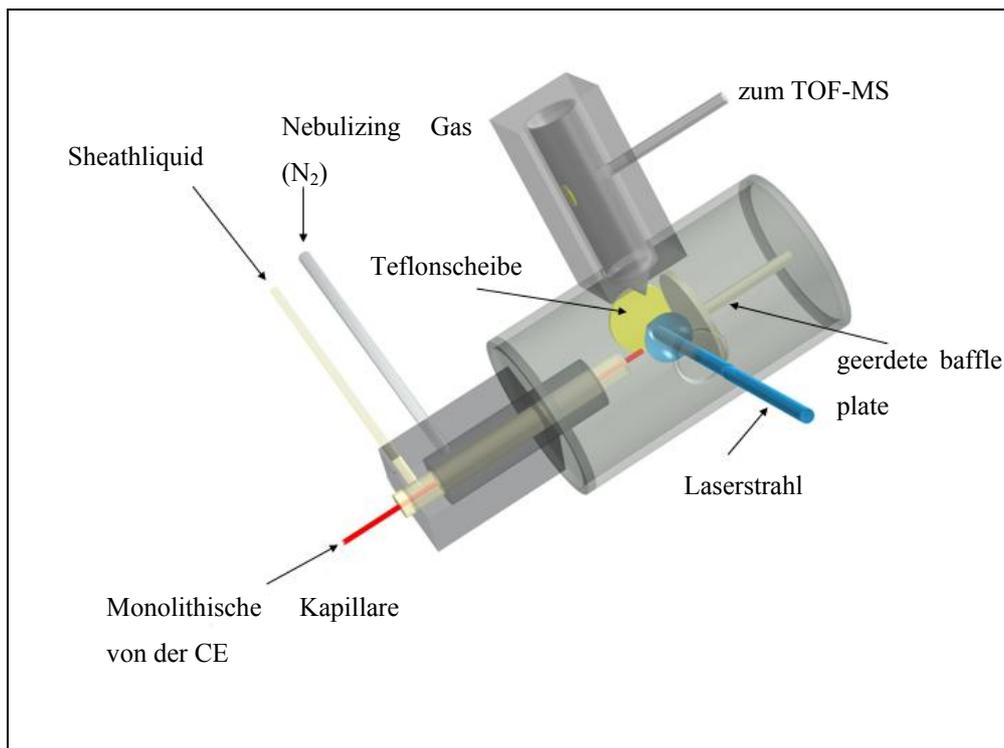


Abb. 3.34 Schematischer Aufbau des CEC-ES-APLI-MS-Interfaces

Die relative Positionierung der Kapillare zur Cone ist für eine erfolgreiche Kopplung sehr wichtig. Deshalb werden in Abbildung 3.35 Nahaufnahmen der Quelle gezeigt. Wie rechts in der Abbildung zu sehen handelt es sich um eine Z-Spray-Quelle. Die Baffle dient dabei als geerdete Gegenelektrode zur Kapillare. Neutrale Moleküle fliegen geradeaus auf die Baffle, während entstandene Ionen durch das elektrische Feld über die Cone ins MS geführt und durch die Cone-Voltage nochmals beschleunigt werden.

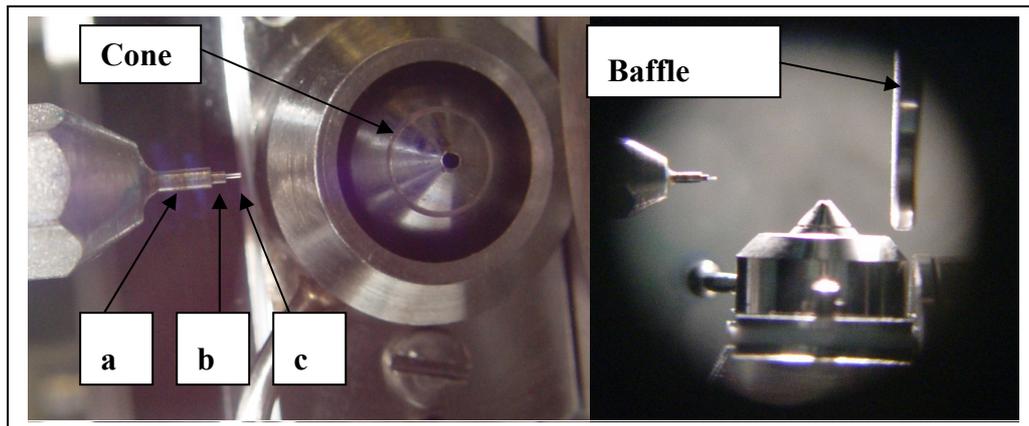


Abb. 3.35: links: Seitenansicht der ESI-Quelle mit 3 konzentrisch angeordneten Kapillaren **a** = Nebulizing Gas; **b** = Sheathliquid; **c** = Monolithische Kapillare; rechts: Aufsicht durch Prisma auf die ESI -Quelle.

Um die Möglichkeit der Ionisierung im Spray zu testen, wurde zunächst ein 25 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 7,0, mit Fluoren ($M = 166 \text{ g/mol}$) und Catechin ($M = 290 \text{ g/mol}$) versetzt und durch eine 60 cm lange, offene $50 \mu\text{m}$ Kapillare mit 50 mbar in die Quelle eingelassen. Die Konzentrationen betragen 3,0 mM für das Fluoren und 1,7 mM für das Catechin.

Der obere Teil der Abbildung 3.36 zeigt die Massenspur $m/z=166$. Ohne Laser ist keine Ionisierung des Fluorens zu erkennen. Dies zeigt auch das linke Spektrum im unteren Bildteil, in dem das durch Elektrospray ionisierte Catechin als $[M+H]^+$ mit $m/z = 291$ angezeigt wird. Beim Zuschalten des Lasers ändert sich das Spektrum. Wie im oberen Teil der Abbildung zu sehen, steigt die Signalintensität des Fluorens von 0 auf 12000 Counts an. Dies ist auch dem Spektrum unten rechts zu entnehmen, in dem neben dem Signal für Catechin das M^+ -Signal des Fluorens erscheint. Dieses Experiment zeigt, dass wie erwartet die ESI-Quelle Fluoren nicht ionisiert, und dass die Ionisierung mit Hilfe des Lasers nicht nur im Dampf der APCI-Einlassstufe [151], sondern auch im Spray der ESI-Quelle möglich ist.

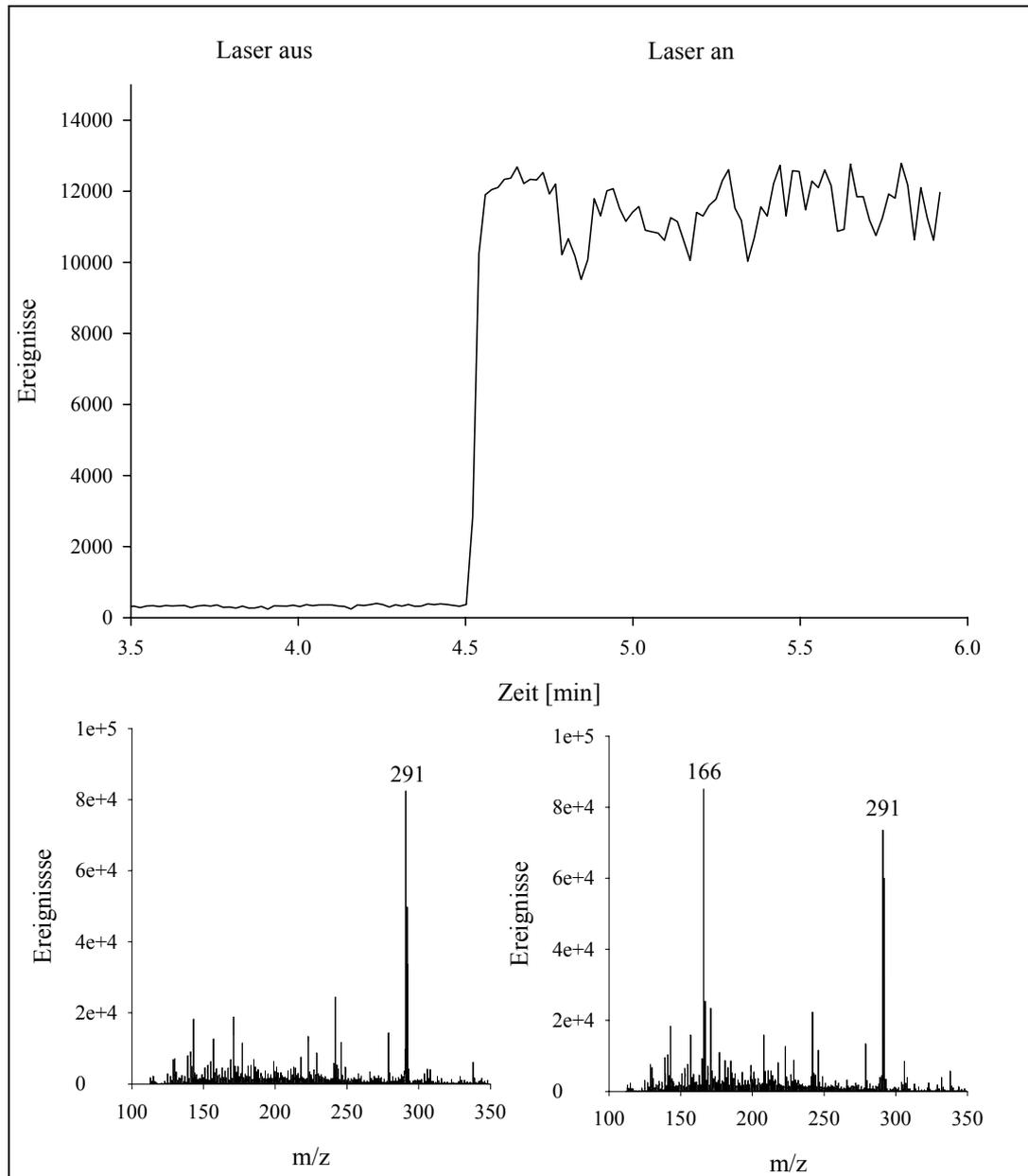


Abb. 3.36: Funktionstest des ES-APLI-Interfaces

Oben: Massenspur $m/z = 166$ mit ein- und ausgeschaltetem Laser. Unten links: Spektrum ohne Laser; Unten rechts: Spektrum mit Laser. Folgende Spraybedingungen wurden verwendet: Kapillarspannung: 3 kV; Quelltemperatur: 80°C; Sheath Liquid 50 % MeOH, 50 % Wasser + 1 mL Essigsäure (1 $\mu\text{L}/\text{min}$); Nebulizing-Gas N_2 : 20 psi

Dem Laser steht aufgrund der hohen Gasflüsse und dem dadurch bedingten schnellen Transport des Gases durch die Quelle mit jedem neuen Puls ein neues Ionisierungsvolumen zur Verfügung. Deshalb treffen die Photonen des zweiten Pulses nicht auf angeregte oder bereits ionisierte Moleküle. Ferner war die Taktfrequenz des Lasers (100 Hz) nicht mit dem gepulsten orthogonalen Beschleunigungssystem des TOF-MS (30 kHz) synchronisiert. Dies bedeutet, dass das untersuchte System wahrscheinlich vom erreichbaren

Empfindlichkeitsmaximum deutlich entfernt ist. Die Pulsdauer des Lasers beträgt 10 ns. Bei 30 kHz wird ungefähr alle 33 μs ein Ionenpaket Richtung Detektor beschleunigt (mit Hilfe des Pusher/ Puller-Systems). Wäre das zu analysierende Ionenpaket nur so „breit“ wie der Laserpuls (10 ns), wäre die Wahrscheinlichkeit groß, dass keines der gebildeten Ionen Richtung Detektor beschleunigt würde. Eine Detektion der gebildeten Photoionen in diesem freilaufenden System ist nur möglich, weil sich die Laufzeiten der Ionen, die an unterschiedlichen Orten in dem auf 1 cm^3 abgeschätztem Ionisationsvolumen gebildet werden, deutlich unterscheiden. Dies liegt an der hohen Kollisionsfrequenz in der Atmosphärendruckquelle, die eine starke Beschleunigung der Ionen nicht erlaubt. Vielmehr wird hier die Bewegung der geladenen Teilchen im elektrischen Feld durch ihre Ionenmobilitäten bestimmt und liegt damit im Bereich von thermischen Geschwindigkeiten (lediglich mehrere hundert Meter pro Sekunde). Ein Ion das in größerer Distanz zur MS-Eintrittsöffnung gebildet wird, benötigt daher wesentlich mehr Zeit das MS zu erreichen, als ein Ion unmittelbar vor der Cone. Die Durchtrittszeit an der Eintrittsöffnung der innerhalb der Ionisationsdauer von 10 ns gebildeten Photoionen wird daher über einen Zeitraum von etwa 0,5 – 1 ms zeitlich gestreckt. Ionenpakete dieser „Breite“ werden daher auch bei den genutzten Frequenzen des Pusher-Puller-Systems detektierbar. Es ist aber weiterhin eine Empfindlichkeitssteigerung durch Synchronisation von Laser und Beschleunigungssystem zu erwarten. Da in dieser Arbeit aber nur die generelle Möglichkeit aufgezeigt werden sollte, wurde auf Bemühungen in diese Richtung verzichtet.

Für die folgenden CEC-Versuche wurde der Laser optimal ausgerichtet. Dies geschah durch Zugabe von Fluoren zum Sheath-Flow. Abbildung 3.37 zeigt, dass eine leichte Fokussierung des Lasers eine Intensitätssteigerung des Signals um das 10-fache zur Folge hat. Die so ermittelte optimale Position des Lasers befand sich unmittelbar vor der Cone des MS-Gerätes. Dort war das Spray weitestgehend getrocknet und die Analytmoleküle lagen frei zur Ionisierung im Gas vor.

Nach der optimalen Positionierung des Laserstrahls sollte nun eine PAK-Mischung durch die für die APGs bereits eingesetzte Acrylamidphase (Kapillare 1, mit kathodisch gerichtetem EOF) getrennt und mit ES-APLI-MS nachgewiesen werden.

Als Elektrolyt wurde eine Mischung aus 70 % Methanol, 20 % 25 mM Ammoniumacetat, pH 7,0, und 10 % Millipore Wasser eingesetzt. Die Injektion erfolgte elektrokinetisch mit 10 kV für 10 Sekunden. Die Trennungsspannung betrug 25 kV. Das resultierende TIC ist in Abbildung 3.38 wiedergegeben. Es wurde ein sehr starkes Grundrauschen beobachtet, welches die Identifizierung der zu analysierenden PAKs unmöglich machte. Wie an einem repräsentativen Massenspektrum zu sehen (Abbildung 3.38 unten), sind im

gesamten interessierenden Massenbereich Signale vorhanden. Eine Inspektion des Systems zeigte, dass das Ende der monolithischen Kapillare nach diesem Versuch nicht mehr mit Packungsmaterial gefüllt war. Der einzige Unterschied zur erfolgreich durchgeführten Trennung der APGs (Kapitel 3.3.1) ist die Verwendung des Lasers. Die Pyrolyseempfindlichkeit des Acrylamidmonolithen wurde in vorherigen Versuchen zur Herstellung von Detektionsfenstern für die UV-Detektion genutzt (Kapitel 3.2.2). Der Laserstrahl wurde vor die Cone ausgerichtet. Dennoch war eine Streuung des Strahls zu beobachten. Eventuell war beim Auftreffen der Laserstrahlung auf das Kapillarende die thermische Belastung für das Polymer so groß, dass eine Pyrolyse stattfand. Die zahlreich enthaltenen Stickstoffverbindungen wurden dann wahrscheinlich durch das Elektrospray ionisiert und führten zu einem starken TIC-Signal und somit zu einem Grundrauschen.

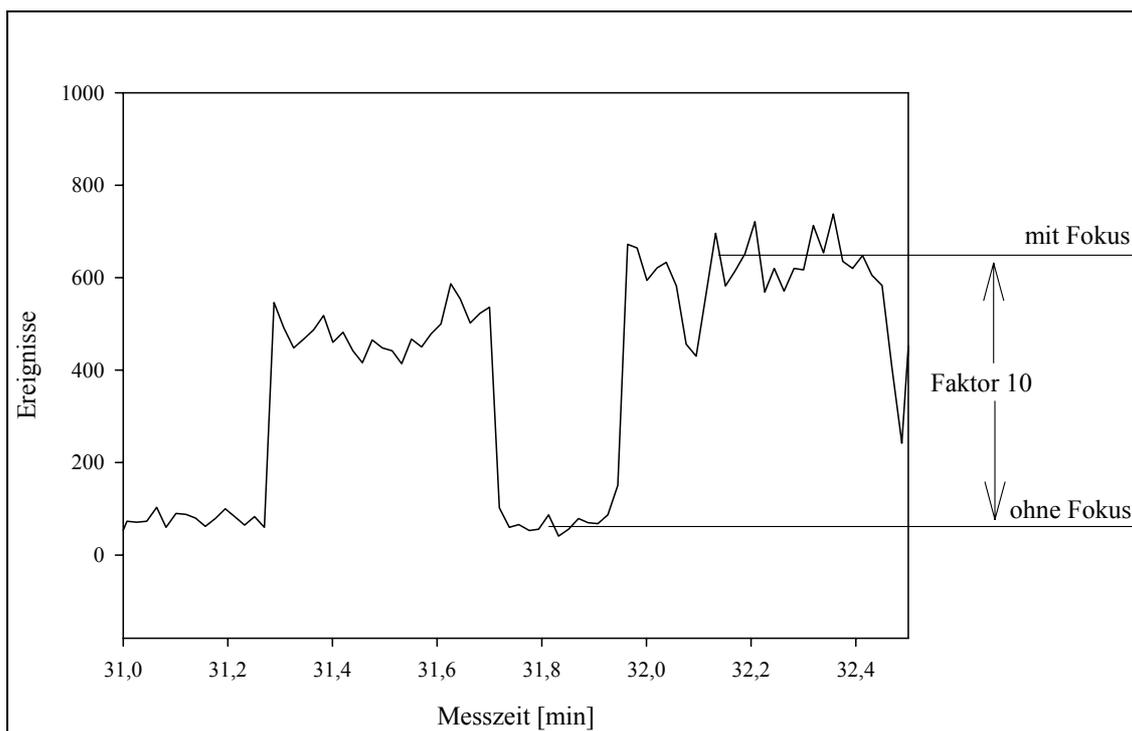


Abb. 3.37: Fokussierung des Lasers auf das Ionisationsvolumen unmittelbar vor der Cone

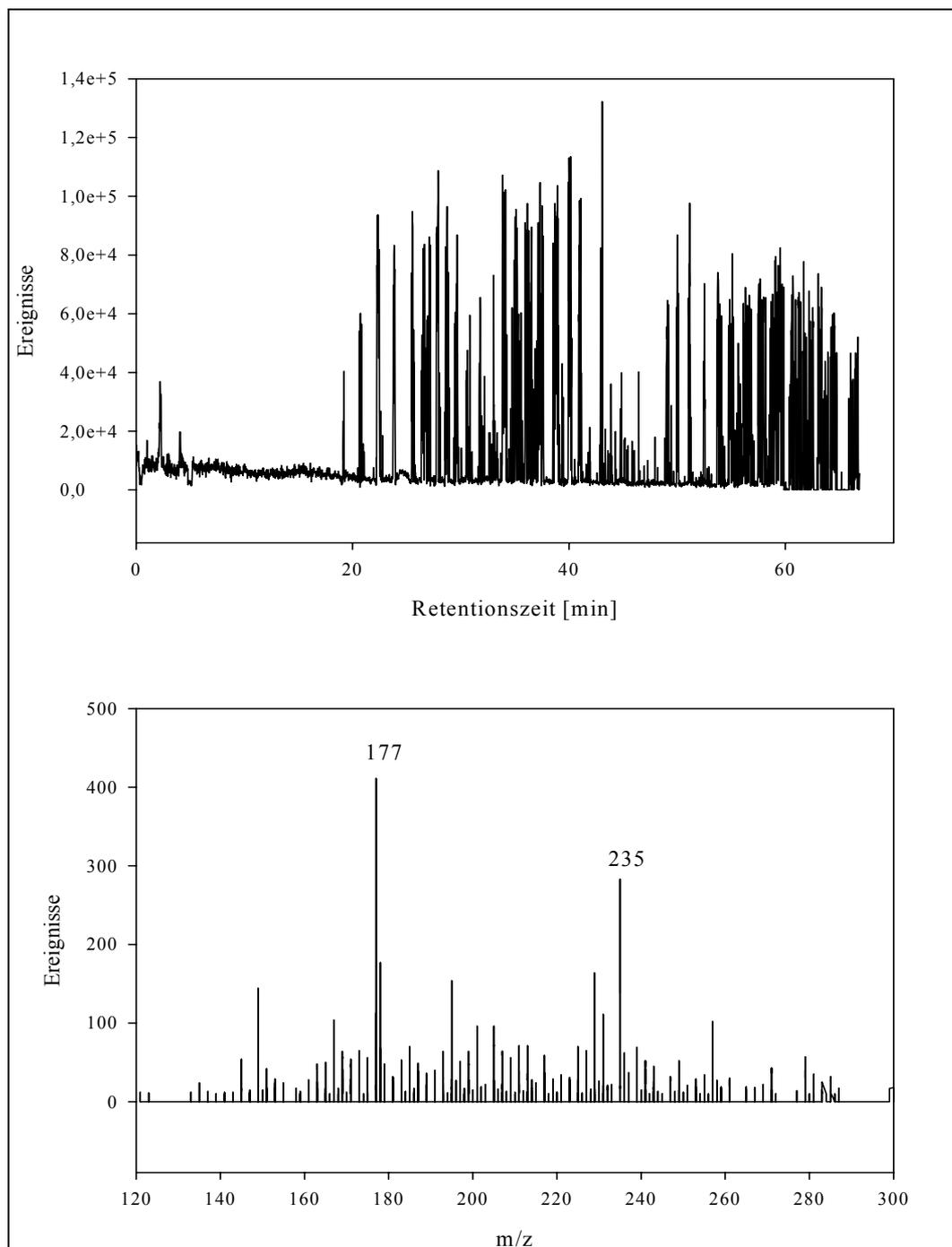


Abb. 3.38: Oben: TIC der Trennung der PAKs. Unten: Beispielhaftes Spektrum bei Minute 57

3.3.3 Einsatz eines Silika-Monolithen in der ES-APLI- MS

Um eine Pyrolyse am Kapillarende zu verhindern, sollte der Silika-Monolith CapROD-RP-18 von Merck (Darmstadt, Deutschland) mit der APLI-MS gekoppelt werden. Allerdings verhinderte das vorhandene Interface und der Außendurchmesser der monolithischen Silikakapillare (360 μm) eine direkte Führung der Kapillare bis an die Spitze des ESI-Interfaces. Stattdessen wurde eine Kopplung mit einer Transferkapillare (10 cm lang, 192 μm

Außendurchmesser, 75 μm Innendurchmesser) notwendig. Um einen schnellen Wechsel der Kapillare zu ermöglichen, wurde nicht wie in den Versuchen zuvor die totvolumenfreie Kopplung, sondern ein kommerzielles System mit einem Totvolumen von 8 nL genutzt (siehe Abbildung 3.39).

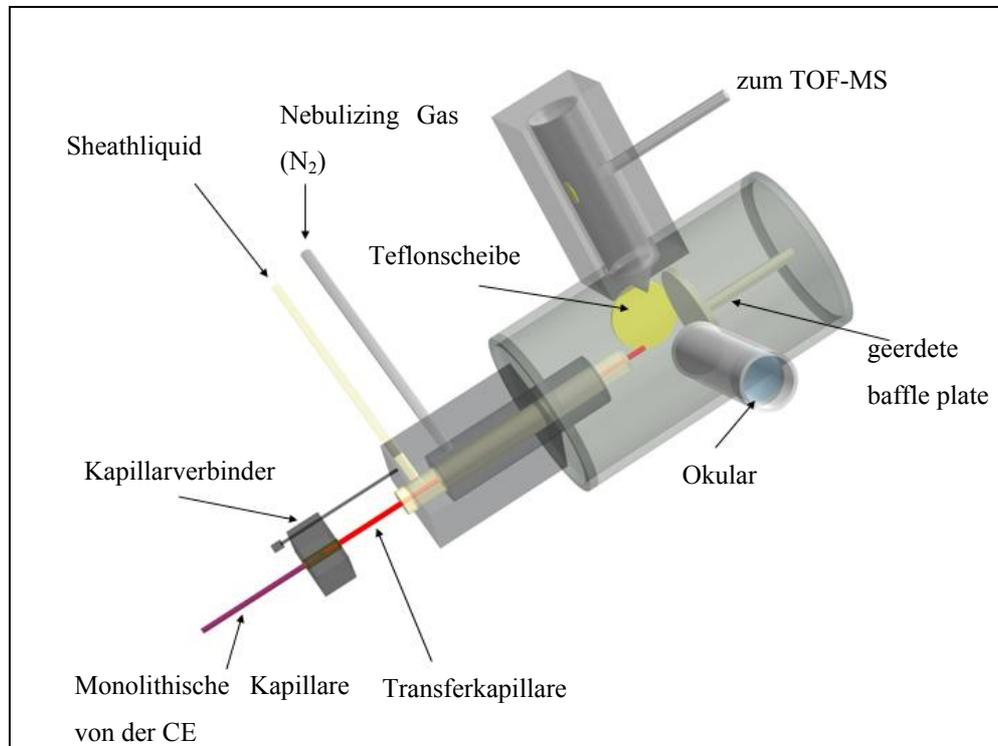


Abb. 3.39 Schematischer Aufbau des CEC-ESI-MS-Interfaces mit Transferkapillare

Zunächst wurden mit diesem Aufbau die APGs untersucht. Dabei erfolgte die Ionisation allein durch das ESI-Interface. Eine Mischung aus C_8 - bis C_{18} -D-glucopyranosiden (siehe Tabelle 3.5) wurde in einem Elektrolyten bestehend aus 80 % ACN und 20 % 25 mM Ammoniumphosphat, pH 8,0, gelöst. Bei den Versuchen mit dem Acrylamid-Monolithen wurde ein Elektrolyt mit pH 7,0 eingesetzt. Dieser relativ geringe pH-Wert war bei der Acrylamidphase nicht nachteilig, da Sulfonsäure-Gruppen als Ladungsträger eingesetzt wurden. Bei der Silikaphase war jedoch ein pH-Wert von größer 7 besser geeignet, um einen stärkeren EOF auszubilden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.40 dargestellt. Erneut waren trotz des hohen Anteils an Acetonitril die C_{16} - und C_{18} -Verbindungen nur schlecht löslich. Zur Detektion wurden wieder die Ammoniumaddukte herangezogen.

Die APGs konnten aufgrund der lipophilen Wechselwirkung mit der stationären Phase erfolgreich getrennt werden. Die lange Analysedauer von 120 Minuten entstand durch das ungünstige Design der kommerziellen ESI-Quelle, wodurch eine lange monolithische Trennkapillare und eine Transferkapillare notwendig wurden.

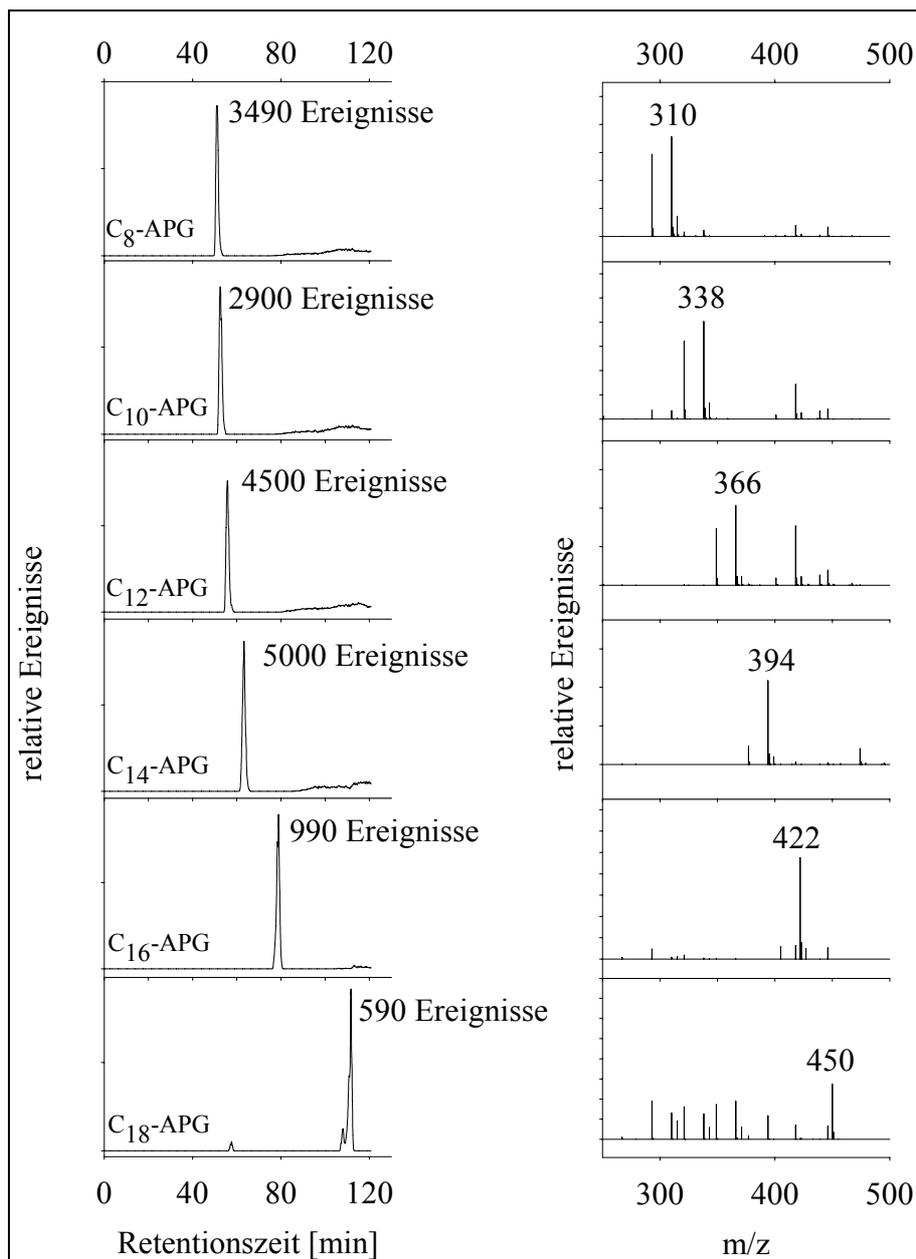


Abb. 3.40: Ionenspuren und Spektren der APGs nach Trennung mit einer CapROD-Kapillare

In einem nachfolgenden Experiment wurde der Laser in das System eingekoppelt und PAKs analysiert (siehe Abbildung 3.41). Vorher wurde die Kapillarlänge soweit wie möglich reduziert, um die Trennung der PAKs zu beschleunigen. Eine Mindestlänge von 45 cm bei der monolithischen Kapillare war jedoch erforderlich, um die Kopplung zu verwirklichen.

Als Elektrolyt wurde eine Mischung, bestehend aus 80 % ACN und 20 % 5 mM Ammoniumacetat, pH 8,0, eingesetzt. Durch die geringe Ionenstärke waren der Stromfluss und die resultierende Joule'sche Wärme so gering, dass 30 kV als Trennungsspannung angelegt werden konnten. Die PAK-Mischung (Fluoren (**3**), Fluoranthren (**5**), Pyren (**6**), Anthracen (**20**) und Benz[a]pyren (**21**)) wurde im Elektrolyten gelöst, mit der monolithischen Kapillare basisliniengetrennt und massenspektrometrisch detektiert (Abbildung 3.42).

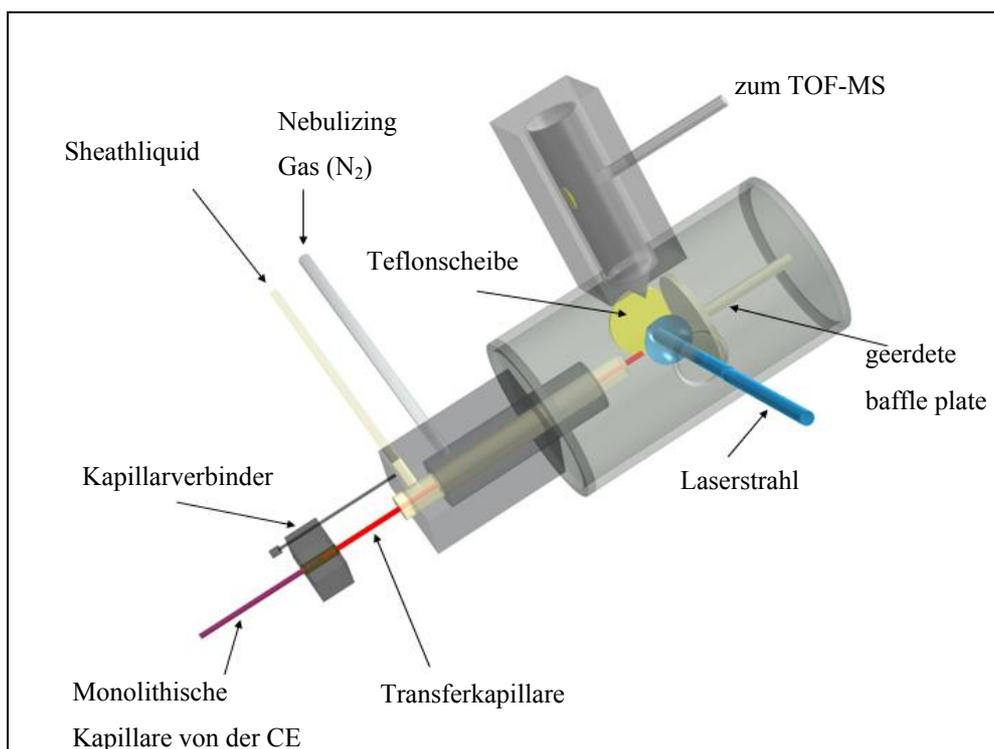


Abb. 3.41 Schematischer Aufbau des CEC-ES-APLI-MS-Interfaces mit Transferkapillare

In der Abbildung 3.43 ist das aus der Summe der Massenspektren resultierende Chromatogramm dargestellt. Bei den Nebensignalen in den Spektren handelt es sich um Verunreinigungen der Quelle und nicht um Fragmentierungen. Die ES-APLI stellt eine kalte und weiche Ionisierungsmethode dar. Fluoranthren und Pyren wurden aufgrund der identischen Massen nicht durch das Spektrum, sondern durch Aufstockexperimente zugeordnet. Die Analyten sind beim verwendeten Versuchsaufbau zeitgleich zwei verschiedenen Ionisierungsmethoden (der ESI und der APLI) ausgesetzt, die theoretisch in Konkurrenz zueinander stehen. Es wurde aber bereits durch die Messung eines Gemisches von Fluoren und Catechin bei ein- und ausgeschaltetem Laser (siehe Abbildung 3.37) gezeigt, dass die ESI nicht in der Lage ist, unpolare PAKs zu ionisieren. Die gebildeten Ionen sind somit ausschließlich auf den Laser zurückzuführen. Bei polareren aromatischen Systemen muss eine solche Konkurrenz der beiden Ionisationsmethoden kritisch berücksichtigt werden.

Fazit

In dieser Arbeit wurde zum ersten mal eine CEC-ES-APLI-MS-Kopplung verwirklicht. Eine schnelle und selektive Ionisierung der PAK-Moleküle erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, nach der Trennung an einem in der CEC-MS noch nicht eingesetzten Silika-Monolithen. Die Stärke der CEC, unpolare Substanzen voneinander zu trennen, konnte

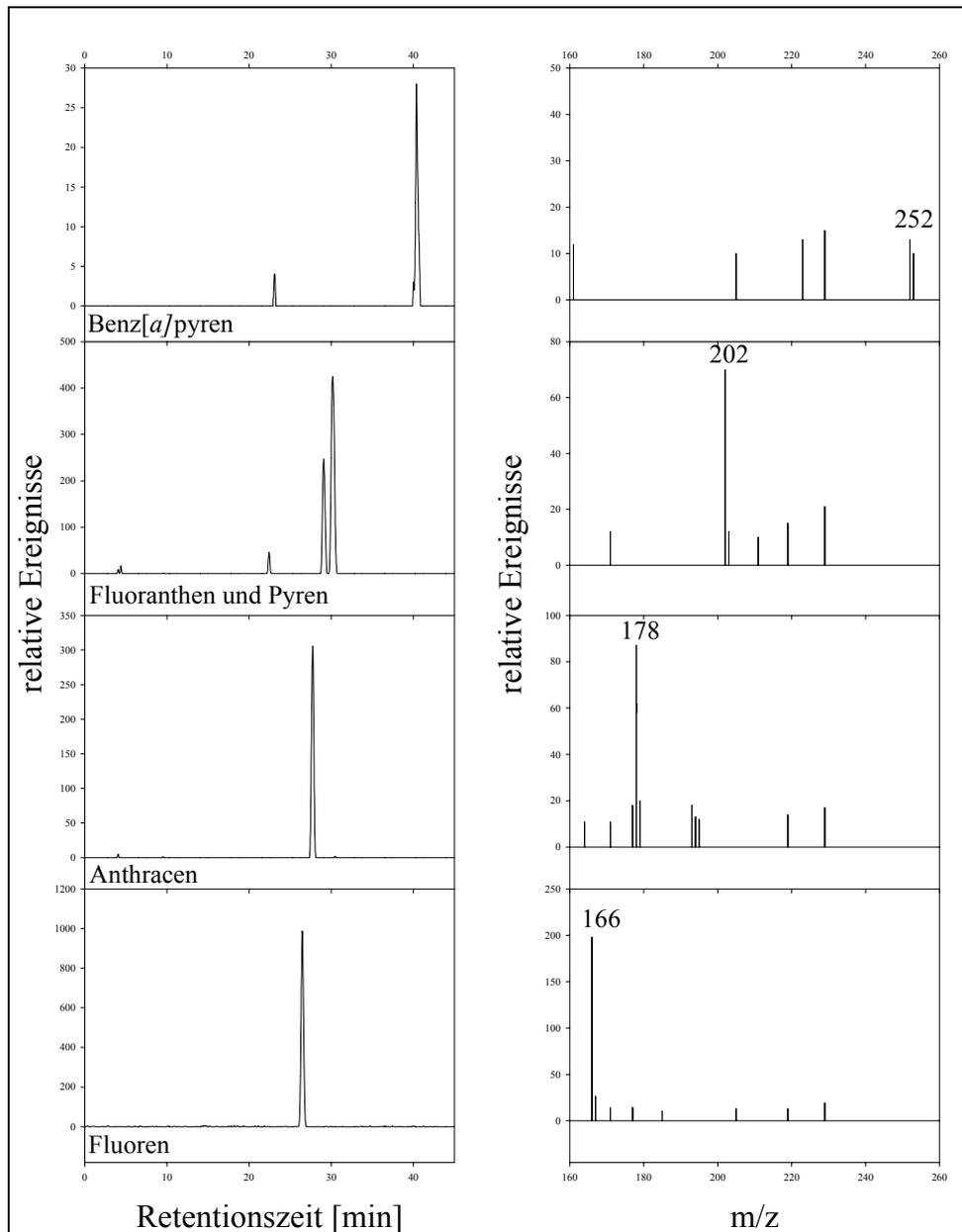


Abb. 3.42: Massenspektren von PAKs nach Trennung in einer CapROD-Kapillare und APLI-MS

durch Anwendung der APLI-MS ausgenutzt werden. Die bisher in der CEC eingesetzte Elektrosprayionisation ist hierfür ungeeignet. Ein interessanter Ausblick für die Zukunft ist die Möglichkeit, die Laserionisierung in einem „kalten“ Spray durchzuführen. Somit könnten auch thermolabile, aromatische Verbindungen als Radikalkationen detektiert werden. Um ein Optimum an Empfindlichkeit zu erhalten, ist in Folgearbeiten eine Synchronisierung des Pusher/Puller-Systems des TOF-Gerätes mit dem Laser wünschenswert. Die einfache Einbindung der APLI in ein ESI-Interface sollte es anderen Arbeitsgruppen ermöglichen, diese neue Ionisierungstechnik einzusetzen und somit zu einer Verbreitung und Etablierung der Methode beitragen. Besonders für ungeladene unpolare aromatische Verbindungen kann

hier eine Routinemethode entwickelt werden, da die APCI-Kopplung mit der CEC bisher noch nicht umgesetzt wurde und im Gegensatz zur literaturbekannter MEKC-APPI-MS [148] die Quelle nicht mit Tensiden belastet wird.

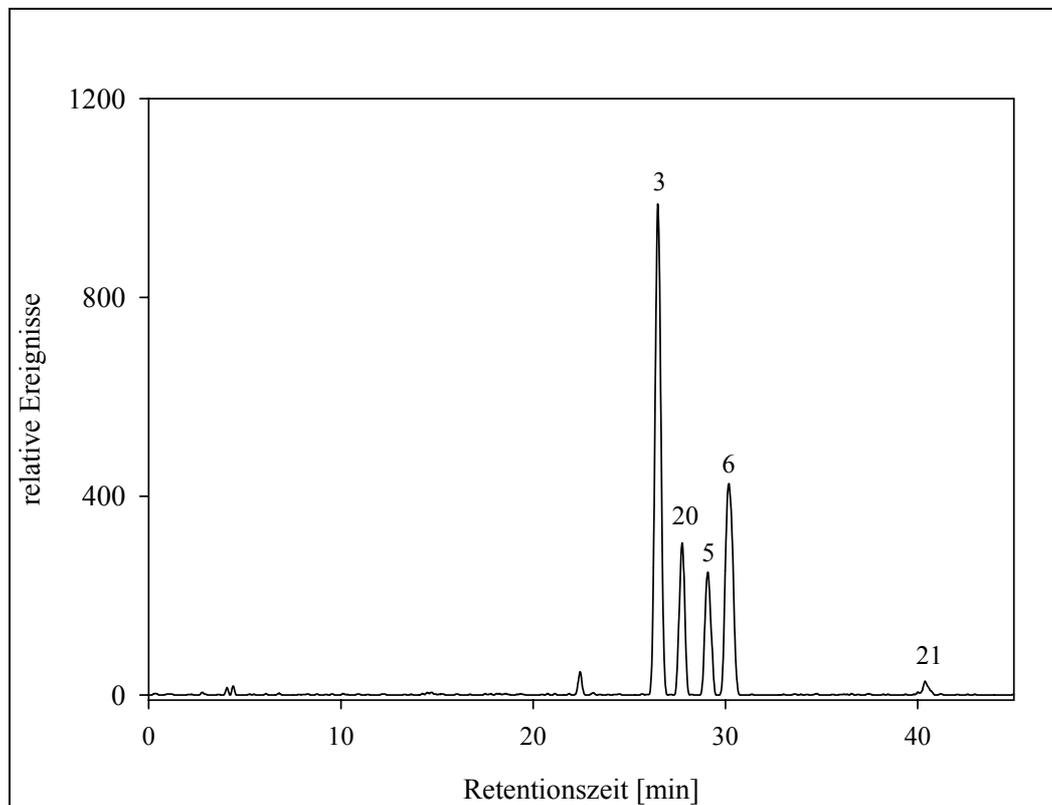


Abb. 3.44: Summe der Massenspuren nach Trennung von PAKs in einer CapROD-Kapillare und APLI-MS

3.4 Limitationen der CEC

Während dieser Arbeit wurden mehrere Limitationen der CEC festgestellt. So war die Trennung geladener Substanzen immer mit größten Schwierigkeiten verbunden. Die eingeschränkten Möglichkeiten bei der CEC den EOF zu variieren, macht bei negativ geladenen Substanzen die Detektion schwierig oder gar unmöglich. So konnte die in unserer Arbeitsgruppe routinemäßig eingesetzte MEKC zur Trennung derivatisierter DNA-Addukte durch die CEC nicht ersetzt werden. Eventuell würde dabei der Einsatz eines modularen Systems, welches den zusätzlichen Einsatz einer HPLC-Pumpe erlaubt eine Lösung bieten. In diesen Systemen wird der elektroosmotische Fluss durch Anlegen eines Druckes unterstützt. Diese Hybridtechnik wird pressure-assisted-CEC (pCEC) genannt und erlaubt aufgrund der HPLC-Pumpe ein Variieren des Flusses, unabhängig vom Phasenmaterial.

Die Bildung von Luftblasen bei partikulären Phasen ist ein massives Problem, so dass der wesentlich problemlosere Einsatz der monolithischen Phasen einen großen Vorteil darstellt. Das Spülen der partikulären Phasen, wie es nach der Entstehung von Luftblasen unvermeidlich ist, oder auch das Ausspülen von Matrixbestandteilen ist sehr zeitaufwendig. Aufgrund der notwendigen hohen Drücke kann nicht im CEC-Gerät gespült werden, weshalb die Kapillaren beispielsweise auch zum Elektrolytwechsel immer ausgebaut werden müssen. Dies erhöht die Bruchgefahr bei den empfindlichen Kapillaren und erschwert eine Elektrolytoptimierung erheblich.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden partikuläre und monolithische Kapillaren auf ihre Einsatzmöglichkeiten in der Kapillarelektrochromatographie (CEC) untersucht. Ein Problem der partikulären Kapillaren ist die wiederholt auftretende Luftblasenbildung, bevorzugt an der Auslassfritte der Kapillare. Daher wurden so genannte „getaperte Kapillaren“ verwendet, bei denen die Auslassfritte durch eine konische Verjüngung (Querschnittsverengung) der Kapillare ersetzt wird. Dies gelingt reproduzierbar mit einem neuen Verfahren unter Verwendung eines Lichtbogens. Durch Verkeilen der Partikel an der gebildeten Engstelle ergibt sich eine stabile Packung. Vergleichsmessungen haben gezeigt, dass die getaperten Kapillaren bei gleich bleibender Trennleistung weniger zur Luftblasenbildung neigen.

Eine weitere Reduzierung der Luftblasenbildung wurde bei den monolithischen Kapillaren beobachtet. Mit Hilfe des Molecular-Imprinting-Polymer(MIP)-Verfahrens konnten hochselektive Phasen synthetisiert werden. Ein MIP mit Cotinin als Templat, das durch photoinduzierte Polymerisation von Methacrylat hergestellt wurde, erlaubt die Trennung der strukturverwandten Verbindungen Cotinin, Myosmin und Nikotin. Sein Einsatz als SPE-Material in der Probenvorbereitung ist aufgrund der hohen Selektivität viel versprechend.

Weniger selektiv, aber zur Trennung lipophiler Analyten gut geeignet, waren die getesteten Acrylamid- und Silika-Monolithen. Die Luftblasenbildung war bei diesen frittenlosen Kapillaren kein Problem mehr. Obwohl die im Labor selbst hergestellten Acrylamid-Monolithen auf wasserlöslichen Monomeren beruhten, reichten die lipophilen Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase aus, um polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) zu trennen. Stärkere lipophile Eigenschaften zeigten die kommerziell erhältlichen RP-18-Silika-Monolithen. Sie zeichneten sich durch gute Trenneigenschaften gegenüber lipophilen, neutralen Verbindungen aus und erzeugten einen zufrieden stellenden EOF. Sowohl die Acrylamid-Monolithen als auch die Silika-Monolithen konnten problemlos mit der Massenspektrometrie (MS) gekoppelt werden. Mit Hilfe der ESI-MS wurden zunächst Alkylpolyglykoside (APGs) untersucht. Während die Lipophilie der Acrylamidphase zur Basislinientrennung nicht ausreichte, konnten die APGs auf der Silikaphase gut getrennt werden. Aufgrund der Tatsache, dass mit einem ESI-Interface nur polare Substanzen ionisiert werden können, die CEC aber besonders zur Trennung lipophiler Substanzen geeignet ist, wurde die vor kurzem neu entwickelte Atmospheric-Pressure-Laser-Ionisation (APLI) mit den monolithischen Kapillaren gekoppelt.

Der eingesetzte Acrylamid-Monolith wurde beim Einsatz des Lasers im Bereich der Kapillarspitze zerstört. Dies war wahrscheinlich auf eine Streuung des Laserstrahls im Ionisationsbereich zurückzuführen, wodurch die Kapillarspitze bestrahlt wurde. Aufgrund der Pyrolyseempfindlichkeit des Acrylamid-Monolithen entstanden so Bruchstücke mit vielen Stickstoffgruppen, die durch das ESI-Interface ionisiert wurden und ein hohes Hintergrundrauschen lieferten. Mit Hilfe des Silika-Monolithen konnte eine Trennung von PAKs mit anschließender TOF-MS-Detektion nach selektiver und weicher Ionisation erreicht werden. Durch den Einsatz dieser Technik konnte die Anwendung der CEC-MS auf lipophile Analyten ausgeweitet werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Methoden zur Herstellung der Kapillaren

Im Folgenden soll auf die Herstellung der verschiedenen Phasen und Kapillaren eingegangen werden, die im vorherigen Teil beschrieben und zur Analyse komplexer Gemische eingesetzt wurden.

Verschraubungen von Kapillaren

Für Verschraubungen von Kapillaren an Pumpen (HPLC-Pumpe, Füllkammer usw.) wurden Fingertight PEEK-Schrauben (CS-Chromatographie Service, Langerwehe) verwendet. In diese wurden PEEK-Schläuche (orange mit einem ID von 500 μm) zum Verbinden der Kapillaren (mit einem AD von 360 μm) gesteckt, wodurch beim Verschrauben die Kapillaren festgequetscht wurden.

Packen von partikulären Kapillaren

Bei Kapillaren mit 2 gesinterten Fritten wurde ein Hochdruck-Inline-Filter an die Kapillare geschraubt (Methode 1). Wichtig ist, dass die Kapillare auf dem Filter aufsitzt.

Bei Kapillaren mit konischer Verjüngung, wurde die Kapillare zunächst in den Spleißer festgeklemmt und dann der Lichtbogen eingeschaltet (Methode 2). Nach dem Verbrennen der Polyimidschicht, wurde durch das Okular das Zusammenschmelzen der Kapillare beobachtet. Beim Erreichen des gewünschten Durchmessers wurde das Spleißgerät ausgeschaltet und der Durchmesser mit einem Mikroskop kontrolliert. Um die Stelle gegen Bruch zu sichern, wurde ein 1 cm langes Stück einer GC-Kapillare mit 520 μm ID an der geschaffenen Engstelle mit Epoxidkleber festgeklebt.

Nach Anbringen der temporären Fritte (Methode 1) bzw. dem Trocknen des Klebers (Methode 2) wurde die Kapillare mit der Füllkammer verbunden.

Für die eingesetzten Packungsmaterialien eignen sich verschiedene Lösemittel. Es ist daher sinnvoll neues Packungsmaterial zunächst mit verschiedenen Lösemitteln, wie z.B. ACN, MeOH, THF usw. in einem Eppendorf-Cap aufzuschlämmen und die Absetzgeschwindigkeit zu beobachten. Je langsamer sich das Packungsmaterial absetzt, umso besser ist es als Slurry geeignet. Für die Slurry wurden dann 15 mg Packungsmaterial zu 300 μl Lösemittel in ein Eppendorf-Cap gegeben.

Für das ODS1-Material wurde Aceton, für die endcapped-Aminphase Methanol und für das BS-C23 Aceton als Lösungsmittel eingesetzt.

Die Slurry wurde für 2 Minuten stark geschüttelt (Vortex) und dann 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Kam es im Ultraschallbad zum Absetzen der Phase, wurde vor dem Umfüllen in die Füllkammer noch einmal kurz geschüttelt (Vortex).

Die Füllkammer wurde mit dem Slurry gefüllt, schnell verschraubt und Druck appliziert. Als Vordruck wurden 4 bar verwendet. Durch die Umsetzung im System von 1:150 entstehen so 600 bar auf der Kapillarseite. War die Kapillare nicht vollständig gefüllt, half ein Umdrehen und Abklopfen der Füllkammer. Wenn sich die Kapillare weiterhin nicht füllen ließ, musste die Füllkammer gereinigt und die verstopfte Kapillare ausgetauscht werden. Nach der Befüllung wurde sie weiterhin unter Druck für eine Stunde ins Ultraschallbad gelegt und anschließend die Fritten gebrannt. Bei Methode 1 erfolgte dies zunächst 15 cm von der temporären Fritte entfernt (Methode 2 hat die konische Verjüngung als Auslassfritte) und die Einlassfritte in gewünschter Entfernung, meist 25 cm von der Auslassfritte.

Zum Frittenbrennen wurden die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Temperaturen und Zeiten verwendet:

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [Sekunden]	Lsgs.-mittel (Slurry)
ODS 1	450	10	Aceton
e-NH ₂	450	15	Methanol
BS-C23	450	15	Aceton

Tabelle 5.1: Bedingungen zum Brennen von Fritten

Da die Einlassfritten nur zum Zurückhalten der Phase bei anliegendem elektrischen Feld eingesetzt werden, und sie keinen Drücken von 100 oder 200 bar standhalten müssen, brauchen sie nicht so stabil zu sein wie die Auslassfritten. Deshalb wurden die Einlassfritten bei den gleichen Temperaturen, aber nur halb solange gebrannt.

Erst nach dem Brennen der Fritten wurde der Druck langsam über 5 Minuten reduziert. Dann wurde die Kapillare an eine HPLC-Pumpe angeschlossen und mit dem gewünschten Elektrolyten über Nacht gespült. Dabei wurde überschüssiges Packungsmaterial (bei Methode 1) nach Entfernen der temporären Fritte ausgespült. Sollte sich das Packungsmaterial zunächst nicht gelöst haben, wurde das Ende der Kapillare in ein Ultraschallbad gehalten (VORSICHT! Dies kann zur Zerstörung der Fritte führen und die Packung wird dann komplett ausgespült). Kapillaren mit zwei gebrannten Fritten wurden bei

100 bar, Kapillaren mit konischer Verjüngung bei 200 bar gespült. Die Elektrolyten wurden vor dem Spülvorgang 30 Minuten im Ultraschallbad entgast. Während des Spülens mit Elektrolyt wurde ein Fenster in die Kapillare geätzt. Dazu wird ein Tropfen 98%iger Schwefelsäure auf die Spitze eines 250 °C heißen Lötkolbens getropft und auf die gewünschten Stelle an der Kapillare aufgetragen. Die Polyimidschicht wurde dadurch sofort entfernt und das Fenster abschließend mit viel Wasser und Methanol gereinigt.

Belegung der Kapillaren mit 3-trimethoxysilylpropyl-Methacrylat

Zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Polymeren und Kapillarwand muss die Kapillare zunächst mit 3-trimethoxysilylpropyl-Methacrylat (Bindesilan) belegt werden.

Die 75 µm Kapillaren wurden dazu mit verschiedenen Lösungen bei 2 bar gespült:

- a) Aceton für 15 min
- b) 0,1 M HCl für 15 min
- c) 0,1 M NaOH für 15 min, anschließend wurden die Kapillarenden für 30 min in der Lösung stehen gelassen
- d) Millipore Wasser 15 min
- e) Aceton für 15 min
- f) 1 Säulenvolumen Luft
- g) 30% (v/v) Bindesilan (in Aceton gelöst) für 15 min, danach über Nacht mit Kapillarenden im Bindesilan stehen lassen
- h) Aceton für 10 min
- i) Millipore Wasser 10 min

Die so behandelten Kapillaren wurden zum Lagern mit Stickstoff trockengespült und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Herstellung des Molecular-Imprinted-Polymer (MIP)-Monolithen

Es wurde eine 30 cm lange MIP-Kapillare hergestellt. Die Kapillare hatte einen ID von 75 µm und war aufgrund einer Teflummantelung UV-durchlässig. Die Kapillare wurde, wie in 5.3 bereits beschrieben, zunächst mit Bindesilan belegt.

Als Templat diente zunächst Propranolol, welches nur als Hydrochlorid kommerziell erhältlich ist. Da die Wechselwirkung auf Wasserstoffbrückenbindungen beruht, wurde zunächst die freie Base isoliert. Dazu wurde das Hydrochlorid in gesättigter NaHCO₃-Lösung

aufgenommen und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde im Vakuumrotationsverdampfer abgezogen und die freie Base bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Monomerenzusammensetzung wurde analog der Arbeit von SCHWEITZ et al. gewählt [134]. Die Monomeren 0,12 mol/L Methylmethacrylsäure, 0,12 mol/L Methacrylsäure und 0,24 mol/L TRIM, wurden in einem Gemisch aus 98 % Toluol und 2 % Isooctan (v/v) gelöst. Als Templat wurde 30 mM S-Propranolol als freie Base zugegeben. Die Lösemittel wurden vor ihrem Einsatz 24 h mit einem aktivierten Molekularsieb von Wasser befreit. Zuletzt wurde AIBN als Radikalstarter zur Mischung gegeben und die Kapillare gefüllt.

Die gefüllte Kapillare wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ein Tiefkühlfach gelegt, 15 min lang abgekühlt und danach für 16 h mit einer UV-Lampe ($\lambda = 254\text{ nm}$, DC-Detektionslampe) bestrahlt. Danach wurde die Kapillare in mehreren Schritten mit Hilfe einer HPLC-Pumpe bei 100 bar gespült:

- a) ACN für 30 Minuten
- b) 90/10 (v/v) MeOH/ 0,1 M Essigsäure für 30 Minuten
- c) Puffer für 60 Minuten

Zur Konditionierung und zur Analyse wurde ein Triethanolamin–Phosphat-Puffer, pH 3,0, verwendet. Dazu wurde mit 25 mM Phosphorsäure eine 25 mM Triethanolamin Lösung bis zum pH von 3,0 titriert.

Die Polymerisierung in der zweiten Kapillare erfolgte mit 30 mM Myosmin als Templat. Das Entsalzen des Analyten war hierbei nicht notwendig, und die restlichen Bedingungen wurden konstant gehalten.

Herstellung der Acrylamidpolymer-Monolithen.

Die Kapillare wurde wie bereits beschrieben zunächst mit Bindsilan belegt.

Die übliche Charakterisierung von Polymerzusammensetzungen in der Literatur beruht auf HJERTÉN [154]:

$$T = \frac{a + b}{1} \% \text{ (w/v auf 100 ml)}$$

$$C = \frac{100b}{a + b} \% \text{ (w/v auf 100 ml)}$$

mit T = Gesamtmenge Monomeren (inklusive Crosslinker)

C = Menge an Crosslinker

a = Monomer 1 (z.B.: Isopropylacrylamid)

b = Monomer 2 (z.B.: Piperazindiacrylamid)

Die eingesetzten Monomere sind in Anlehnung an die Arbeit von HOEGGER und FREITAG [83] mit C = 45%; T = 15% gewählt worden.

In 200 μL Puffer wurden somit 0,0135 g Piperazindiacrylamid, 0,0165 g Isopropylacrylamid und 10 mg Ammoniumsulfat in einem Eppendorf-Cap vollständig gelöst. Nach dem Lösen wurden 3 μL 25 %ige Vinylsulfonsäure als Ladungsträger zugegeben, erneut gemischt und anschließend das Eppendorf-Cap zum Entgasen für 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Nach dem Entgasen wurden je 5 μL 10 %ige Ammoniumperoxidisulfat Lösung (in Puffer) und 10%ige TEMED-Lösung zur Mischung zugegeben, kurz umgerührt und sofort mit 2 bar in die Kapillare gedrückt. Sobald die Polymerisierungsreaktion erkennbar gestartet war, wurde die Kapillare aus dem Reaktionsgefäß genommen und die Enden mit viskosem Schliff fett versiegelt. Der Inhalt der Kapillare polymerisierte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Kapillare zunächst 4 h mit Wasser gespült und dann 2 h mit Elektrolyt konditioniert. Die Polyimidschicht wurde im Bereich des Fensters wie bei den partikulären Phasen weggeätzt. Das Polymer wurde durch Anlegen eines 200 °C heißen Widerstanddrahtes im Bereich des Fensters während des Spülens mit Wasser pyrolysiert. Dadurch entstand ein freier Bereich in der Kapillare, der eine optische Detektion ermöglichte.

Die Packung der Kapillare ist von der Reaktionsgeschwindigkeit abhängig. Je schneller die Polymerisierung abläuft, desto kürzer ist die Packung der Kapillare. Mit der gewählten Monomerenmischung konnten Kapillaren bis zu einer Länge von 60 cm bei 75 μm ID gepackt werden. Bei der Verwendung größerer Innendurchmesser neigte das gebildete Polymer zum Schrumpfen. Die Kapillaren wurden nach der Polymerisation mit einem Mikroskop auf Fehlstellen untersucht.

Folgende generelle Auswirkungen der Monomerenzusammensetzung auf die Morphologie und Reaktion des Polymers wurden festgestellt:

- Eine Erhöhung des Crosslinkeranteils ergab sehr feste, undurchlässige Strukturen.
- Eine Erhöhung des Ammoniumsulfat-Anteils verstärkte den Aussalzeffekt des gebildeten Polymers und die Ketten wurden kürzer, das Polymer war durchlässiger, zeigte aber weniger hydrophobe Wechselwirkungen.
- Eine Erhöhung des Radikalstarters beschleunigte die Polymerisation. Die Kapillarlänge musste reduziert werden.

5.2 Fluoreszenzmakierung der Wirkstoffe

Die Wirkstoffderivatisierung ist eine Zweiphasenreaktion und geht auf die Arbeit von MÖSCHTER [144] zurück. Dabei wurden 10 μl 250 μM Wirkstoff in 50 mM HEPES, pH 6,0, gelöst. Diese Mischung wurde dann mit 10 μl 5,4 M DCC (in Toluol gelöst), 10 μl 12,5 mM Bodipy-FL EDA (50 mM HEPES pH 6,0) und 200 μl Toluol versetzt. Die Umsetzung fand bei 15°C in einem Thermomixer bei 800 U/min für 4 h statt.

Anschließend wurden 185 μl Toluol abpipetiert. Zum Rest wurden wieder 200 μl Toluol gegeben und 10 Sekunden mit einem Vortex-Mixer gemischt und extrahiert. Nach erneutem abpipetieren von 185 μl Toluol wurde dieser Vorgang zur vollständigen Extraktion des Wirkstoffderivates wiederholt.

Die vereinten Toluolphasen wurden mit Hilfe eines Vakuumrotationsverdampfers (Speed vac) eingedampft und die Probe zur Messung in 100 μl Elektrolyt aufgenommen.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: CEC als Hybridmethode aus μ -HPLC und CE	10
Abb. 1.2: Vergleich der Strömungsprofile in CEC und HPLC	11
Abb. 1.3: EOF in gepackter Kapillare nach [33]	14
Abb. 1.4: Schema zur Herstellung eines MIP-Monolithen nach [100]	26
Abb. 1.5: Schematische Übersicht über den ESI-Prozess	29
Abb. 3.1: Schematische Herstellung von partikulär gepackten CEC-Kapillaren	32
Abb. 3.2: Aufbau zum Packen der Kapillare und Sintern der Fritten	33
Abb. 3.3: Abbildung eines optischen Spleissgerätes mit eingespannter Kapillare	34
Abb. 3.4: Schematischer Vergleich zwischen verzüngter und klassischer Kapillare	35
Abb. 3.5: Trennung einer PAK-Mischung auf einer Kapillare mit zwei gesinterten Fritten, 5 μ m ODS 1	37
Abb. 3.6: Trennung einer PAK-Mischung auf einer getaperten Kapillare, 5 μ m ODS 1	38
Abb. 3.7.: Trennung einer PAK-Mischung auf einer getaperten Kapillare, 3 μ m ODS 1	39
Abb. 3.8: Trennung des Testgemisches bei unterschiedlichen pH-Werten	41
Abb. 3.9: Trennung des Testgemisches bei variierendem Anteil von Acetonitril	45
Abb. 3.10: Trennung eines Testgemisches bei variierender Ionenstärke	46
Abb. 3.11: Chromatogramm einer Wirkstoffmischung bei pH 2,2	49
Abb. 3.12: Chromatogramm einer Wirkstoffmischung bei pH 4,6	49
Abb. 3.13: Trennung einer PAK-Mischung an einer BS-C23-Phase	51
Abb. 3.14: Trennung von racemischen Propranolol	53
Abb. 3.15: Trennung von Nikotin, Myosmin und Cotinin auf einer MIP Kapillare	55
Abb. 3.16 Postulierter Reaktionsmechanismus von APS in Anwesenheit von TEMED	57
Abb. 3.17: Apparatur zum Befüllen einer Kapillare mit Pre-Polymerisat	58
Abb. 3.18: PAK-Trennung an einer Acrylamidphase (kathodischer EOF)	59
Abb. 3.19: PAK-Trennung an einer Acrylamidphase (anodischer EOF)	60
Abb. 3.20: Optimierte PAK-Trennung an einer Acrylamidphase (anodischer EOF)	61
Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Kapillarkopplung	62
Abb. 3.22: Trennung der PAKs mit CapROD-Kapillare	62
Abb. 3.23 : Derivatisierungsreaktion von BODIPY FL EDTA mit Wirkstoffen	64
Abb. 3.24: Kopplung der monolithischen Kapillare mit einer freien Kapillare zur LIF-Detektion	65

Anhang	97
Abb. 3.25: Analyse von derivatisierten Wirkstoffen mittels CEC-LIF	66
Abb. 3.26: Analyse der derivatisierten Wirkstoffe mittels CEC-LIF nach Druckinjektion.	66
Abb. 3.27: Schematische Darstellung der selbst gebauten Auslasszelle	67
Abb. 3.28: Auseinandergeschraubte Auslasszelle des LIF-Detektors	67
Abb. 3.29: Trennung derivatisierter Wirkstoffe an 5 μ m ODS 1	68
Abb. 3.30: Allgemeine Strukturformel der APGs; DP = Polymerisierungsgrad; n = 7-17	69
Abb. 3.31: Schematischer Aufbau des CEC-ESI-MS-Interfaces	71
Abb. 3.32: Massenspuren APG-C ₈ , -C ₁₀ , -C ₁₂ , -C ₁₄ , -C ₁₆ , -C ₁₈ APG mit DP =1 nach Trennung an Acrylamidphase.	72
Abb. 3.33: Aufbau der CEC-ES-APLI-MS im Labor	76
Abb. 3.34 Schematischer Aufbau des CEC-ES-APLI-MS-Interfaces	76
Abb. 3.35: links: Seitenansicht der ESI-Quelle mit 3 konzentrisch angeordneten Kapillaren rechts: Aufsicht durch Prisma auf die ESI -Quelle.	77
Abb. 3.36: Funktionstest des ES-APLI-Interfaces	78
Abb. 3.37: Fokussierung des Lasers auf das Ionisationsvolumen unmittelbar vor der Cone	80
Abb. 3.38: TIC Trennung der PAKs und beispielhaftes Spektrum bei Minute 57	81
Abb. 3.39 Schematischer Aufbau des CEC-ESI-MS-Interfaces mit Transferkapillare	82
Abb. 3.40: Ionenspuren und Spektren der APGs nach Trennung mit einer CapROD-Kapillare	83
Abb. 3.41 Schematischer Aufbau des CEC-ES-APLI-MS-Interfaces mit Transferkapillare	84
Abb. 3.42: Massenspuren von PAKs nach Trennung in einer CapROD-Kapillare und APLI-MS	85
Abb. 3.44: Summe der Massenspuren nach Trennung von PAKs in einer CapROD-Kapillare und APLI-MS	86

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Bodenzahlen in der CEC mit partikulärem Material.....	39
Tabelle 3.2: Testmischung zur Charakterisierung einer endcapped-Aminphase.....	40
Tabelle 3.3: Wirkstoffe aus der Gruppe der NSAR und Lipidsenker	48
Tabelle 3.4: Strukturen von Nikotin, Myosmin und Cotinin	54
Tabelle 3.5: Bezeichnung und Polymerisationsgrad der APGs	71

6.3 Chemikalienliste

Folgende, in dieser Arbeit eingesetzte, Chemikalien wurden von den aufgeführten Firmen bezogen:

Substanz	Hersteller
(s)-Propranolol Hydrochlorid	Fluka
1,1,1-Tris-(hydroxymethyl)-propan-trimethacrylat	Aldrich Chemie
2,2'-Azobis-2 Methylpropionitril	Sigma
3,5-Dinitrobenzoesäure	Merck
Acetonitril LiChrosolv	Merck
Ammoniumacetat	Fluka
Ammoniumhydroxid	Fluka
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ammoniumsulfat	Fluka
Anthracen	EGA Chemie
Benzo[a]pyren	Sigma
Bezafibrat	Acros
Bodipy FL-EDA	Molecular Probes
Catechin	Sigma
Cotinin	Sigma
DCC	Sigma
Diclofenac	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Essigsäure	J.T. Baker
Fluoranthren	Aldrich Chemie
Fluoren	Merck
Gemfibrozil	Sigma
HEPES	Sigma
Ibuprofen	Sigma
Indomethacin	Sigma
Methacryloxypropyl-Trimethoxysilan	Sigma
Methacrylsäure	Fluka
Methacrylsäureamid	Fluka
Methacrylsäure-methylester	Fluka
Methanol	Fisher Scientific
Myosmin	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Fluka
N,N-Dimethylacrylamid	Aldrich Chemie
N-Allyldimethylamin	Fluka
Naphtalin	Sigma

Naproxen	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck
N-Isopropylacrylamid	Aldrich Chemie
Phenanthren	Sigma
Phosphorsäure (85 %ig)	Merck
p-Hydroxyphenylelessigsäuremethylester	Aldrich Chemie
Piperazin Diacrylamid	Bio-Rad Laboratories
Propranolol Hydrochlorid (rac)	Fluka
Pyren	Sigma
Schwefelsäure 98% ig	Merck
Thioharnstoff	Merck
Toluol	Merck
Triethanolamin	Merck
Tris-(hydroxymethyl)aminomethane	Fluka
Vinylsulfonsäure (30%ige Natriumsalzlösung)	Fluka
Wasser (Millipore)	Eigene Anlage

Das zum Ansetzen der Puffer verwendete Wasser wurde im Labor mit Hilfe einer Milli Q synthesis A 10 Anlage der Firma Millipore aufgereinigt.

6.4 Geräteliste

Kapillarelektrophorese System	Agilent <i>HP^{3d}CE</i> Instrument DAD – Detektor Hochdruck auf Ein- und Auslassgefäße
Externe Detektoren	
MS Gerät	Micromass <i>Ultima Q-TOF 2</i>
ESI-Interface	Micromass Nanoflow Elektrospray Quelle Stickstoffgenerator PEAK Scientific Spritzenpumpe Harvard, Apparaturen
APLI	Optex, KrF Excimer Laser 248 nm Lamda Physik
LIF-Detektor	Picometrics mit Ar-Ionen Laser 488 nm
Kapillaren	
	Polymicron Fused Silica Kapillaren ID 75 µm Fused Silica UV durchlässig, ID 75 µm Merck Chromolith [®] CapROD ID 100µm
Füllen und Modifizieren der Kapillaren	
Vortex Mixer	Merck
Spleissgerät	F&G Nachrichtenkabel- und anlagen, OSG-15
Pumpe zum Packen	Haskel, DSTV-150
Pumpe zum Spülen	Merck, L7110 LaChrom
Fritten	Widerstandsheizung, Eigenbau
Ultraschallbad	Merck, Qualilab
UV-Lampe	Desaga, MinUVIS (254 und 366 nm)

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kohlrausch F, Über Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen, *Ann.Phys.Chem.* 1897, 62, 209-239.
- [2] Tiselius A, A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, *Trans.Faraday Soc.* 1937, 33, 524-531.
- [3] Mikkelsen SR and Corton E, *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2004.
- [4] Hjerten S, Free Zone electrophoresis, *Chromatogr.Rev.* 1967, 9, 122-239.
- [5] Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen TPEM, High performance zone electrophoresis, *Journal of Chromatography* 1979, 169, 11-20.
- [6] Jorgenson JW, Lukacs KD, Capillary zone electrophoresis, *Science* 1983, 222, 266-272.
- [7] Jorgenson JW, Lukacs KD, High resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis, *Journal of Chromatography* 1981, 218, 209-216.
- [8] Jorgenson JW, Lukacs KD, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries; preliminary data on performance, *HRC&CC* 1981, 4, 230-231.
- [9] Foret F, Krivankova L, and Bocek P, *Capillary Zone Electrophoresis*, VCH, Weinheim, 1993.
- [10] Engelhardt H, Beck W, and Schmitt T, *Kapillarelektrophorese*, Vieweg, Braunschweig, 1994.
- [11] Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando T, Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries, *Analytical Chemistry* 1984, 56, 111-113.

- [12] Venter JC, Adams MD, Myers EW, The sequence of the human genome, *Science* 2001, 291, 1304-1351.
- [13] Hjertén S, Zhu MD, Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing, *Journal of Chromatography* 1985, 346, 265-270.
- [14] Hjertén S, Kilár F, Liao JL, and Zhu MD, in *Electrophoresis*, M.J.Dunn (Editor), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1986, p. 451-461.
- [15] Hjertén S, Elenbring K, Kilár F, Liao JL, Chen AJ, Siebert CJ, Zhu MD, Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus, *Journal of Chromatography* 1987, 403, 47-61.
- [16] Righetti PG, *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1983.
- [17] Krull IS, Stevenson R, and Mistry K, *Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography – an introduction*, HNB Publishing, New York, 2000.
- [18] Knox JH, Grant IH, Miniaturization in Pressure and Electroosmotically Driven Liquid-Chromatography - Some Theoretical Considerations, *Chromatographia* 1987, 24, 135-143.
- [19] Pretorius V, Hopkins BJ, Schieke JD, Electro-osmosis: A new concept for high-speed liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1974, 99, 23-30.
- [20] Knox JH, Thermal Effects and Band Spreading in Capillary Electro-Separation, *Chromatographia* 1988, 26, 329-337.
- [21] Eeltink S, Rozing GR, Kok WT, Recent applications in capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 2003, 24, 3935-3961.

- [22] Fujimoto C, Packing materials and separation efficiencies in capillary electrochromatography, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 1999, 18, 291-301.
- [23] Jinno K, Sawada H, Open-tubular capillary electrochromatography (Review), *Bunseki Kagaku* 1999, 48, 957-971.
- [24] Tallarek U, Rapp E, Scheenen T, Bayer E, Van As H, Electroosmotic and pressure-driven flow in open and packed capillaries: Velocity distributions and fluid dispersion, *Analytical Chemistry* 2000, 72, 2292-2301.
- [25] von Smoluchowski M, in I.Graetz (Editor), *Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus*, Barth, Leipzig, 1921, p. 366-428.
- [26] Rice CL, Whitehead R, Electrokinetic Flow in a Narrow Cylindrical Capillary, *Journal of Physical Chemistry* 1965, 69, 4017-4024.
- [27] Overbeek JTG, Electrokinetic phenomena, in *Colloid Science*, H. R. Kruyt (Editor), Elsevier, Amsterdam, p. 194-243, 1952.
- [28] Rathore AS and Horvath C, in *Capillary Electrochromatography*, Z.Deyl and F.Svec (Editors), Elsevier, Amsterdam, 2001, Ch. 1, p. 1-37.
- [29] Colon LA, Burgos G, Maloney TD, Cintron JM, Rodriguez RL, Recent progress in capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 2000, 21, 3965-3993.
- [30] Bartle KD, Carney RA, Cavazza A, Cikalo MG, Myers P, Robson MM, Roulin SCP, Sealey K, Capillary electrochromatography on silica columns: factors influencing performance, *Journal of Chromatography A* 2000, 892, 279-290.
- [31] Rathore AS, Horvath C, Capillary electrochromatography: theories on electroosmotic flow in porous media, *Journal of Chromatography A* 1997, 781, 185-195.
- [32] Robson MM, Cikalo MG, Myers P, Euerby MR, Bartle KD, Capillary electrochromatography: A review, *Journal of Microcolumn Separations* 1997, 9, 357-372.

- [33] Smith N, Capillary Electrochromatography, Beckman Coulter incorporation, 1999.
- [34] Rathore AS, Theory of electroosmotic flow, retention and separation efficiency in capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 2002, 23, 3827-3846.
- [35] Knox JH, Grant IH, Electrochromatography in Packed Tubes Using 1.5 to 50 μ -M Silica-Gels and Ods Bonded Silica-Gels, *Chromatographia* 1991, 32, 317-328.
- [36] Rathore AS, Wen E, Horvath C, Electroosmotic mobility and conductivity in columns for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry* 1999, 71, 2633-2641.
- [37] Seifar RM, Kok WT, Kraak JC, Poppe H, Capillary electrochromatography with 1.5 μ m ODS-modified non-porous silica spheres, *Chromatographia* 1997, 46, 131-136.
- [38] Knox JH, Boughtflower R, Capillary electrochromatography - the LC analogue of capillary GC, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2000, 19, 643-647.
- [39] Horvath CS, Lin HJ, Movement and band spreading of unadsorbed solutes in liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1976, 126, 401-420.
- [40] Horvath CS, Lin HJ, Band spreading in liquid chromatography: General plate height equation and a method for the evaluation of the individual plate height contributions, *Journal of Chromatography* 1978, 149, 43-70.
- [41] Dittmann MM, Wienand K, Bek F, Rozing GP, Theory and practice of capillary electrochromatography, *Lc Gc-Magazine of Separation Science* 1995, 13, 800-814.
- [42] Altria KD, Smith NW, Turnbull CH, Analysis of acidic compounds using capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1998, 717, 341-353.
- [43] Dittmann MM, Rozing GP, Capillary electrochromatography - A high-efficiency micro-separation technique, *Journal of Chromatography A* 1996, 744, 63-74.

- [44] Behnke B, Grom E, Bayer E, Evaluation of the Parameters Determining the Performance of Electrochromatography in Packed Capillary Columns, *Journal of Chromatography A* 1995, 716, 207-213.
- [45] Roulin S, Dmoch R, Carney R, Bartle KD, Myers P, Euerby MR, Johnson C, Comparison of different packing methods for capillary electrochromatography columns, *Journal of Chromatography A* 2000, 887, 307-312.
- [46] Piraino SM, Dorsey JG, Comparison of frits used in the preparation of packed capillaries for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry* 2003, 75, 4292-4296.
- [47] Knox JH, Band dispersion in chromatography - a new view of A-term dispersion, *Journal of Chromatography A* 1999, 831, 3-15.
- [48] Colon LA, Maloney TD, Fermier AM, Packing columns for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 2000, 887, 43-53.
- [49] Liu Z, Zou HF, Ni JY, Zhang YK, Open tubular capillary electrochromatography with adsorbed stationary phase, *Analytica Chimica Acta* 1999, 378, 73-76.
- [50] Tan ZXJ, Remcho VT, Preparation and evaluation of bonded linear polymethacrylate stationary phases for open tubular capillary electrokinetic chromatography, *Analytical Chemistry* 1997, 69, 581-586.
- [51] Guo Y, Colon LA, Modification of the Inner Capillary Surface by the Sol-Gel Method - Application to Open-Tubular Electrochromatography, *Journal of Microcolumn Separations* 1995, 7, 485-491.
- [52] Jinno K, Sawada H, Recent trends in open-tubular capillary electrochromatography, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2000, 19, 664-675.
- [53] Tsuda T, Nomura K, Nakagawa G, Open Tubular microcapillary liquid chromatography with electroosmosis using a UV-Detector, *Journal of Chromatography* 1982, 248, 241-247.

- [54] Dittmann M and Rozing GP, in K.D.Bartle and P.Myers (Editors), *Capillary Electrochromatography*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001, Ch. 5, p. 64-86.
- [55] Kapnissi-Christodoulou CP, Zhu XF, Warner IM, Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 2003, 24, 3917-3934.
- [56] Mistry K, Krull I, Grinberg N, Capillary electrochromatography: An alternative to HPLC and CE, *Journal of Separation Science* 2002, 25, 935-958.
- [57] Hilder EF, Svec F, Frechet JMJ, Polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 2002, 23, 3934-3953.
- [58] Vanhoenacker G, Van den Bosch T, Rozing G, Sandra P, Recent applications of capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 2001, 22, 4064-4103.
- [59] Adam T, Ludtke S, Unger KK, Packing and stationary phase design for capillary electroendosmotic chromatography (CEC), *Chromatographia* 1999, 49, S49-S55.
- [60] Scherer B, Steiner F, Application of hydrophobic anion-exchange phases in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 2001, 924, 197-209.
- [61] Angus PDA, Demarest CW, Catalano T, Stobaugh JF, Aspects of column fabrication for packed capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 2000, 887, 347-365.
- [62] Robson MM, Roulin S, Shariff SM, Raynor MW, Bartle KD, Clifford AA, Meyers P, Euerby MR, Johnson CM, Capillary electrochromatography using columns packed with a supercritical fluid carrier, *Chromatographia* 1996, 43, 313-321.
- [63] Tang QL, Xin BM, Lee ML, Monolithic columns containing sol-gel bonded octadecylsilica for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 1999, 837, 35-50.
- [64] Fermier AM, Colon LA, Capillary electrochromatography in columns packed by centripetal forces, *Journal of Microcolumn Separations* 1998, 10, 439-447.

- [65] Maloney TD, Colon LA, A drying step in the protocol to pack capillary columns by centripetal forces for capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 1999, 20, 2360-2365.
- [66] Stol R, Mazereeuw M, Tjaden UR, van der Greef J, Pseudo-electrokinetic packing of high efficiency columns for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 2000, 873, 293-298.
- [67] Svec F, Tennikova TB, and Deyl Z, *Monolithic Materials*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- [68] Tanaka N, Nagayama H, Kobayashi H, Ikegami T, Hosoya K, Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Cabrera K, Lubda D, Monolithic silica columns for HPLC, micro-HPLC, and CEC, *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography* 2000, 23, 111-116.
- [69] Tanaka N, Kobayashi H, Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Hosoya K, Ikegami T, Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations, *Journal of Chromatography A* 2002, 965, 35-49.
- [70] Chirica G, Remcho VT, Silicate entrapped columns - new columns designed for capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 1999, 20, 50-56.
- [71] Ishizuka N, Minakuchi H, Nakanishi K, Soga N, Nagayama H, Hosoya K, Tanaka N, Performance of a monolithic silica column in a capillary under pressure-driven and electrodriven conditions, *Analytical Chemistry* 2000, 72, 1275-1280.
- [72] Nakanishi K, Pore Structure Control of Silica Gels Based on Phase Separation *Journal of Porous Material* 1997, 4, 67-112.
- [73] Tanaka N and Kobayashi H, in Z.Deyl and F.Svec (Editors), *Capillary Electrochromatography*, Elsevier, Amsterdam, 2001, p. 165-181.
- [74] Tanaka N, Kobayashi H, Nakanishi K, Minakuchi H, Ishizuka N, Monolithic LC columns, *Analytical Chemistry* 2001, 73, 420A-429A.

- [75] Allen D, El Rassi Z, Capillary electrochromatography with monolithic silica column: I. Preparation of silica monoliths having surface-bound octadecyl moieties and their chromatographic characterization and applications to the separation of neutral and charged species, *Electrophoresis* 2003, 24, 408-420.
- [76] Kinkel JN, Unger KK, Role of solvent and base in the silanization reaction of silicas for reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1984, 316, 193-200.
- [77] Nakanishi K, Shikata H, Ishizuka N, Koheiya N, Soga N, Tailoring Mesopores in Monolithic Macroporous Silica for HPLC, *Journal of High Resolution Chromatography* 2000, 23, 106-110.
- [78] Cabrera K, Applications of silica-based monolithic HPLC columns, *Journal of Separation Science* 2005, 27, 843-852.
- [79] Allen D, El Rassi Z, Silica-based monoliths for capillary electrochromatography: Methods of fabrication and their applications in analytical separations, *Electrophoresis* 2003, 24, 3962-3976.
- [80] Dulay MT, Kulkarni RP, Zare RN, Preparation and characterization of monolithic porous capillary columns loaded with chromatographic particles, *Analytical Chemistry* 1998, 70, 5103-5107.
- [81] Hjerten S, Liao JL, Zhang J, High-Performance Liquid-Chromatography on Continuous Polymer Beds, *Journal of Chromatography* 1989, 473, 273-275.
- [82] Liao JL, Zhang R, Hjerten S, Continuous Beds for Standard and Micro High-Performance Liquid-Chromatography, *Journal of Chromatography* 1991, 586, 21-26.
- [83] Hoegger D, Freitag R, Investigation of conditions allowing the synthesis of acrylamide-based monolithic microcolumns for capillary electrochromatography and of factors determining the retention of aromatic compounds on these stationary phases, *Electrophoresis* 2003, 24, 2958-2972.

- [84] Peters EC, Petro M, Svec F, Frechet JMJ, Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry, *Analytical Chemistry* 1998, 70, 2288-2295.
- [85] Peters EC, Petro M, Svec F, Frechet JMJ, Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry* 1997, 69, 3646-3649.
- [86] Hoegger D, Freitag R, Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 2001, 914, 211-222.
- [87] Matsui J, Nicholls IA, Takeuchi T, Highly stereoselective molecularly imprinted polymer synthetic receptors for cinchona alkaloids, *Tetrahedron Asymmetry* 1996, 7, 1357-1361.
- [88] Kempe M, Mosbach K, Direct Resolution of Naproxen on A Noncovalently Molecularly Imprinted Chiral Stationary-Phase, *Journal of Chromatography A* 1994, 664, 276-279.
- [89] Wulff G, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - A Way towards Artificial Antibodies, *Angewandte Chemie-International Edition* 1995, 34, 1812-1832.
- [90] Mosbach K, Ramström O, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Biotechnology* 1996, 14, 163-170.
- [91] Nicholls IA, Andersson LI, Mosbach K, Recognition and Enantioselection of Drugs and Biochemicals Using Molecularly Imprinted Polymer Technology, *Trends in Biotechnology* 1995, 13, 47-51.
- [92] Takagishi T, Klotz IM, Macromolecule-Small Molecule Interactions - Introduction of Additional Binding-Sites in Polyethyleneimine by Disulfide Crosslinkages, *Biopolymers* 1972, 11, 483.

- [93] Wulff G, Sarhan A, Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for Resolution of Racemates, *Angewandte Chemie-International Edition* 1972, 11, 341.
- [94] Arshady R, Mosbach K, Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization, *Macromolecular Chemistry and Physics-Makromolekulare Chemie* 1981, 182, 687-692.
- [95] Dhal PK, Arnold FH, Template-Mediated Synthesis of Metal-Complexing Polymers for Molecular Recognition, *Journal of the American Chemical Society* 1991, 113, 7417-7418.
- [96] O'Shannessy DJ, Ekberg B, Mosbach K, Molecular Imprinting of Amino-Acid Derivatives at Low-Temperature (0-Degrees-C) Using Photolytic Homolysis of Azobisnitriles, *Analytical Biochemistry* 1989, 177, 144-149.
- [97] Haupt K, Fradet A, Molecularly imprinted polymers: concept and applications, *Actualite Chimique* 2001, 23-32.
- [98] Schweitz L, Spiegel P, Nilsson S, Approaches to molecular imprinting based selectivity in capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 2001, 22, 4053-4063.
- [99] Dittmann MM, Rozing GP, Ross G, Adam T, Unger KK, Advances in capillary electrochromatography, *Journal of Capillary Electrophoresis* 1997, 4, 201-212.
- [100] Schweitz L, Andersson LI, Nilsson S, Molecular imprint-based stationary phases for capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 1998, 817, 5-13.
- [101] Rebscher H, Pyell U, A Method for the Experimental-Determination of Contributions to Band Broadening in Electrochromatography with Packed Capillaries, *Chromatographia* 1994, 38, 737-743.
- [102] Heiger DN, Kaltenbach P, Sievert HJP, Diode-Array Detection in Capillary Electrophoresis, *Electrophoresis* 1994, 15, 1234-1247.

- [103] Hilder EF, Macka M, Haddad PR, Mixed-mode capillary electrochromatographic separation of anionic analytes, *Analytical Communications* 1999, 36, 299-303.
- [104] Schmitz, OJ, Indirekte Detektion in der CE, Persönliche Mitteilung, 2005
- [105] Yan C, Dadoo R, Zhao H, Zare RN, Rakestraw DJ, Capillary Electrochromatography - Analysis of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons, *Analytical Chemistry* 1995, 67, 2026-2029.
- [106] Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN, Haegele KD, Horning EC, Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometry - Corona Discharge Ion-Source for Use in Liquid Chromatograph Mass Spectrometer-Computer Analytical System, *Analytical Chemistry* 1975, 47, 2369-2373.
- [107] Caprioli RM, Fan T, Cottrell JS, Continuous-Flow Sample Probe for Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* 1986, 58, 2949-2954.
- [108] Yamashita M, Fenn JB, Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme, *Journal of Physical Chemistry* 1984, 88, 4451-4459.
- [109] Shamsi SA, Chiral capillary electrophoresis-mass spectrometry: Modes and applications, *Electrophoresis* 2002, 23, 4036-4051.
- [110] Svec F and Deyl Z, Capillary Electrochromatography, Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [111] Verheij ER, Tjaden UR, Niessen WMA, Vandergreef J, Pseudo-Electrochromatography Mass-Spectrometry - A New Alternative, *Journal of Chromatography* 1991, 554, 339-349.
- [112] Que AH, Mechref Y, Huang YP, Taraszka JA, Clemmer DE, Novotny MV, Coupling capillary electrochromatography with electrospray Fourier transform mass spectrometry for characterizing complex oligosaccharide pools, *Analytical Chemistry* 2003, 75, 1684-1690.

- [113] Que AH, Konse T, Baker AG, Novotny MV, Analysis of bile acids and their conjugates by capillary electrochromatography/electrospray ion trap mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2000, 72, 2703-2710.
- [114] Lord GA, Gordon DB, Myers P, King BW, Tapers and restrictors for capillary electrochromatography and capillary electrochromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1997, 768, 9-16.
- [115] Choudhary G, Horvath C, Banks JF, Capillary electrochromatography of biomolecules with on-line electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1998, 828, 469-480.
- [116] Gordon DB, Lord GA, Jones DS, Development of Packed Capillary Column Electrochromatography Mass-Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1994, 8, 544-548.
- [117] Takada Y, Sakairi M, Koizumi H, Atmospheric-Pressure Chemical-Ionization Interface for Capillary Electrophoresis Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* 1995, 67, 1474-1476.
- [118] Tanaka Y, Otsuka K, Terabe S, Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003, 30, 1889-1895.
- [119] Hugener M, Tinke AP, Niessen WMA, Tjaden UR, Vandergreef J, Pseudo-Electrochromatography Negative-Ion Electrospray Mass-Spectrometry of Aromatic Glucuronides and Food Colors, *Journal of Chromatography* 1993, 647, 375-385.
- [120] Kebarle P and Ho Y, in R.B.Cole (Editor), *Electrospray Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation & Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997, p. 3.
- [121] Dole M, Mack LL, Hines RL, Molecular Beams of Macroions, *Journal of Chemical Physics* 1968, 49, 2240-&.

- [122] Iribarne JV, Thomson BA, Evaporation of Small Ions from Charged Droplets, *Journal of Chemical Physics* 1976, 64, 2287-2294.
- [123] Smith RD, Barinaga CJ, Udseth HR, Improved Electrospray Ionization Interface for Capillary Zone Electrophoresis - Mass-Spectrometry, *Analytical Chemistry* 1988, 60, 1948-1952.
- [124] Warriner RN, Craze AS, Games DE, Lane SJ, Capillary electrochromatography mass spectrometry - A comparison of the sensitivity of nanospray and microspray ionization techniques, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1998, 12, 1143-1149.
- [125] Maloney TD, Colon LA, Comparison of column packing techniques for capillary electrochromatography, *Journal of Separation Science* 2002, 25, 1215-1225.
- [126] Rathore AS, Horvath C, Axial nonuniformities and flow in columns for capillary electrochromatography, *Analytical Chemistry* 1998, 70, 3069-3077.
- [127] Rebscher H, Pyell U, In-column versus on-column fluorescence detection in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 1996, 737, 171-180.
- [128] Mayer M, Rapp E, Marck C, Bruin GJM, Fritless capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 1999, 20, 43-49.
- [129] Behnke B, Johansson J, Zhang SG, Bayer E, Nilsson S, Deactivation of frits for use in capillary high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography with characterization by imaging with laser-induced fluorescence, *Journal of Chromatography A* 1998, 818, 257-259.
- [130] Zhang MQ, El Rassi Z, Capillary electrochromatography with novel stationary phases. I. Preparation and characterization of octadecyl-sulfonated silica, *Electrophoresis* 1998, 19, 2068-2072.
- [131] Dittmann MM, Rozing GP, Capillary electrochromatography: Investigation of the influence of mobile phase and stationary phase properties on electroosmotic

- velocity, retention, and selectivity, *Journal of Microcolumn Separations* 1997, 9, 399-408.
- [132] Smith N, Evans MB, Comparison of the electroosmotic flow profiles and selectivity of stationary phases used in capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A* 1999, 832, 41-54.
- [133] Desiderio C, Fanali S, Capillary electrochromatography and capillary electrochromatography-electrospray mass spectrometry for the separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Journal of Chromatography A* 2000, 895, 123-132.
- [134] Schweitz L, Andersson LI, Nilsson S, Molecularly imprinted CEC sorbents: investigations into polymer preparation and electrolyte composition, *Analyst* 2002, 127, 22-28.
- [135] Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL, Metabolism and disposition kinetics of nicotine, *Pharmacological Reviews* 2005, 57, 79-115.
- [136] Vindatiche I, Roche D, Callais F, Lequang NT, Labrousse F, Analytical improvements in Barlow reaction coupled to HPLC detection of nicotine and its metabolites, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2000, 23, 1423-1437.
- [137] Riah O, Dousset JC, Courriere P, Stigliani JL, Baziard-Mouysset G, Belahsen Y, Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main targets of cotinine toxicity, *Toxicology Letters* 1999, 109, 21-29.
- [138] Jarvis M, Tunstallpedoe H, Feyerabend C, Vesey C, Salloojee Y, Biochemical Markers of Smoke Absorption and Self Reported Exposure to Passive Smoking, *Journal of Epidemiology and Community Health* 1984, 38, 335-339.
- [139] Lopez CM, Sassone AH, Girault MER, Lenzken CS, Lepori ECV, Roses OE, Quantification of cotinine in plasma and urine by HPLC-UV detection, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2004, 27, 2371-2379.

- [140] Acosta MC, Buchhalter AR, Breland AB, Hamilton DCP, Eissenberg T, Urine cotinine as an index of smoking status in smokers during 96-hr abstinence: Comparison between gas chromatography/mass spectrometry and immunoassay test strips, *Nicotine & Tobacco Research* 2004, 6, 615-620.
- [141] Baggiani C, Giovannoli C, Anfossi L, Tozzi C, Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples, *Journal of Chromatography A* 2001, 938, 35-44.
- [142] Guo X, Kunyuan K, Feng X, Studies on the peroxydisulfate-aliphatic amine initiation system, *Scientia Sinica* 1987, 30, 987-906.
- [143] Schmitz O, Melchior D, Schuhmann W, Gäb S, Postcolumn derivatisation for selective laser-induced fluorescence detection in micellar electrokinetic chromatography of fatty acid hydroperoxides, *Journal of Chromatography A* 1998, 814, 261-265.
- [144] Möschter S, Doktorarbeit, Einsatz von chromatographischen Methoden mit selektiver Detektion zum Nachweis von Arzneimittelwirkstoffen in Abwasser und Oberflächenwasser, 2005, Bergische Universität Wuppertal
- [145] Nguyễn Minh Nguyệt Á, Doktorarbeit, Optimisation of the Analysis of Alkyl Polyglycosides by MEKC-PAD, 2004, Bergische Universität Wuppertal
- [146] Syage JA, Evans MD, Hanold KA, Photoionization mass spectrometry, *American Laboratory* 2000, 32, 24-+.
- [147] Robb DB, Covey TR, Bruins AP, Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2000, 72, 3653-3659.
- [148] Mol R, de Jong GJ, Somsen GW, On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using dopant-assisted atmospheric pressure photoionization: Setup and system performance, *Electrophoresis* 2005, 26, 146-154.

- [149] Kauppila TJ, Kostianen R, Bruins AP, Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004, 18, 808-815.
- [150] Nilsson SL, Andersson C, Sjöberg PJR, Bylund D, Petersson P, Jornten-Karlsson M, Markides KE, Phosphate buffers in capillary electrophoresis/mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003, 17, 2267-2272.
- [151] Constapel M, Schellenträger M, Schmitz OJ, Gäb S, Brockmann KJ, Giese R, Benter Th, Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005, 19, 326-336.
- [152] Boesl U, Special feature: Tutorial - Laser mass spectrometry for environmental and industrial chemical trace analysis, *Journal of Mass Spectrometry* 2000, 35, 289-304.
- [153] Lorenz M, Diplomarbeit, Untersuchungen zur resonanten Laserionisation bei Atmosphärendruck, 2005, Bergische Universität Wuppertal
- [154] Hjertén S, "Molecule Sieve" chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method, *Arch.Biochem.Biophys.Suppl.* 1962, 1, 147-151.