

**Neuartige analytische Mikrotechniken für die Biochemie und die
Umweltüberwachung**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Holger Niebauer

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2002

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hermann Bauer danke ich für das vielseitige Thema, seine wertvollen Anregungen, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und seine freundliche, stets engagierte Diskussionsbereitschaft. Ich danke ihm auch dafür, dass er mit Material und Geräten aus seinem persönlichen Eigentum die praktische Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Voelter gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferates.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Fachbereichs Technische Chemie der Georg-Simon-Ohm-Fachhochschule Nürnberg, insbesondere Frau Christine Münzel, Frau Ingrid Sprinzing und Frau Christine Spies, sowie der Abteilung für Physikalische Biochemie der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, insbesondere Frau Miriam Fecker, danke ich für die Unterstützung und das sehr gute Arbeitsklima. Frau Sabine Wunder danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen.

Der Staedtler- sowie der Friedrich-Ebert-Stiftung möchte ich meinen Dank für die bereitgestellte Unterstützung ausdrücken.

Ich versichere durch meine Unterschrift, dass ich die eingereichte Dissertation ohne andere als die in ihr erwähnte Hilfe verfasst habe. Ich versichere durch meine Unterschrift, dass ich bisher keinen Promotionsversuch unternommen habe. Die von mir eingereichte Dissertation war weder als solche noch in Teilen Gegenstand eines anderen Prüfverfahrens. Mit der Veröffentlichung meines Lebenslaufes (Bildungsgangs) als Bestandteil meiner Dissertation bin ich einverstanden. Ich verzichte darauf, die Öffentlichkeit bei meiner Doktorprüfung auszuschließen (§ 50 Abs. 7 UG).

Tübingen,

Key Words

- chemical micro systems
- capillary electrophoresis
- on line micro titration
- nano positioning
- simultaneous determination of cat- and anions

Kurzzusammenfassung

Die Entwicklung eines „echten“ on-line Mikro-Titrationssystems mit neuartigem Titrationsprinzip sowie eines Nano-Injektions- und Flusststeuerungssystems auf Basis ultrahochauflösender Linearaktoren für die Kapillarelektrophorese werden beschrieben. Bei dem auf einem Fließinjektionsanalyse-System basierenden on-line-Autotitrator werden alle herkömmlichen, teuren Dosierelemente durch ein simples computergesteuertes Mikrodreiwegeventil und eine Mikrodosierpumpe ersetzt, wodurch sich die Kosten auf ca. 10 % der heute verfügbaren Autotitratoren senken lassen. Das traditionelle Prinzip der schrittweisen Zugabe von Titrant zu einer vorgelegten Menge an Probe wird in ein einfaches alternatives Ansteuern von Proben- und Reagenzstrom abgeändert. Die vollständige Übertragbarkeit von DIN-Methoden auf das neuartige Mikro-Titrationssystem wird aufgezeigt.

Die Flusststeuerung für die Kapillarelektrophorese ermöglicht es, Probenvolumina im (Sub-)Nanoliterbereich reproduzierbar zu injizieren und an jede beliebige Stelle der Kapillare mit Picoliterauflösung zu positionieren. Mit diesem Prinzip wird die Simultanbestimmung auch der „schnellsten“ Kationen und Anionen in nur einem Lauf innerhalb weniger Minuten realisierbar. Die Flexibilität ist im Vergleich zu herkömmlichen Systemen deutlich größer und dürfte neue Aspekte in der Ionenanalytik eröffnen.

Abstract

A "real" on line micro titration system based on a new titration principle as well as a nano injection and flow control system for capillary electrophoresis based on ultra-high resolution linear actuators are developed. The new on line auto titrator is realized with a modified flow injection analysis system. All conventional and expensive techniques for dosing are substituted by a simple computer controlled micro three way valve and a micro pump. The costs compared to commercially available auto titrators are decreased by approximately 90 %. The classic titration principle of step by step addition of titrant to an exactly known amount of sample is replaced by a simple switching frequency in between sample and reagent stream. Methods according to DIN can be easily transferred to the new micro titration system.

The new flow control system for capillary electrophoresis allows to inject sample amounts of nano and pico liters only with high accuracy. Furthermore it is possible to correctly position the sample plug within the capillary with a resolution in the range of few pico liters. With this technique the simultaneous determination of even the "fastest" cations and anions within one run and only a few minutes can be realized. The flexibility in comparison to conventional systems is much higher. This nano flow control system might open new aspects in ion analysis.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	6
2.1. Mischwasserproblematik	6
2.2. Titrationstechniken	6
2.2.1. Titrationsverfahren	7
2.2.2. FIA-System im Vergleich zu einem Titrationssystem	11
2.2.3. Pumpentechnik	13
2.2.4. Bedeutung und Grundlagen der Dispersion	16
2.2.5. Wasserhärte	21
2.2.6. Säure- und Basekapazität	23
2.2.7. Gegenüberstellung neuartiges System – kommerzielles System	26
2.3. Kapillarelektrophorese	30
2.3.1. Entwicklung elektrophoretischer Trennmethode n	30
2.3.2. Technische Voraussetzungen	30
2.3.3. Theoretische Grundlagen der Elektrophorese	32
2.3.4. Trenntechniken der Kapillarelektrophorese	36
2.3.5. Spezielle Anwendungen der Kapillarelektrophorese	38
2.3.6. Simultantrennungen von Kat- und Anionen in der CE	41
2.4. Injektion in der Kapillarelektrophorese	43
2.4.1. Injektionsmethoden	43
2.4.2. Einfluss der Probenaufgabe auf die Effizienz	47
2.4.3. Probleme der Probenaufgabe im Nano- und Picoliterbereich	49
2.5. Anforderungsprofil für das neue Injektionssystem	53
2.6. Nanopositionierung	54
2.6.1. Grundlagen der Piezoelektrizität	56
2.6.2. Aufbau und Vorteile von Piezo-Nanopositioniersystemen	58
2.6.3. Ungenauigkeiten unregelter Piezo-Aktoren	60
2.6.4. Anwendungsbeispiele der Nanoliterdosierung in der Chemie	61
3. Experimenteller Teil	63
3.1. Titrationssystem	63
3.1.1. Apparatur und Chemikalien	63
3.1.2. Dispersionsverhalten des Systems	72
3.1.3. Erprobung verschiedener Pumpentypen	78
3.1.4. Titrationsen mit Linearisierung der Titrationskurven	85
3.1.5. Titrationsen mit kontinuierlichen Titrationskurven	89

3.1.6.	Optimierung der Parameter des Systems	90
3.1.7.	Systemvalidierung und Applikationsbeispiele	93
3.2.	Kapillarelektrophorese-System mit Flusssteuerung	112
3.2.1.	Apparatur und Chemikalien	112
3.2.2.	Vorbetrachtungen zum CE-System	119
3.2.3.	Entscheidungsgrundlagen für die verwendeten Translatoren	123
3.2.4.	Charakterisierung der verwendeten Translatoren	123
3.2.5.	Kapillarelektrophorese	145
4.	Ergebnisse und Diskussion	156
4.1.	Titrationstechnik	156
4.2.	Flusssteuerung in der Kapillarelektrophorese	159
5.	Zusammenfassung	165
6.	Literaturverzeichnis	167
7.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	175
8.	Lebenslauf	176

Verwendete Abkürzungen

CE	Kapillarelektrophorese
CFA	Continuous Flow Analysis
CGE	Kapillargelelektrophorese
CHES	2-[N-Cyclohexylamino]ethansulfonsäure
CIEF	Isoelektrische Fokussierung in Kapillaren
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAC	Digital-Analog-Wandler
DC	Gleichspannung
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FIA	Flow Injection Analysis, Fließinjektionsanalyse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HV	Hochspannung
IC	Ionenchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ITP	Isotachophorese
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPSO	3-Morpholino-2-hydroxypropansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	Piezoelektrischer Effekt
PEEK	Polyetheretherketon
PI	Firma Physik Instrumente, Karlsruhe
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
PZT	Blei-Zirkonat-Titanat-Keramiken
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAPSO	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-amino-2-hydroxypropansulfonsäure
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
UV	ultraviolett
VB	Visual Basic
WHG	Wasserhaushaltsgesetz

1. Einleitung

In fast allen Bereichen der Forschung und Entwicklung und v.a. im Bereich der Analytischen (Bio-)Chemie zeichnet sich ein fortwährender und sich rasch entwickelnder Trend zur Miniaturisierung ab [1]. Ausgangspunkt ist die Forderung nach immer schnelleren Analysenmethoden, die zudem aufgrund des enormen Kostendrucks bei immer steigendem Analysenaufkommen sehr preisgünstig sein müssen und wann immer möglich parallel bzw. simultan ablaufende Bestimmungen ermöglichen sollen. Bei der Entwicklung neuer Medikamente werden beispielsweise bei einer durchschnittlichen Entwicklungszeit von ca. 10 Jahren bisher große Mengen an Reagenzien verbraucht, die mit herkömmlichen Methoden leicht Kosten von einigen 100 Millionen Euro verursachen [2]. Aufgrund dessen sind sogenannte Mikrotechniken entstanden, die eine Vielzahl der Anforderungen erfüllen. So benötigen sie beispielsweise nur noch einen Bruchteil an Reagenzien im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden.

Mit der Einsparung von Reagenzien geht aber auch die Verminderung der Probenmenge einher. Vielfach steht diese nicht in ausreichender Menge zur Verfügung bzw. muss kostenintensiv bezogen werden. Ein einfaches Beispiel soll die Vorteile der Probenverminderung verdeutlichen: in einem Projekt der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit dem HEJ Research Institute of Chemistry, Karachi, Pakistan, sollte Skorpiongift chromatographisch aufgetrennt werden. Für die herkömmlichen Säulen mit 4 mm Innendurchmesser hätten 100.000 (!) Skorpione zur Erreichung der benötigten Menge gemolken werden müssen. Einen Ausweg bot die Verwendung von Mikrokapillarsäulen (ID: 0,4 mm) wodurch die Anzahl um den Faktor 100 auf nur noch 1000 vermindert werden konnte.

Besonders auch durch das Aufkommen des High-Throughput-Screenings (HTS) sind Analysenmethoden gefragt, die kleinste Probenmengen handhaben können [3].

Weitere Probleme wie z.B. die Wärmeabfuhr, für die oftmals bei den Makrotechniken keine zufriedenstellende Lösung existiert, prädestinieren die Mikrotechniken geradezu, da dies kein Problem darstellt. Hinzu kommt eine enorme Zeitersparnis aufgrund der Schnelligkeit der Analysen. So ermöglicht beispielsweise die Kapillarelektrophorese auf Mikrochips bereits heute vollständige Analysen innerhalb weniger Sekunden [4].

Trotz der vielen Vorteile der Mikrotechnik wirft sie auch eine Reihe neuer Fragestellungen und Probleme auf. Vor allem die Dosierung und das Handling der kleinen Volumina stellt eine große Herausforderung dar und ist bisher noch nicht zufriedenstellend gelöst. Reproduzierbarkeiten der Flusssteuerung bleiben daher auch vielfach bei Veröffentlichungen unerwähnt. Obwohl diese absolut betrachtet deutlich besser wird, werden die aussagekräftigeren Variationskoeffizienten aufgrund der kleinen Bezugsgrößen erheblich größer. Traditionelle Systeme der Injektionstechnik und Flusssteuerung sind dabei teilweise ausgereizt und können nicht entscheidend weiterentwickelt und verbessert werden.

Kolbenhubpipetten nach dem Luftpolsterprinzip stoßen z.B. unterhalb von 0,5 µL aufgrund der größer werdenden relativen Bedeutung der Adhäsions- und Kapillarkräfte an ihre Grenzen. Dementsprechend liegen selbst bei den besten derartigen Dosierelementen die Fehlergrenzen bei knapp 20 % für 0,2 µL [5]. Darunter sind keine Werte definiert! Selbst das Erreichen dieser Werte erfordert ein Höchstmaß an Pippettiererfahrung und Geschick. Bei hochviskosen oder kalten Lösungen liegt der Fehler schnell bei 50 % und mehr [5]. Für die neuen Herausforderungen der Mikro- und Nanotechnik sind neue Methoden zu entwickeln, die die Handhabung immer kleinerer Volumenmengen sicher bewerkstelligen können. Die Marktprognosen für das Segment des Liquid Handlings sagen ein jährliches Wachstum von 15 % voraus (Ergebnisse des Marktforschungsunternehmens Strategic Directions International). Damit wäre im Jahr 2003 ein weltweiter Umsatz von 2,1 Milliarden US-Dollar in diesem Marktsegment zu erwarten [6].

In vielen Bereichen der Produktion hochwertiger Güter, aber auch bei Überwachungsaufgaben, wie z.B. in der Umwelt, wird neben der Kosteneffektivität im zunehmenden Maße auch der Effizienz der Methoden Aufmerksamkeit gewidmet. Hierzu werden bevorzugt automatisierbare Verfahren entwickelt, da diese neben der Arbeiterleichterung eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit liefern.

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist aufgrund der um Größenordnungen höheren Trennleistung (Trennstufenzahlen bis zu 10^6 m^{-1}) eine wertvolle Ergänzung für die etablierten chromatographischen Methoden. Sie zeichnet sich neben der hohen Effizienz durch Schnelligkeit, niedrige absolute Nachweisgrenzen und das Entfallen von zeitintensiven Probenvorbereitungstechniken aus [7–9]. Durch die Vielzahl von kapillarelektrophoretischen Trennmethoden kann diese Technik für die Trennung und Detektion nahezu aller Substanzklassen eingesetzt werden. Bis zu 26 Metallionen in einem Lauf [10], anorganische Anionen [11], Enantiomere [12], Peptide, Proteine, Oligonukleotide [13], DNA [14], Agrochemikalien [15], Kohlenhydrate [16], Arzneimittel [17], usw. können kapillarelektrophoretisch analysiert werden. Die geringen Probenvolumina im Subnanoliterbereich ermöglichen sogar die Untersuchung von Substanzen aus Picoliterumgebungen wie Cytoplasma und einzelner Nervenzellen [18].

Bei der Bestimmung von anorganischen Kationen und Anionen ist die Kapillarelektrophorese der Ionenchromatographie (IC), welche hauptsächlich in der Routineanalytik angewandt wird, in Punkten wie Trenneffizienz und Analysendauer weit überlegen [19]. Seit kurzer Zeit wird sogar von der simultanen Bestimmung von negativ und positiv geladenen Ionen in der CE berichtet. Wegen der entgegengesetzten Richtung der Wanderung dieser Ladungsträger ist eine Simultanbestimmung mit einem gewöhnlichen CE-System (eine Kapillare, eine Injektionsseite, ein Detektor) nur schwer durchführbar. Aus diesem Grund sind die veröffentlichten Techniken entweder mit komplizierten Aufbauten, die

nur schwer in kommerziell erhältliche Geräte integriert werden können, oder mit langen Analysenzeiten verbunden. Die gleichzeitige Analyse von Kationen und Anionen in nur einem Lauf würde eine deutliche Steigerung der Flexibilität bedeuten und dürfte zu einer zusätzlichen Erweiterung der Anwendungen der Kapillarelektrophorese führen.

Viele technische Probleme der Kapillartrenntechniken, wie z.B. die Probeninjektion, die -positionierung und die Flusssteuerung sind noch nicht zufriedenstellend gelöst. Das Hauptproblem der Probeninjektion ist, dass Volumina im unteren Nanoliterbereich reproduzierbar aufgegeben werden müssen. Variationskoeffizienten unter 1 % sind dabei für die breite Akzeptanz einer Methode erforderlich. Alle „klassischen“ Methoden, wie Elektromigration, Drucksteuerung oder Siphontechnik versagen, wenn Proben unterschiedlicher Dichte, Viskosität oder Ionenstärke zu untersuchen sind [20].

Eine neuartige, variable Flusssteuerung für die Kapillarelektrophorese, die sowohl die Aufgabe der Probe im Subnanoliterbereich als auch deren exakte Positionierung in der Kapillare ermöglicht, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit. Stellglieder auf der Basis des piezoelektrischen Effekts oder hochauflösende motorgetriebene Aktoren sollen als Grundlage einer automatisierbaren Probenaufgabe für diese hochauflösende Trennmethode eingesetzt werden. Schließlich soll überprüft werden, ob somit die Trennung und Detektion von Kationen und Anionen in nur einem Lauf gelingt und damit drastisch vereinfacht werden kann.

Aus theoretischen Überlegungen unter Einbeziehung der Kapillargeometrie ergeben sich auflösende Volumina von 20 pL für Kapillaren mit 50 μm Innendurchmesser und 44 pL für 75 μm -Kapillaren. Grundlage ist die Vorgabe in einem Kapillarstück mit einer Länge von 100 mm 100 Substanzen mit je 100 Messpunkten erfassen zu können, wobei letztendlich 100 Messpunkte $\cdot\text{mm}^{-1}$ resultieren. Die zu entwickelnde Flusssteuerung muss in der Lage sein die Volumina mit vorgegebener Genauigkeit auflösen zu können. Ein tolerierbarer Fehler sollte dabei unter 1 Prozent liegen. Zu berücksichtigen sind Faktoren wie das Auflösungsvermögen der elektronischen Steuerung und damit verbunden der (minimal mögliche) Stellweg des Aktors, sowie die Kolbenfläche des Elements, welches die lineare Auslenkung des Stellgliedes in ein Volumen umsetzt.

Wasser nimmt als wichtigstes Lebens- und Gebrauchsmittel eine zentrale Bedeutung für die Gesellschaft ein und stellt ein besonders schützenswertes Gut dar. Im Bereich der Wasserwirtschaft kommt daher den zuständigen Verwaltungsorganen eine besondere Verantwortung zu. Die Möglichkeit Wasser auf wissenschaftlicher Grundlage zu beurteilen ist seit dem letzten Jahrhundert in den Industrienationen verbreitet. In weiten Teilen der Erde spielt der Gewässerschutz hingegen noch immer eine untergeordnete bzw. gar keine Rolle. Hierzulande sind zahlreiche Gesetze und Regelungen, wie die Trinkwasserverordnung (TrinkwV) [21, 22], das Wasserhaushaltsgesetz (WHG) [23, 24], die

EG-Trinkwasserrichtlinie [25], usw. in Betracht zu ziehen. Aufgrund der unterschiedlichen Anforderungen an die Wasserqualität kommt es zu differenzierten Vorgehens- und Betrachtungsweisen, so dass als Folge keine einheitliche Regelung für alle Wasserarten verfügbar ist. Neben staatlichen Stellen, wie Wasserwirtschaftsämtern, müssen Wasseruntersuchungen auch von industriellen, gewerblichen und teilweise privaten Institutionen durchgeführt werden. Die Analytik des Wassers hat einen hohen Stellenwert und gibt Anlass zu einer ständigen Verbesserung und Weiterentwicklung der zugrundeliegenden Methoden.

Die Gesetze und Verordnungen entsprechen nicht immer dem Stand der Technik, obwohl traditionelle Untersuchungsmethoden den Anforderungen immer weniger gerecht werden. Jede Messung in einem chemischen Laboratorium basiert auf folgenden Operationen: Probennahme und -vorbereitung, Messung (qualitativ bzw. quantitativ) und Auswertung. Die beiden letzten Punkte sind in der Regel automatisiert und es stehen eine Vielzahl hochentwickelter Geräte (Detektoren, Computer, etc.) zur Verfügung, wohingegen Probennahme und Probenvorbereitung in den meisten Laboratorien noch manuell durchgeführt werden [26].

Doch gerade die Probennahme ist von grundlegender Bedeutung, da selbst bei sorgfältigstem Arbeiten das Ergebnis immer nur Rückschlüsse auf die Probeninformationen gibt. Diese können aber nur mit der Gesamtrealität übereinstimmen, wenn die Probennahme sachgerecht durchgeführt wird. Der Hauptnachteil diskontinuierlicher Methoden (batch-Prozesse) besteht in der häufig langen Zeitspanne zwischen Probennahme und anschließender Bestimmung, da sich in diesem Zeitraum oft auch die Zusammensetzung der Probe, z.B. durch Aufnahme von Kohlendioxid aus der Luft, verändert [27]. Des Weiteren bringen sie zwangsläufig hohe Personalkosten mit sich.

Diese Probleme lassen sich durch kontinuierlich arbeitende on-line-Analysatoren lösen, welche wesentlich einfacher zu automatisieren und miniaturisieren sind. Die Messung einer repräsentativen Probe erfolgt vor Ort in einem geschlossenen System, wodurch die oben genannten Fehlerquellen vermieden werden können. Bekannt auf diesem Gebiet der schnellen Analysenverfahren sind die Flow Injection Analysis (FIA) bzw. die Continuous Flow Analysis (CFA) [28]. Charakteristische Eigenschaften dieser Methoden sind hoher Probendurchsatz bei geringem Verbrauch von Probe und Reagenzien. FIA-Systeme finden nicht nur in der Umweltanalytik, sondern auch in der industriellen Analytik Anwendung. Einsatzschwerpunkte sind vor allem die pharmazeutische Analytik und die Prozesskontrolle, da hier eine große Menge an Proben zu analysieren sind. Daneben ist eine kontinuierliche Erfassung und Dokumentation im Rahmen der Qualitäts- und Umweltkontrolle von besonderem Interesse. Aus diesem Grund gewinnen Analysatoren, die eine on-line-Bestimmung über längere Zeiträume ermöglichen, immer mehr an Bedeutung [29]. Gegebenenfalls kann rückkoppelnd steuernd oder regelnd in den Prozess eingegriffen wer-

den. Eine Automatisierung kann aber auch bei geringeren Probenzahlen aufgrund der Anforderungen an die Reproduzierbarkeit notwendig sein, um die Spannweite zufälliger Fehler zu verringern bzw. auch systematische Fehlerquellen wie Kontamination auszuschließen [30].

Titrationen, deren Prinzip bereits seit dem 17. Jahrhundert bekannt ist, stellen eine der ältesten Analysetechniken dar. Obwohl die Methoden zur Bestimmung des Äquivalenzpunktes seitdem deutlich verbessert wurden, hat sich der grundlegende Gedanke nicht verändert: in einer chemischen Reaktion, die stöchiometrisch in kurzer Zeit abläuft, wird ein titrierstabiles Reagenz bekannter Konzentration, das genau dosiert werden kann, mit dem Analyten umgesetzt. Das Ende der Stoffumsetzung wird mit einem geeigneten Indikator/Sensor indiziert [31]. Es handelt sich um ein schnelles und preisgünstiges Analyseverfahren, das genaue Ergebnisse mit hoher Präzision liefert. Obwohl Titrationstechniken teilweise als „veraltet“ angesehen werden, finden sie noch heute vielfach Einsatz in Analysenlaboratorien, wie z.B. in der Eingangskontrolle chemischer und pharmazeutischer Betriebe. Allerdings erfordern Titrationsen einen hohen personellen Aufwand, wenn das System nicht vollautomatisch arbeitet.

Trotz vieler Vorteile der kontinuierlichen on-line-Analysatoren finden diese wahrscheinlich aus traditionellen Gründen im Moment nur in wenigen Laboratorien Anwendung. Die Gewohnheit in batch-Prozessen zu denken, welche eine homogene Mischung als Grundlage voraussetzen, um reproduzierbare Messungen durchzuführen, ist noch weit verbreitet [26]. Die schwerwiegenden Nachteile konventioneller Autotitratoren, wie z.B. die hohen Anschaffungskosten und die personalintensive Betriebsweise, sollten im Falle eines echten on-line-Titrators, der aus einfachsten Bauelementen besteht, nicht auftreten. Einige wenige Firmen bieten Autotitratoren mit automatisierter Probennahme an, wobei die Akzeptanz jedoch äußerst gering ist, wofür neben den sehr hohen Kosten von bis über 40.000 Euro vor allem die technischen Probleme, wie beispielsweise die Langzeitstabilität, usw., verantwortlich sind.

Weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation ist es daher aufzuzeigen, dass die Erkenntnisse der Mikrodosierung auch in diesem Bereich erfolgreich angewandt werden können. Mit Hilfe eines einfachen, computergesteuerten 3-Wege-Ventils sollte eine kontinuierliche, besonders preisgünstige, reproduzierbare und schnelle on-line-Titration realisiert werden können. Der Wegfall technisch aufwendiger Manipulationen, die Realisierung eines vollständig selbstreinigenden Systems, sowie der Einsatz von unkomplizierten Auswerteverfahren, sollen eine zunehmende Arbeitserleichterung garantieren. Die Einsatzgebiete sollen im Bereich der Umweltüberwachung und Biochemie liegen.

2. Grundlagen

2.1. Mischwasserproblematik

Die Mischung von unterschiedlichen Wässern (Rohwasser) im Rohrnetz einer Wasserversorgung wird als Mischwasser bezeichnet. Daneben wird bei der Abwasserbeseitigung als Mischwasser das Abwasser der Mischkanalisation einschließlich evtl. Fremdwassers bezeichnet [32]. Viele Wasserversorgungsunternehmen haben sich zur Sicherstellung der Trinkwasserversorgung zu überregionalen Verbundsystemen zusammengeschlossen und sind auf die Lieferung von Mischwässern aus unterschiedlichsten Wasserqualitäten übergegangen, da der Bedarf über die Jahre ständig gestiegen ist. Dadurch sind jedoch neue Probleme aufgetreten, die neben der ohnehin schon intensiven Wasseranalytik einen neuen Bedarf für Untersuchungen des wichtigsten Lebens- und Gebrauchsmittel nach sich ziehen. Um Mischwasser als Trinkwasser einsetzen zu können, muss es aufwendig aufbereitet werden. Ein wichtiges Problem betrifft dabei die Calcitsättigung. Zwei Wässer, die sich im Zustand der Calcitsättigung befinden, ergeben im Fall einer Mischung Wässer, die nicht mehr auf der sogenannten Calcitsättigungs-Kurve liegen [33]. Solche Mischwässer enthalten überschüssiges Kohlendioxid und erfordern eine Nachentsäuerung. Mischwässer sollten daher nicht unkontrolliert im Verteilungssystem entstehen. Werden diese Maßnahmen nicht getroffen, kommt es zu einem Angriff der Rohrleitungssysteme, selbst wenn diese jahrelang mit dem Rohwasser im Gleichgewicht standen. Vor allem kleinere Wasserversorger und Endverbraucher sind durch die relativ hohen Kosten der Überwachung überfordert. Ein weiteres Problem tritt auf, wenn sich eisenhaltige und sauerstoffhaltige Wässer mischen. Durch Eisen(II) und Sauerstoff läuft im Wasser ein Oxidationsprozess mit der damit verbundenen Verfärbung ab. Aus dem Oxidationsfortschritt können andererseits Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Mischung gezogen werden [33].

2.2. Titrationstechniken

Obwohl die Titration eine der ältesten analytischen Methoden darstellt, wird sie auch heute noch unverändert für eine Vielzahl von Reaktionsklassen, wie z.B. Säure-Base-, Redox-, komplexometrische oder Fällungsreaktionen, eingesetzt [28]. Der Vorteil einer Titration besteht in ihrer einfachen Durchführung und dem vergleichsweise geringen apparativen Aufwand. Sie eignet sich besonders zur Konzentrationsbestimmung eines Stoffes, da nur die chemische Umsetzung des gesuchten Analyten verfolgt bzw. der Äquivalenzpunkt bestimmt werden muss. Im Vergleich zu Methoden der Instrumentellen Analytik können somit auch Spezies bestimmt werden, die in Gleichgewichten vorliegen und sich somit einer einfachen Direktmessung entziehen.

2.2.1. Titrationsverfahren

Zur Bestimmung und Indizierung kann grundsätzlich jede physikalische Größe dienen, die in eindeutiger Beziehung zur Konzentration der Probelösung bzw. der Konzentrationsänderung am Titrationsendpunkt steht. Der besondere Vorteil der instrumentellen Methoden liegt darin, dass sich der gesamte Titrationsverlauf verfolgen lässt, während Farbindikatoren nur den Endpunkt anzeigen. Die Instrumentenanalyse erweist sich den klassischen Methoden in vielerlei Hinsicht – z.B. Vielseitigkeit, Selektivität, gute Reproduzierbarkeit, hohe Empfindlichkeit und rasche Ausführung von Serienbestimmungen – als überlegen [31]. Es stehen eine große Anzahl an leicht automatisierbaren Verfahren, die auf elektrochemischen, optischen oder thermischen Methoden beruhen, zur Verfügung. Abbildung 1 liefert einen Überblick der wichtigsten elektrochemischen Analysemethoden, die auch als Indikationsmethoden für automatisierbare Titrationsysteme eingesetzt werden können [34].

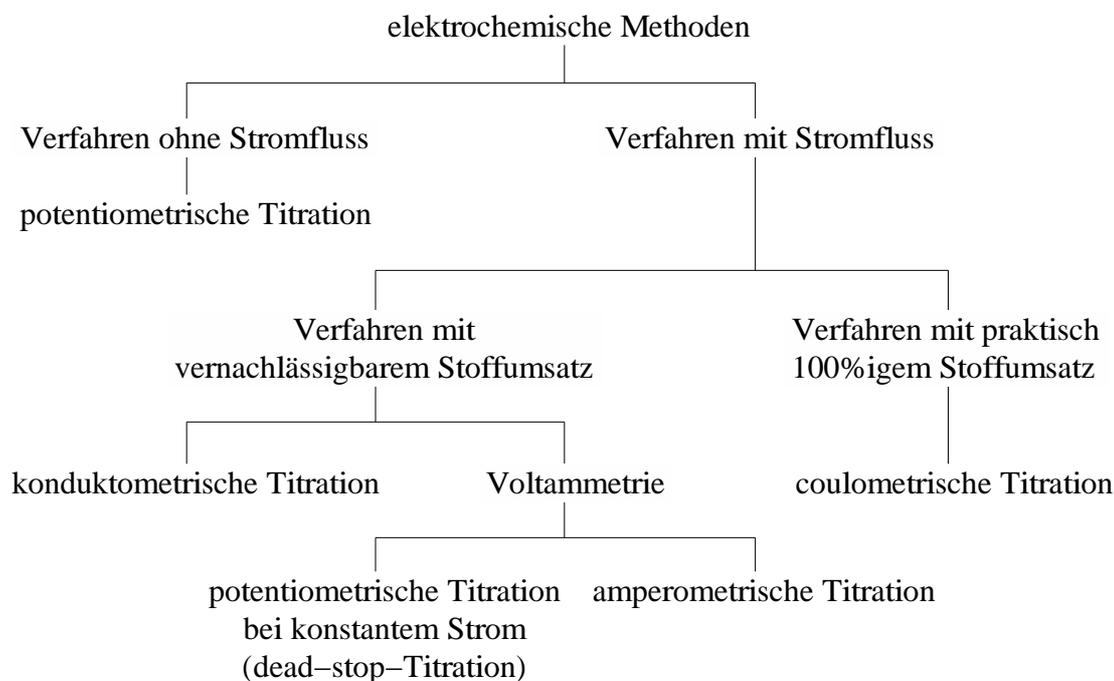


Abb. 1: elektrochemische Indikationsmethoden für Titrationsverfahren [34].

Als elektrochemische Indikationsmethoden eignen sich insbesondere die Potentiometrie und Konduktometrie.

2.2.1.1. Titrationsverfahren mit konduktometrischer Indikation

Die Konduktometrie beruht auf der Mobilität geladener Teilchen im elektrischen Feld. Eine konduktometrische Titration setzt eine signifikante Änderung der Leitfähigkeit des

Gesamtsystems im Verlauf der Titration voraus. Die Bestimmung des Äquivalenzpunktes erfolgt über lineare Extrapolation der experimentell ermittelten Titrationsfunktionen. Diese besteht aus der sogenannten Reaktionsgerade vor und der Überschussgerade nach dem Äquivalenzpunkt [35].

2.2.1.2. Titrations mit potentiometrischer Indikation

Die Potentiometrie beruht auf der stromlosen Messung von Zellspannungen. Während einer potentiometrischen Titration werden Potentialdifferenzen zwischen einer Indikator- und einer Vergleichselektrode gemessen. Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten der apparativen Durchführung potentiometrischer Titrations. Das Elektrodenpotential wird analog gegen den Reagenzverbrauch aufgetragen und graphisch ausgewertet, oder das Reagenz wird in diskreten Volumenschritten zugegeben. Die entsprechenden Potentiale werden dann digital aufgenommen und rechnerisch ausgewertet.

Die Bestimmung des pH-Wertes mittels einer Glaselektrode zählt zu den bekanntesten Vertretern potentiometrischer Messungen. Durch Ionenaustauschprozesse an der dünnwandigen Glasmembran stellt sich ein gegen eine Ableitelektrode messbares Potential ein, welches in einer linearen Beziehung zum Logarithmus der Aktivität der H_3O^+ -Ionen steht. Neben der pH-Wert-Messung können mit potentiometrischen Methoden auch Redox- und (ionen-)selektive Systeme erfasst werden [34].

Auswertemethoden für Titrations mit potentiometrischer Indikation

Zur Auswertung potentiometrischer Titrations stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Bei einigen Auswerteverfahren werden alle Messpunkte berücksichtigt, wobei damit eventuell am Äquivalenzpunkt auftretende Fehler weitgehend unberücksichtigt bleiben. Für andere Auswerteverfahren werden lediglich wenige Messpunkte in der Nähe des Endpunktes berücksichtigt. Es handelt sich in beiden Fällen um Näherungsmethoden, doch ist der notwendige Rechenaufwand außerordentlich gering. Prinzipiell ist es jedoch keineswegs gleichgültig, ob die zur Auswertung anstehenden Messwerte unmittelbar in der Nähe des Äquivalenzpunktes liegen, oder ob sie aus dem Außenteil der Titrationskurve stammen.

Das einfachste, allerdings oft auch ungenaueste, Verfahren geht auf Hahn und Weiler zurück [34]. Als Näherung wird angenommen, dass die maximale Potentialänderung praktisch mit dem Äquivalenzpunkt zusammenfällt. Auf diese Annahme greifen auch andere Näherungen, wie z.B. die von Tubbs, Richter, Keller und Fortuin, zurück [36]. Der Wendepunkt der Titrationskurve ist mathematisch als Extremwert der ersten Ableitung bzw. als Nullstelle der zweiten Ableitung gegeben. Voraussetzung für diese Methoden ist ein weitgehend symmetrischer Verlauf der Titrationskurve. Problematisch ist bei dieser Aus-

wertungsmethode jedoch, dass lediglich Messwerte in unmittelbarer Nähe des Äquivalenzpunktes in die Auswertung einbezogen werden [37].

Auswertemethode nach Gran

Im Jahr 1952 publizierte Gran eine graphische Methode zur Bestimmung des Endpunktes potentiometrischer Titrations, die auf einer Linearisierung der Titrationskurve beruht. Allerdings ist dieses Verfahren in seiner ursprünglichen Form mit Fehlern behaftet. Alle multiplikativ in den Messwert eingehenden Faktoren verfälschen die Linearität. Multiplikativ eingehende Faktoren sind Verstärkungsfaktoren, Aktivitätskoeffizienten und Elektrodensteilheit. Es scheint in manchen Fällen daher sinnvoll die Gran-Funktion nicht als Gerade, sondern als Polynom 2. Ordnung zu approximieren [37].

Die Methode nach Gran geht davon aus, dass der Titrationsverlauf bei logarithmischem Auftragen der ermittelten Elektroden-Spannung gegen das Volumen des Titranten einen linearen Verlauf zeigt. Hierfür wird die Nernst-Gleichung (Glg. 1) unter Berücksichtigung der Volumenzunahme in eine geeignete Form gebracht, d.h. entlogarithmiert (Glg. 2) [37].

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln(a_i) \quad (1)$$

$$y = \frac{V + V_0}{V_0} \cdot 10^{\frac{\Delta E}{s}} \quad (2)$$

E: Elektrodenpotential,

E_0 : Normalpotential ($a_i = 1$),

R: Gaskonstante,

T: absolute Temperatur [K],

z: Zahl der ausgetauschten Elektronen (Äquivalentzahl),

F: Faraday-Konstante,

a_i : Ionenaktivität der Lösung,

y: Funktionswert,

V: zugefügtes Volumen der Maßlösung,

V_0 : ursprüngliches Titrationsvolumen,

ΔE : Potentialdifferenz,

s: empirische Konstante: $2,303 \cdot R \cdot T \cdot z^{-1} \cdot F^{-1}$.

Ein messtechnischer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die dem Äquivalenzpunkt entsprechende Kettenspannung bei einer Titration nicht direkt gemessen werden muss. Auswertetechnisch ist die Erkennung des Endpunktes einer Titration durch Extrapolation sicherer. Obwohl prinzipiell für die Extrapolation nur wenige Werte notwendig sind, so wird doch die statistische Sicherheit durch jeden zusätzlichen Messpunkt erhöht [29, 37].

Der große Vorteil des Gran-Verfahrens liegt darin, dass auch Titrationsen sehr schwacher Säuren ausgewertet werden können, was bei anderen Verfahren nicht möglich ist [37].

2.2.1.3. Weitere elektrochemische Methoden geringerer Bedeutung

Neben den automatisierten Systemen auf der Basis konduktometrischer oder potentiometrischer Erfassung des Titrationsverlaufs wären auch coulometrische, amperometrische, oder auch voltametrische Methoden denkbar. Ihre Verwirklichung ist jedoch kein Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

Bei coulometrischen Methoden wird ein vollständiger elektrochemischer Umsatz erzwungen [28]. Häufig wird auch auf diese Weise zuerst ein Reagenz erzeugt, das erst in zweiter Linie die eigentliche Reaktion eingeht [29]. Coulometrische Reaktionen haben ihre Berechtigung in Fällen, in denen relativ instabile Titranten, wie Brom oder Iod verwendet werden müssen. Mit Hilfe von coulometrisch generiertem Iod lassen sich zum Beispiel Arsen, Thiosulfat oder Antimon titrieren.

Die Voltametrie und Amperometrie leiten sich von der Polarographie her und stellen zeit- bzw. konzentrationsabhängige Querschnitte der polarographischen Strom-Spannungskurve dar [31]. Amperometrische Bestimmungen werden bei vorgegebenem Potential durchgeführt, wobei der Stromfluss die eigentliche Messgröße darstellt. Diese Art der Titration ist für zahlreiche Redox- und Fällungsreaktionen geeignet [28, 34]. Bei der Voltametrie wird der Strom konstant gehalten und die Spannungsänderung gemessen.

2.2.1.4. Titrationsen mit photometrischer Indikation

Die photometrische Indikation des Titrationsendpunktes ist wesentlich genauer als visuelles Ablesen, weil die Daten mehrerer Messungen zur Bestimmung zusammengefasst werden, und auch im ultravioletten Bereich möglich. Zudem wirkt sich das Vorhandensein anderer absorbierender Verbindungen selten störend aus, da nur die Änderung der Extinktion bestimmt wird. Voraussetzung ist, dass der Analyt, das Reagens oder das Titrationsprodukt Strahlung absorbieren. Alternativ kann auch ein geeigneter absorbierender Indikator einen Wechsel der Extinktion, der zur Bestimmung der Äquivalenz nötig ist, anzeigen. Es wird dazu die Absorption beider Formen eines zweifarbigen Indikators als Funktion der Wellenlänge bestimmt und das Photometer auf einen der erhaltenen Werte maximaler Absorption eingestellt. Bei der Titration wird am Äquivalenzpunkt ein steiler Anstieg bzw. Abfall der Absorption erhalten. Die Titrationskurven fallen je nach Gleichgewichtslage und Randbedingungen sehr unterschiedlich aus [31]. Der photometrische Endpunkt wurde mit großem Erfolg zu Titrationsen mit EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und anderen komplexierenden Agenzien herangezogen [38].

2.2.2. Wirkungsweise eines FIA-Systems im Vergleich zu einem Titrationssystem

Mit Hilfe eines stark modifizierten FIA (Flow Injection Analysis)-Systems sollte es möglich sein, Titrationskurven in gewohnter Form zu erzeugen. Die Auswertung könnte mit den üblichen Verfahren (Tangentenverfahren, Tubbs-Verfahren, Schnittpunktverfahren, Auswertung über die maximale Potentialänderung, Methode nach Gran etc.) erfolgen [37].

Sowohl das FIA- als auch das Titrationssystem dienen zur Quantifizierung eines Stoffes in einer Probe. Die Bestimmung des Analyten erfolgt im Falle der Titration über eine exakt stöchiometrische Umsetzung mit dem Reagenz. FIA-Systeme (Abb. 2) registrieren dagegen einen reproduzierbaren Effekt (Spannung, Extinktion, Leitfähigkeit etc.) nach Durchlaufen der Reaktionsstrecke, der auf Grundlage einer Kalibrationskurve zum Ergebnis führt. Eine genau stöchiometrische Umsetzung ist in diesem Fall nicht erforderlich.

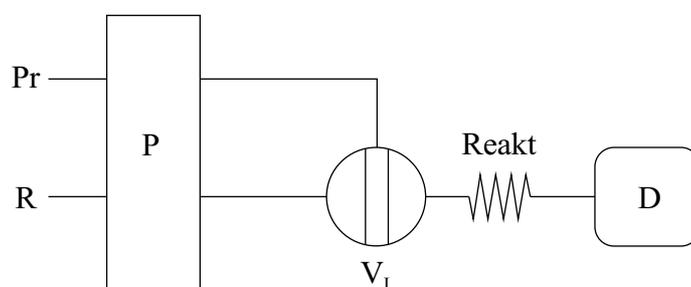


Abb. 2: Darstellung eines einfachen FIA-Systems [39].

Pr: Probe; R: Reagenz; P: Pumpeneinheit; V₁: Injektionsventil; Reakt: Reaktor; D: Detektor.

2.2.2.1. FIA-System

Der Flow Injection Analysis liegt die Injektion einer flüssigen Probe (ideal als plug) in einen flüssigen Trägerstrom zugrunde. Im einfachsten Fall reagiert die Probe mit dem Trägerstrom während sie in einem (Kapillar-)Reaktor zum Detektor befördert wird, der kontinuierlich die Absorption, das Elektrodenpotential oder andere physikalische Parameter aufnimmt, die sich durch die Vermischung und Reaktion von Probe mit dem Trägerstrom ändern. Die resultierende Antwortkurve in Form eines Peaks kann analog zur Chromatographie über die Peakhöhe, -breite oder -fläche ausgewertet werden, was allerdings eine vorhergehende Injektion von Standards zur Erstellung einer Kalibrationskurve voraussetzt [40].

2.2.2.2. Zu entwickelndes Titrations-System

Mit Hilfe des zu entwickelnden Systems (Abb. 3) soll, wie aus klassischen Titrationsen bekannt, anstatt eines Peaks ein kontinuierlicher Übergang des Messsignals erfolgen. Durch ein wechselndes Ansteuern von Probe und Titrant mittels eines einfachen 3-Wege-Ventils könnte im Reaktor durch Vermischung ein gewünschtes Volumenverhältnis erzeugt werden, welches mit der Zeit linear steigen sollte. Im Gegensatz zu allen bislang bekannten Titrationsverfahren soll bei dem neuartigen System das Messsignal gegen die Zeit bzw. das Mischungsverhältnis aufgenommen werden.

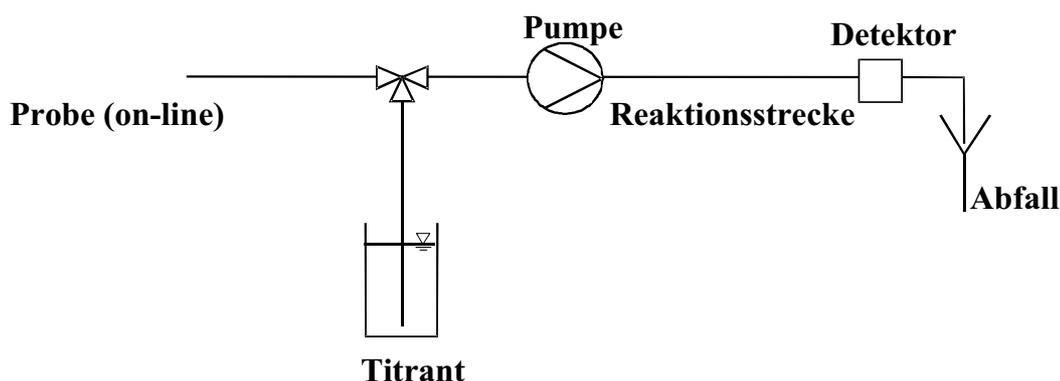


Abb. 3: vereinfachtes Fließschema des neuartigen on-line-Titrationsystems.

Zu Beginn der Titration wird das System nur von Probe durchströmt. Die Schaltzeiten für den Titranten sind anfänglich sehr klein, nehmen im Verlauf der Titration aber kontinuierlich zu. Auf dem Weg zum Detektor findet eine reproduzierbare Vermischung des zunächst gebildeten plug-flow-Profiles durch geeignete Strömungsführung statt (Abb. 4). Bei potentiometrischen und teilweise auch bei photometrischen Titrationsen kann der Äquivalenzpunkt anschließend z.B. mit Hilfe der ersten Ableitung der Titrationskurve bestimmt werden. Das Maximum der ersten Ableitung entspricht bei weitgehend symmetrischen Titrationskurven dem Äquivalenzpunkt [37]. Bei konduktometrischen Titrationsen ergibt sich der Äquivalenzpunkt aus dem Schnittpunkt der Tangenten von Reagenz- und Überschussgerade. Da die bis zum Äquivalenzpunkt verstrichene Zeit in direkt proportionaler Beziehung zum bis dahin erreichten Mischungsverhältnis von Titrant zu Probe steht, kann mit der bekannten Konzentration des Titranten die Konzentration der Probe berechnet werden. Die Quantifizierung der Probe beruht auf einer stöchiometrischen Umsetzung mit dem Titranten.

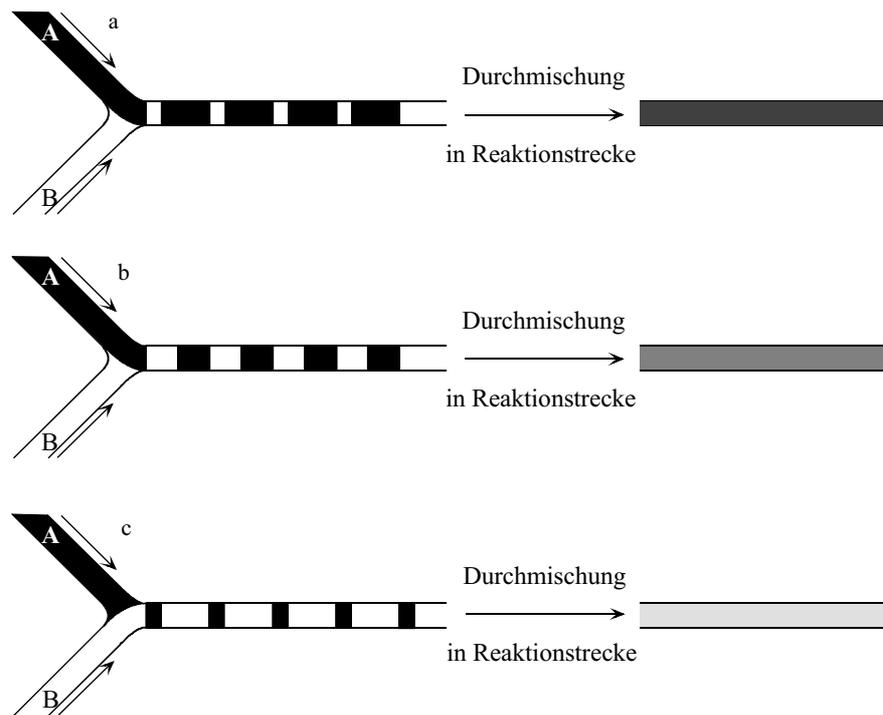


Abb. 4: erwartete Vermischungseffekte im Kapillarreaktor bei konst. Titrationsgrad.

A: Probe; B: Titrant; $\frac{V_{\text{Titrant}}}{V_{\text{Probe}}}$: $a : \frac{1}{3}$; $b : \frac{1}{1}$; $c : \frac{3}{1}$.

2.2.3. Pumpentechnik

Pumpen spielen in der chemischen Industrie eine sehr wichtige Rolle, da in diesem Industriezweig sehr häufig mit Flüssigkeiten oder Gasen umgegangen wird. Bei Gaspumpen wird zwischen Vakuumpumpen und Verdichtern unterschieden. Für Flüssigkeiten gibt es eine Vielzahl verschiedener Pumpentypen, welche u.a. nach ihrer Funktionsweise eingeteilt werden. In Laboratorien werden meist einfache Schlauchpumpen verwendet. In der Industrie sind Kreisel- und Kolbenpumpen, sowie rotierende und oszillierende Verdrängerpumpen im Einsatz [41]. Gemeinsamkeit dieser Bauarten ist eine hohe Förderleistung von einigen Litern in der Minute bis zu Tausenden von Kubikmetern pro Stunde. Für das zu entwickelnde Titrationssystem soll untersucht werden, welcher Pumpentyp besonders geeignet ist.

2.2.3.1. Schlauchpumpen (Peristaltikpumpen)

Schlauchpumpen werden den rotierenden Verdrängerpumpen zugeordnet. Sie eignen sich besonders für kleine Volumenströme. Ihre Förderraten liegen je nach Ausführung zwischen wenigen $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ und etlichen $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Der Flüssigkeitstransport erfolgt in Peri-

staltikpumpen durch eine wandernde Quetschbewegung, welche das in dem Schlauch befindliche Medium in Bewegung setzt [41]. Der Hauptvorteil dieser Pumpen ist, dass die Flüssigkeit nicht mit den Bauteilen der Pumpen in Berührung kommt. So muss lediglich der Schlauch gegenüber den zu transportierenden Medien beständig sein. Schlauchpumpen laufen in der Regel sehr langsam, d.h. mit nur wenigen Umdrehungen in der Minute. Um größere Drehmomente zu erhalten, ist deshalb der Antrieb mit einem Getriebe verbunden, welches letztlich von einem Elektromotor angetrieben wird. Diese konstruktive Maßnahme erhöht die Regelbarkeit der Pumpe. Zu den Nachteilen von Schlauchpumpen gehören neben den hohen Baukosten durch das Getriebe auch die dadurch relativ großen Abmessungen. Der Hauptnachteil ist wohl der Verschleiß des Schlauches, der durch die Walkbewegungen der Rollen nur eine begrenzte Lebensdauer hat und leckschlagen kann, wenn er nicht rechtzeitig ausgetauscht wird.

2.2.3.2. Kreiselpumpen

Die Kreiselpumpe ist die in der Verfahrenstechnik am meisten gebrauchte Fördereinrichtung. Je nach Bauform wird zwischen Radial-, Diagonal- und Axialkreiselpumpen unterschieden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Radialkreiselpumpen geprüft. Bei dieser Bauform strömt das Medium senkrecht zur Pumpenwelle. Die Schaufeln des rotierenden Laufrades erteilen der zuströmenden Flüssigkeit Geschwindigkeitsenergie, die zum größten Teil in Druckenergie umgewandelt wird. Die Förderung erfolgt kontinuierlich und pulsationsfrei. Förderhöhe und Förderstrom werden von der Umfangsgeschwindigkeit des Laufrades und damit von der Drehzahl der Welle bestimmt [42]. Zu den Vorteilen von Kreiselpumpen gehört neben der in der Regel einfachen Bauform die mechanische Robustheit. Kreiselpumpen sind bis auf wenige Ausnahmen, die über Zusatzeinrichtungen verfügen, nicht selbstansaugend. Sie benötigen daher einen Vordruck, um zu fördern. Schwankungen des Gegendrucks wirken sich direkt auf den Förderstrom aus, d.h. ohne Mengemessung und eine entsprechende Regelung ist ein reproduzierbarer Förderstrom nicht möglich [43].

2.2.3.3. Rotierende Verdrängerpumpen

Zu diesem Pumpentyp gehören eine Vielzahl unterschiedlicher Untertypen, z.B. Zahnradpumpen und Flügelzellenpumpen, auch Schlauchpumpen gehören zu diesem Typ. Schlauchpumpen werden allerdings nur im Labor verwendet, daher sind sie als eigener Punkt aufgeführt. Verdrängerpumpen können meist direkt mit einem Elektromotor gekoppelt werden und lassen sich raumsparend konstruieren. Nachteilig ist der im Einzelfall hohe konstruktive Aufwand und die erforderlichen kleinen Spiele, was bei manchen

Typen zu Problemen beim Trockenlaufen führen kann. Verdrängerpumpen dürfen zudem nicht gegen geschlossene Ventile gefahren werden [43].

Zahnradpumpen

Die häufigste Bauform bei Zahnradpumpen sind Pumpen mit außenverzahnten Förderrädern. Bei diesem Typ stehen zwei geradeverzahnte Räder miteinander im Eingriff. Diese drehen sich in einem Gehäuse, das die Zahnräder mit geringem Spiel umschließt. Der Förderstrom von Zahnradpumpen schwankt ca. 5 % um einen Mittelwert. In der chemischen Industrie werden spezielle Werkstoffe zur Fertigung von Zahnrädern und Gehäusen verwendet. Hinsichtlich der Präzision müssen die einzelnen Bauteile hohen Anforderungen genügen, dadurch sind diese Pumpen oft teurer als Kreiselpumpen. Ansonsten gelten für Zahnradpumpen alle zu den rotierenden Verdrängerpumpen gemachten Aussagen [43].

Flügelzellenpumpen

Die wichtigsten Vertreter dieses Typs sind Drehschieberpumpen und Drehflügelumpen mit elastischen Flügeln. Bei Drehschieberpumpen dreht sich ein exzentrisch gelagerter Rotor, der am Umfang mit radialen Schlitzen versehen ist, in einem zylindrischen Gehäuse. In den Schlitzen gleiten die Schieber durch die Zentrifugalkraft nach außen. Bei der Rotordrehung vergrößern sich die Förderräume im Bereich des Ansaugstutzens und verkleinern sich im Bereich des Druckstutzens. Infolge der Saug- und Druckwirkung entsteht eine kontinuierliche Förderung. Bei Drehflügelumpen mit elastischem Rotor biegen sich die Flügel entsprechend der exzentrischen Lage mehr oder weniger um. Durch die Veränderung des Zellenvolumens kommt es wie beim Drehschieber zur Saug- bzw. Druckwirkung. Der Vorteil der elastischen Flügel ist, dass sie sich bei eintretendem Verschleiß selbsttätig nachstellen. Die Reibung zwischen Flügeln und Gehäuse ist relativ hoch; dies gilt insbesondere beim Trockenlaufen der Pumpe. Die elastischen Rotoren, auch Impeller genannt, werden u.a. aus Neopren gefertigt. Flügelzellenpumpen eignen sich für reine Flüssigkeiten. Der Förderstrom fällt bei Impellerpumpen mit zunehmender Förderhöhe ab. Flügelzellenpumpen lassen sich wie Zahnrad- und Kreiselpumpen sehr kompakt bauen und benötigen im Normalfall kein Getriebe [43].

Mikrozahnringpumpen

Dieser Typ Pumpen arbeitet mit zwei konzentrisch angeordneten Zahnringen, zwischen denen sich bei Rotation der Verdrängerraum bildet.

2.2.4. Bedeutung und Grundlagen der Dispersion

Die Dispersion der Reaktanden im Reaktor spielt eine zentrale Rolle. Sie ist definiert als Verdünnung einer in einen Trägerstrom injizierten Probe und wird charakterisiert durch das Konzentrationsprofil der Probe an einem gegebenen Punkt, ohne dass der Fluss angehalten wird [40]. Um einen kontinuierlichen Anstieg des Titrationsgrades zu erreichen, muss im System eine reproduzier- und kontrollierbare Dispersion stattfinden. In diesen Prozess kann nur dann gezielt eingegriffen werden, wenn die Ursachen der Dispersion bekannt sind.

Früher war die Ansicht weit verbreitet, dass in den Reaktoren turbulente Strömung herrschen muss, um Quer-Kontamination der sukzessive injizierten Proben zu vermeiden [44]. Die Reynolds-Zahl nimmt in diesen Systemen allerdings immer einen Wert an, der deutlich unter 2000 liegt, was auf ein stark laminares Strömungsprofil hinweist. Es hat sich aber bald herausgestellt, dass die Reynoldszahl nicht als Grundlage zur Bestimmung der Strömungsverhältnisse in Kapillaren verwendet werden kann [40].

2.2.4.1. Mechanismen der Dispersion

Es gibt im Wesentlichen zwei Mechanismen, die zur Dispersion beitragen: Konvektion und Diffusion (Abb. 5).

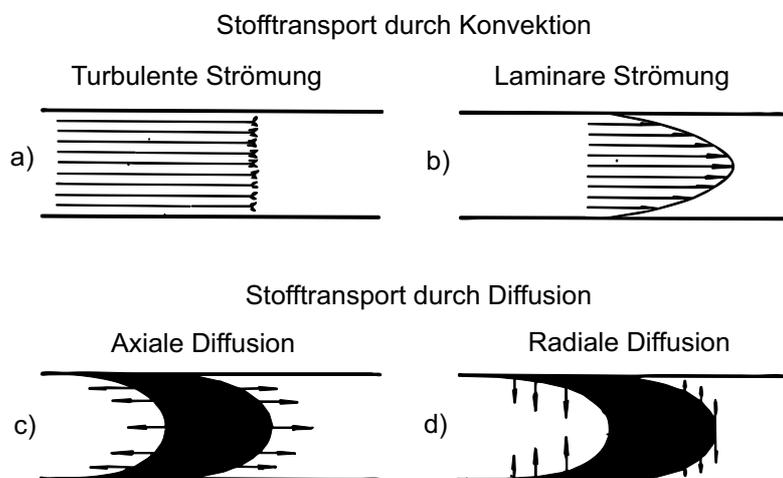


Abb. 5: Beitrag von Konvektion und Diffusion zur Dispersion eines Tracers in einer Kapillare [40].

a: gleichmäßige Geschwindigkeitsverteilung über den gesamten Strömungsquerschnitt bei turbulenter Strömung; b: Ausbildung eines Strömungsparaboloids bei laminarer Strömung; c: Stofftransport durch Diffusion in axiale Richtung; d: Stofftransport durch Diffusion in radiale Richtung.

Transport durch Konvektion

Unter laminaren Strömungsbedingungen bildet sich ein Strömungsparaboloid aus. Die Teilchen an der Wand besitzen keine Strömungsgeschwindigkeit, die Teilchen im Zentrum der Röhre bewegen sich mit der doppelten mittleren Teilchengeschwindigkeit fort [40].

Transport durch Diffusion

Diffusion wird verursacht durch Konzentrationsgradienten sowohl in axialer als auch in radialer Richtung. Die axiale Diffusion trägt zur Gesamtdispersion bei relativ großen Durchflussgeschwindigkeiten nur einen geringen Teil bei, die radiale Diffusion liefert aber aufgrund der Konzentrationsunterschiede senkrecht zur Flussrichtung einen wichtigen Beitrag zur Dispersion. Teilchen in der Nähe der Wand diffundieren in Richtung Zentrum, wogegen die Teilchen im Zentrum nach außen diffundieren. Diese Tatsache trägt entscheidend dazu bei, dass eine injizierte Probe ihre Integrität aufrechterhält. Radiale Diffusion verlangsamt den konvektiven Transport und somit die fortschreitende Verdünnung [40].

Das Konzentrationsprofil einer injizierten Probe ist ebenso wie die Beiträge der verschiedenen Typen des Stofftransports zeitabhängig (Abb. 6).

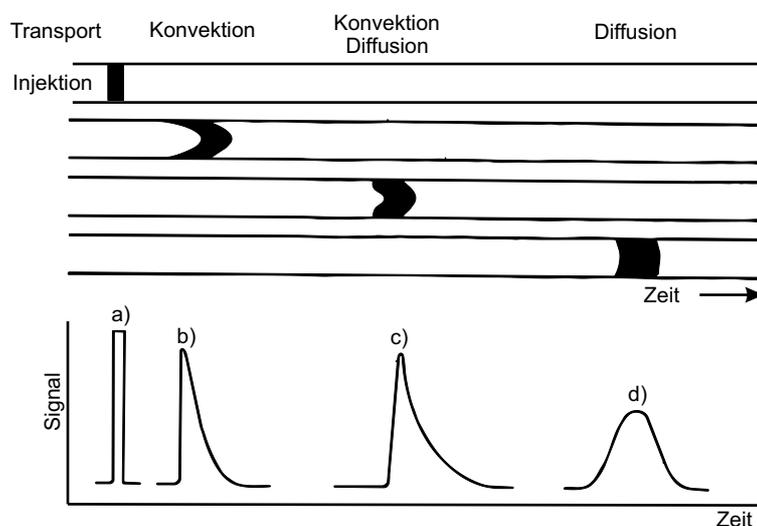


Abb. 6: Einfluss der Diffusion auf die Dispersion [40].

a: Plug während Injektion; b: Ausbildung eines Strömungsparaboloids direkt nach der Injektion; c: bereits deutlicher Einfluss der Konvektion; d: ausreichend lange Verweilzeit führt annähernd zur Form einer Gausskurve.

An Abbildung 6 wird der starke Einfluss der radialen Diffusion auf die Dispersion deutlich. Zu Beginn findet noch keine Dispersion statt, die Probe befindet sich als plug im

Rohr. Direkt nach der Injektion wird der Transport hauptsächlich durch Konvektion bestimmt und ein Strömungsparaboloid bildet sich aus. Da sich die Teilchen in der Mitte der Kapillare mit der doppelten mittleren Geschwindigkeit bewegen, zeigt die Antwortfunktion ein starkes Tailing. Dieser Fall tritt allerdings nur bei sehr kurzen Verweilzeiten auf, da sich schon nach kurzer Zeit der Einfluss der Diffusion deutlich bemerkbar macht. Diese kann bei ausreichend langer Verweilzeit sogar vorherrschen. Das Profil der injizierten Zone nimmt eine kompaktere Form an, obwohl die Verzerrung im Zentrum aufgrund der höheren Strömungsgeschwindigkeit noch immer vorhanden ist. Der resultierende Peak nimmt annähernd die Form einer Gauss-Kurve an.

Die Dispersion einer Probe kann entscheidend durch die Verweilzeit im Kapillarreaktor beeinflusst werden. Hohe Verweilzeiten können z.B. durch eine niedrige Durchflussgeschwindigkeit oder einen großen Querschnitt erreicht werden und führen annähernd zur Ausbildung von Gauss-Kurven.

2.2.4.2. Bestimmung des Dispersionskoeffizienten

Der Dispersionskoeffizient (D) dient zur quantitativen Erfassung der Dispersion und kann mit Hilfe eines einfachen Experiments ermittelt werden, das in der chemischen Reaktionstechnik als Stoßmarkierung bekannt ist. Eine injizierte Probe (die Spurstoffaufgabe erfolgt in der Regel als Pulsfunktion) folgt dem Trägerstrom unter Dispersion und die resultierende Antwortkurve reflektiert das entstandene Konzentrationskontinuum. Der Strom kann aus vielen einzelnen Flüssigkeitselementen zusammengesetzt betrachtet werden, die alle eine von der ursprünglichen Probenkonzentration abweichende bestimmte Konzentration besitzen.

Oftmals ist es wichtig zu wissen, nach welchem Zeitraum die Probe den Detektor erreicht und wie stark diese während des Transportes verdünnt wird. Die Verdünnung kann mit Hilfe des Dispersionskoeffizienten (D) bestimmt werden, der zu einem bestimmten Zeitpunkt als Verhältnis der Konzentration des Probenmaterials vor (c_0) und nach (c) dem Dispersionsprozess definiert ist [26].

$$D = \frac{c_0}{c} \quad (3)$$

Der Dispersionskoeffizient wird durch Verhältnisbildung der Peakhöhen der verdünnten (h) und unverdünnten (h_0) Probe bestimmt.

$$D = \frac{k_0 h_0}{k_1 h} \Rightarrow D = \frac{h_0}{h}; k_0 = k_1 \quad (4)$$

k_0 und k_1 stellen identische Proportionalitätskonstanten dar, wenn die Signalhöhe in einer linearen Beziehung zur Konzentration im betrachteten Bereich steht.

Es existieren auch zahlreiche mathematische Modelle, welche aufgrund theoretischer Überlegungen die Dispersion beschreiben. Ein Ansatz, der sowohl Konvektion als auch Diffusion erfasst [26], lautet:

$$D \left(\frac{\delta^2 c}{\delta l^2} + \frac{\delta^2 c}{\delta r^2} + \frac{1}{r} \frac{\delta c}{\delta r} \right) = \frac{\delta c}{\delta t} + u_0 \left(1 - \frac{r^2}{R^2} \right) \frac{\delta c}{\delta l} \quad (5)$$

Hierbei bedeuten: l : partielle Kapillarlänge; r : partieller Kapillarradius; R : Kapillarradius; u_0 : maximale lineare Geschwindigkeit.

Viele Versuche wurden unternommen, eine numerische Lösung der Differentialgleichung zu entwickeln. Allerdings erwies sich diese Aufgabe als sehr schwierig. In der Praxis wird die Dispersion nach wie vor experimentell ermittelt. Es sollte allerdings immer beachtet werden, dass diese Betrachtungen der Dispersion nur den physikalischen Prozess der Dispersion beinhalten; chemische Reaktionen werden nicht berücksichtigt [40].

2.2.4.3. Einfluss der Systemparameter auf die Dispersion

Die Dispersion im System hängt von mehreren Parametern ab. Aufgrund der Taylor-Gleichung ergeben sich für die Bandenbreite eines Peaks in einer Kapillare folgende Zusammenhänge [26, 45]:

$$\sigma_t^2 = \frac{2D_m t^3}{L^2} + \frac{d_c^2 t}{96D_m} \quad (6)$$

für $u \gg 0$:

$$\sigma_t^2 \approx \frac{d_c^2 t}{96D_m} \quad (7)$$

σ : Bandenbreite, D_m : molekularer Diffusionskoeffizient, t : Zeit, L : Kapillarlänge, d_c : Kapillardurchmesser.

Durch die Einführung der dynamischen Theorie und damit der Bodenzahl (N , Glg. 8) lässt sich letztendlich ein Zusammenhang ableiten, der die Art und Größenordnung der auftretenden Parameter beschreibt (Glg. 9) [45].

$$N = \left(\frac{t}{\sigma} \right)^2 \quad (8)$$

$$\sigma^2 = A^2 \cdot h \cdot L_K = \frac{\pi d_c^4 L_K F}{384 D_m} \quad (9)$$

A : Querschnittsfläche, F : Durchfluss

Die Bandenbreite hängt somit von 3 übergeordneten Parametern ab:

Zeit

$$\sigma = f(\sqrt{F}) \quad (10)$$

$$\sigma = f\left(\sqrt{\frac{1}{t}}\right) \quad (11)$$

Substanz

$$\sigma = f\left(\sqrt{\frac{1}{D_m}}\right) \quad (12)$$

Geometrie

$$\sigma = f(d_c^2) \quad (13)$$

$$\sigma = f(\sqrt{L_K}) \quad (14)$$

Weder die Durchflussgeschwindigkeit (F), der substanzspezifische molekulare Diffusionskoeffizient (D_m) noch die Länge der Kapillare (L_K) liefern einen entscheidenden Beitrag zur Bandenverbreiterung, sie hängt jedoch sehr stark (quadratisch) vom Innendurchmesser (d_c) ab.

Neben dem Innendurchmesser wirkt sich auch die Form der Kapillare deutlich auf das Dispersionsverhalten aus. Die radiale Durchmischung liegt bei aufgewickelten oder verknoteten Reaktoren deutlich höher als bei geradlinigen, wodurch der Einfluss des Strömungsparaboloids in axialer Richtung reduziert wird. Die Reagenzien werden somit bei gleichzeitiger Abnahme der axialen Dispersion besser durchmischt. Ursache dafür sind sogenannte „Secondary-Flow-Effekte“ [44] senkrecht zur axialen Flussrichtung (Abb. 7). Sie werden durch eine Änderungen der Fließrichtung und damit verbundener Einwirkung einer Zentrifugalkraft auf die Fluidelemente hervorgerufen [46].

Je häufiger eine Änderung der Fließrichtung stattfindet, umso stärker wirkt dieser Effekt. Die Dispersion des Gesamtsystems kann durch zusätzliche Verwendung einer Mischkammer stark erhöht werden, falls die Dispersion in den Kapillaren nicht ausreicht. Eine Mischkammer wirkt als PT_1 -Glied, d.h. die Konzentration eines Tracers nimmt exponentiell ab. Für den Konzentrations-Zeit-Verlauf ergibt sich [47]:

$$c(t) = e\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (15)$$

c : Konzentration; τ : Verweilzeit

Prinzipiell sollte keiner der genannten Parameter für sich alleine betrachtet werden, da sich die Dispersion aus allen Einflussgrößen zusammensetzt. außerdem stellt die Vermischung im Reaktor nur einen Teilbereich der Gesamtdispersion dar (Glg. 16), da auch

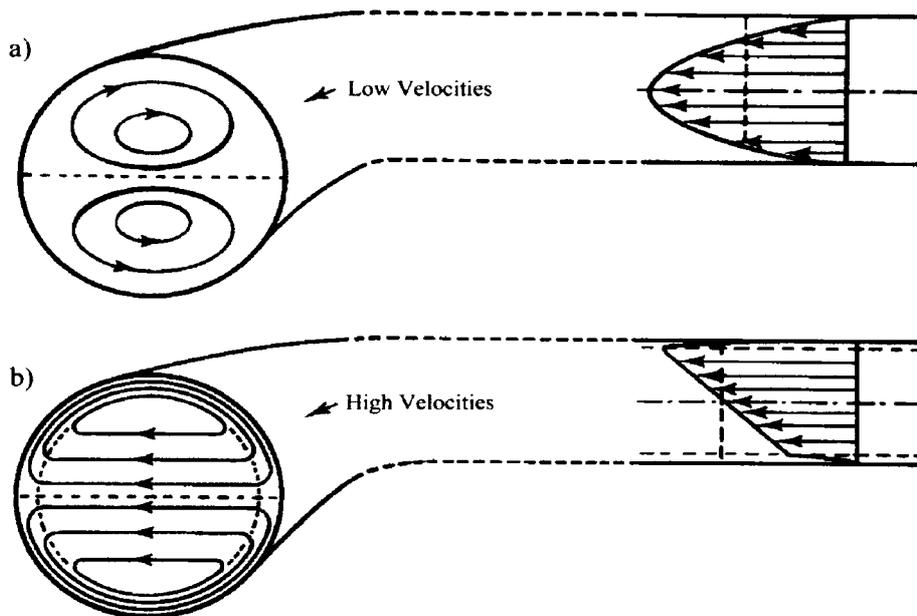


Abb. 7: Secondary-Flow-Effekte in aufgewickelten Kapillarreaktoren [26].
Bei a) niedrigen und b) hohen Durchflussgeschwindigkeiten.

die Injektion und die Detektion mit Dispersionseffekten bzw. zeitlichen Verzögerungen behaftet sind [26].

$$\sigma_{gesamt}^2 = \sigma_{Injektion}^2 + \sigma_{Fluss}^2 + \sigma_{Detektor}^2 \quad (16)$$

Wenn der Detektor eine geeignete Konstruktion aufweist (geringes Volumen der Durchflusszelle und kleine Zeitkonstante der Messanordnung), kann sein Beitrag zur Dispersion vernachlässigt werden [48].

2.2.5. Wasserhärte

Die sog. Wasserhärte wird heute als Summe der Konzentrationen der Erdalkalimetallionen („Härtebildner“) in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ definiert. Die Definition wird allerdings meist auf die Summe der Konzentrationen von Calcium und Magnesium eingeeengt, da Strontium und Barium sehr selten sind und normalerweise nur in Spuren vorkommen [33]. Daneben sind noch weitere Härte-Begriffe, wie z.B. der der Härtehydrogencarbonat (Karbonathärte) geläufig, der der Säurekapazität $K_{S4,3}$ (Kap. 2.2.6.1., S. 23) entspricht. Gemäß der DIN-Vorschrift [49] sollten eindeutige Angaben, wie z.B. der Gehalt eines Wassers an Calcium- oder Magnesium-Ionen bzw. deren Summe, gewählt werden. In dieser Norm nicht aufgeführte Wortverbindungen mit dem Begriff Härte wie „Gesamthärte“, „Calci-

umhärte“, usw. sind als veraltet anzusehen und daher unbedingt zu vermeiden. Historisch ist der Härtebegriff auf die Reaktion der Calcium-Ionen des Wassers beim Waschvorgang mit fettsauren Seifen zurückzuführen.

Die Härte des Grund- und Oberflächenwassers und folglich auch die Härte des daraus gewonnenen Leitungswassers hängt von den geologischen Beschaffenheiten des Bodens ab, durch den das Wasser sickert oder fließt.

Die Härte unseres Leitungswassers unterliegt nicht nur jahreszeitlich bedingten Änderungen. Besonders bei überregionalen Versorgungssystemen können durch Vermischen von Wässern aus unterschiedlichen Einzugsbereichen kurzzeitig Schwankungen über mehrere Härtegarde auftreten. Die Wasserhärte gehört daher zu den am häufigsten ermittelten Kenngrößen zur Charakterisierung eines Wassers. Wasser mit definierter Härte in engen Grenzen, z.B. sehr weiches Wasser oder sogar vollkommen enthärtetes Wasser, ist für viele Prozesse im Labor, in der industriellen Produktion und vielen anderen Einsatzgebieten erforderlich.

Hartes Wasser bildet beim Erwärmen Kalkablagerungen und Ausfällungen, den sog. Kesselstein, der eine Wärmeübertragung erschwert und erhöhte Energiezufuhr erforderlich macht. Andererseits, ein oft vernachlässigter Punkt, ist sehr weiches Wasser aggressiv, d.h. es greift Rohrsysteme und Schutzschichten in Rohrsystemen an bzw. lässt solche gar nicht erst entstehen. Weiterhin führt zu hartes Wasser in der Lebensmittelindustrie zu Geschmacksbeeinträchtigungen, Trübungen und Bodensätzen.

Als sehr gravierend für die Umwelt (Eutrophierung von Gewässern) hat sich erwiesen, dass hartes Wasser eine signifikant höhere Dosierung an Waschmitteln erfordert und damit eine übermäßige Belastung des Abwassers verursacht.

2.2.5.1. Bestimmung der Wasserhärte

Basis für die Untersuchung des Calcium- und Magnesiumgehalts mittels komplexometrischer Titration ist das Deutsche Einheitsverfahren DIN 38 406-E 3 [50]. Die Wasserhärte wird nach DIN 38 409-H 6 bestimmt [49], in der jedoch lediglich auf erstgenannte Norm verwiesen wird.

Danach erfolgt die Härte-Bestimmung durch komplexometrische Titration von Calcium und Magnesium mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gegen den Indikator Eriochromschwarz T. Hierbei werden Strontium und Barium miterfasst. Die Gesamthärte ist per Definition die Summe der im Wasser enthaltenen Erdalkalitionen, gebundenen als Carbonate, Sulfate, Chloride, Nitrate und Phosphate.

Die Gesamthärte wird in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ angegeben. Eine mittlerweile veraltete und unzulässige, jedoch immer noch anzutreffende Einheit stellt das Grad Deutscher Härte $^{\circ}\text{d}$ bzw. $^{\circ}\text{dH}$ dar. Dabei gilt [51]:

$$1^{\circ}d = 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaO bzw. } 7,19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgO} \quad (17)$$

$$1^{\circ}d = 0,18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Erdalkaliionen} = 17,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CaCO}_3 \quad (18)$$

Die Härte des Wassers wird mittels der Einheit $^{\circ}d$ wie folgt beurteilt:

0 - 4 $^{\circ}d$ sehr weich

4 - 8 $^{\circ}d$ weich

8 - 18 $^{\circ}d$ mittel

18 - 30 $^{\circ}d$ hart

> 30 $^{\circ}d$ sehr hart

Nach dem DIN-Verfahren kann der Gehalt von Grundwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser bestimmt werden. Es kann auch auf Industrie- und Haushaltsabwässer angewendet werden unter der Voraussetzung, dass sie keine störenden Mengen von Schwermetallen enthalten.

Meerwasser und Wasser mit vergleichbar hohem Salzgehalt sollten nicht nach diesem Verfahren untersucht werden. Diese Methode ist anwendbar, wenn die Summe der Calcium- und Magnesiumkonzentration über $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ beträgt. Übersteigt die Konzentration etwa $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, so muss das Wasser vor der Analyse verdünnt werden [50]. Das Verfahren beruht auf der komplexometrischen Titration von Calcium- und Magnesiumionen mittels des Dinatriumsalzes der Ethlendiamintetraessigsäure (EDTA) als Titrationsmittel und Eriochromschwarz T als Indikator. Die Titration wird bei einem pH-Wert von 10 durchgeführt. Während der Titration reagieren zunächst die freien Calcium- und Magnesiumionen mit EDTA, anschließend die an den Indikator gebundenen. Dieser schlägt dabei von rotviolett nach blau um. Störungen der Analyse werden durch Barium, Strontium, Aluminium, Blei, Eisen, Kupfer, Mangan, Zink und Zinn verursacht, außerdem kann durch Anwesenheit von Orthophosphat ($\beta > 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) beim pH-Wert der Titration Calcium ausfallen. Der Gesamtgehalt der Wasserprobe an Calcium- und Magnesiumionen wird anschließend über den Verbrauch an Titranten [mL] berechnet.

2.2.6. Säure- und Basekapazität

2.2.6.1. Definition der Säure- und Basekapazität gemäß DIN 38409-7

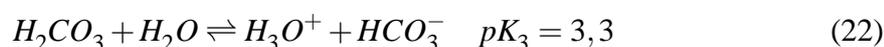
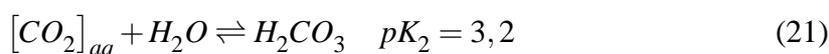
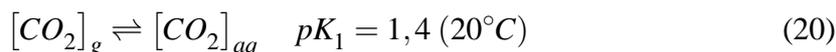
Als Säurekapazität (K_S) eines Wassers wird der Quotient aus der Stoffmenge an Hydronium-Ionen ($n(\text{H}_3\text{O}^+)$), die eine bestimmte Stoffportion Wasser bis zum Erreichen

bestimmter pH-Werte aufnehmen kann, und dem Volumen ($V(H_2O)$) dieser Stoffportion bezeichnet (Glg. 19) [52].

$$K_S = \frac{n(H_3O^+)}{V(H_2O)} \quad [mol \cdot m^{-3}] \quad (19)$$

Um Kohlendioxid in Wasser messen zu können, müssen verschiedene pH-abhängige Gleichgewichte berücksichtigt werden.

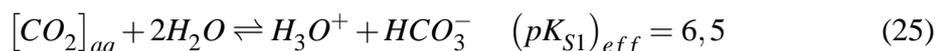
Im System Kohlendioxid/Wasser treten folgende Gleichgewichte auf [53]:



Mit einem pK_S von 3,3 ist Kohlensäure als starke Säure einzustufen. Da aber nur etwa 0,1 % des gelösten Kohlendioxids Kohlensäure bildet, berechnet sich der effektive pK_{S1} -Wert zu

$$(pK_{S1})_{eff} = pK_2 + pK_3 = 6,5 \quad (24)$$

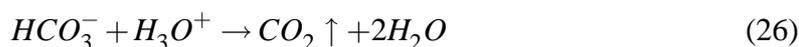
so dass entsprechend der Gleichung



eine sehr schwache Säure resultiert [54]. Ausgehend von gasförmigem Kohlendioxid, beträgt $(pK_{S1})_{eff} = 7,9$.

Säurekapazität

Der Titration zur Bestimmung der Säurekapazität eines Wassers liegt die Protonierung des Hydrogencarbonations zugrunde (Glg. 26) [55].



Als $K_{S8,2}$ -Wert wird die Säurekapazität des Wassers bezeichnet, wenn dieses durch Zugabe von Hydronium-Ionen den pH-Wert 8,2 erreicht hat. Analog dazu wird unter $K_{S4,3}$ der Säurekapazitätswert bis zu einem pH-Wert von 4,3 verstanden. Die Durchführbarkeit

hängt unter anderem auch vom Ausgangs-pH-Wert ab. Titrationsen gegen die pH-Werte 4,3 und 8,2 werden bevorzugt, da diese charakteristische Werte für das Puffersystem der Kohlensäure sind [55]. Bei pH 4,3 liegen Kohlendioxid, bei pH 8,2 dagegen Hydrogencarbonat überwiegend vor (Abb. 8) [31]. außerdem ist bei diesen pH-Werten die Pufferkapazität vergleichsweise gering.

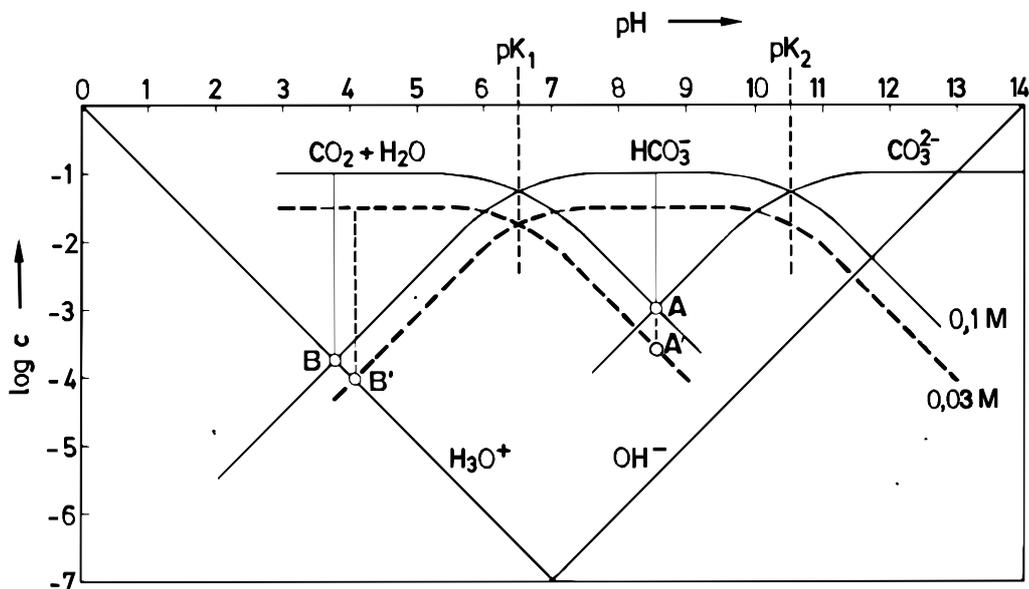


Abb. 8: Hägg-Diagramm des Kohlensäure-Systems ($pK_1 = 6,5$; $pK_2 = 10,4$) [31].

Basekapazität

Die Basekapazität (K_B) eines Wassers ist der Quotient aus der Stoffmenge an Hydroxid-Ionen ($n(OH^-)$), die eine bestimmte Stoffportion Wasser bis zum Erreichen bestimmter pH-Werte aufnehmen kann, und dem Volumen ($V(H_2O)$) dieser Stoffportion (Glg. 27) [52].

$$K_B = \frac{n(OH^-)}{V(H_2O)} \quad [mol \cdot m^{-3}] \quad (27)$$

Der Titration zur Bestimmung der Basekapazität eines Wassers liegt die Deprotonierung des Hydrogen- bzw. Carbonatsystems zugrunde (Glg. 28 und 29).

Hauptreaktion:



Nebenreaktion:



Als $K_{B8,2}$ -Wert wird die Basekapazität des Wassers bezeichnet, die durch Zugabe von Hydroxid-Ionen bis zum pH-Wert 8,2 erreicht wird. Entsprechend ist der $K_{B4,3}$ -Wert definiert.

2.2.6.2. Bedeutung der Säure- und Basekapazität

Die Pufferwirkung von Trinkwasser beruht im Wesentlichen auf dem Kohlensäuregleichgewicht (Hydrogencarbonat, Carbonat und freie Kohlensäure). Die Konzentrationen dieser Ionen einschließlich des Kohlenstoffdioxids können durch Titration der Säure- und Basekapazität nach DIN 38409 Teil 7 [52] bestimmt werden, wodurch Angaben über eine in den menschlichen Haushalt eingebrachte Menge an Puffersalzen möglich sind. Diese Werte hängen stark von der jeweiligen Beschaffenheit der für die Trinkwasseraufbereitung eingesetzten Ausgangswässer ab, z.B. führen stark kalkhaltige Böden zu höheren Säurekapazitäten der Grundwässer als sandige und kalkarme.

In natürlichen Gewässern spielen sich Stoffkreisläufe ab, die zu typischen Kohlenstoffdioxidgehalten führen. Unter anderem stellt die Aufnahme von Kohlendioxid aus atmosphärischer Luft einen wichtigen Beitrag zur puffernden Wirkung von Regenwasser dar. Allerdings wird vom Menschen in diese Gleichgewichte beispielsweise durch Einleiten von Puffersubstanzen aus Putz-, Wasch-, und Spülmitteln privater Haushalte in Flüsse und Kläranlagen und durch Emissionen von Industrieanlagen (SO_2 , SO_3 , NO_x etc.) störend eingegriffen [56].

Der qualitative Nachweis der puffernd wirkenden Verbindungen Kohlenstoffdioxid, Hydrogencarbonat- und Carbonat-Ionen kann wahlweise nach dem konduktometrischen oder gravimetrischen Verfahren durchgeführt werden (DEV G1) [52]. In beiden Fällen wird als Ergebnis die Summe der Konzentrationen an Kohlensäure und ihrer Anionen erhalten. Die Angabe erfolgt in $mmol \cdot L^{-1}$ bzw. $mol \cdot m^{-3}$ (Glg. 30).

$$\sum C_{anorg.} = c(CO_2) + c(HCO_3^-) + c(CO_3^{2-}) \quad (30)$$

Da bei sogenannten „reinen“ Wässern (Grund- und Trinkwasser) der Gehalt an anderen schwachen Säuren und Basen mit gleichen puffernden Wirkungsweisen im Allgemeinen vernachlässigbar gering ist, stellen die erwähnten Kohlenstoffverbindungen hier die vorherrschenden Puffersubstanzen dar. Sie können durch Bestimmung der Säure- und Basekapazität (DEV H7 bzw. DIN 38409 Teil 7) quantitativ erfasst werden [52].

2.2.7. Gegenüberstellung des neuartigen Systems mit kommerziellen Systemen

Konventionelle Autotitratoren beruhen auf einer effizienten Durchmischung von Titrant und Analyt in einem temperierbaren Messgefäß. Die Sensoren arbeiten meist auf elektrochemischer oder optischer Basis. Die bauartbedingt großen Probenvolumina (meist

50 mL) erfordern Thermostaten mit großer Wärmeaustauschkapazität zur Kompensation der freiwerdenden Reaktionsenthalpie, da das Elektrodenpotential auch von der Temperatur abhängt. Die Dosierung der Proben, Standards und des Titranten erfolgt mit Hilfe von Kolbenbüretten mit variablen Volumina von beispielsweise 5 bis 50 mL. Zur volumetrischen Probenabmessung werden meist Überlaufpipetten oder Schleifensysteme eingesetzt.

In Tabelle 1 befindet sich eine Übersicht von am Markt angebotenen (teil-)automatisierten Titrationsgeräten, welche teilweise auch Direktbestimmungen ermöglichen. Keiner der angebotenen Titratoren eignet sich für on-line-Messungen.

Tab. 1: technische Beschreibung einer Auswahl an Autotitratoren *.

Firma	Mettler Toledo	Radiometer	Metrohm	Wittenfeld und Cornelius
Typenbezeichnung	DL77	Titralab 90 - KF	Titroprocessor 796	TitroWiCo
Titrationsarten	Endpunkt-, ÄP-, Zweiphasen-, Parallel-, KF-Titration, pH-Statierung,	Endpunkt-, ÄP-, KF-Titration	Endpunkt-, ÄP-, KF-Titration, pH-Statierung	Endpunkt-, ÄP-, Zweiphasentitration, pH-Statierung, Simultanbest. von 4 Proben
Methode/Sensoren	potentiom., photom., voltam., konduktom.	potentiom., amperom.	potentiom.	potentiom., photom., konduktom.
Dosierung	Wechselbüretten	Kolbenbürette	Kolbenbürette	Kolbenbürette
Kosten	ca. 14.000 € zzgl. Sensor	ca. 6.250 € zzgl. Sensor	ca. 15.300 €	ca. 12.750 €

* alle nicht on-line-fähig; ÄP: Äquivalenzpunkt, KF: Karl-Fischer.

Die Durchführung einer Titration mit einem kommerziellen Autotitrator erfordert eine große Anzahl an Arbeitsschritten und einen relativ hohen apparativen Aufwand, wodurch hohe Personal- und Materialkosten verursacht werden.

Das zu entwickelnde on-line-Autotitrationssystem darf also nicht mit den oben genannten Nachteilen behaftet sein. Aufwendige Dosiereinrichtungen wie Kolbenbüretten und Überlaufpipetten sollen durch ein handelsübliches Drei-Wege-Magnetventil in Kombination mit einer geeigneten Steuerungssoftware ersetzt werden. Ein aus wirtschaftlichen und umweltpolitischen Gründen erstrebenswerter minimaler Reagenzienverbrauch (unter 5 mL pro Titration) soll durch Verwendung eines Kapillarreaktors ermöglicht werden, in dem gleichzeitig auch die Vermischung stattfindet. Die Thermostatierung kann aufgrund

der geringen Probenmenge schon durch ein einfaches Peltier-Element realisiert werden, weiterhin entfallen aufwendige Arbeitsschritte wie z.B. Spülen, da die Messung in einer Durchflusszelle erfolgt.

Tabelle 2 zeigt deutlich die erwarteten Vorteile des neuen Systems.

Tab. 2: erforderliche Arbeitsschritte eines kommerziellen Autotitrators im Vergleich mit dem zu entwickelnden System.

Arbeitsschritt	kommerzieller Autotitrator	zu entwickelnder on-line-Autotitrator
1.	Systemkalibration ¹	
1.1.	spülen	
1.2.	Kalibrierlösung dosieren	
1.3.	Kalibrierlösung in Messgefäß überführen	
1.4.	Messung	Messung ²
1.5.	Messgefäß entleeren	
1.6.	spülen	
2.	Titration	
2.1.	Probe dosieren	
2.2.	Probe in Messgefäß überführen	
2.3.	Titrant zudosieren (schrittweise)	
2.4.	rühren	
2.5.	warten	
2.6.	Messung	Messung ³
2.7.	Arbeitsschritt 2.3. bis 2.6. mit aufsteigenden Titrantvolumina wiederholen	
2.8.	Messgefäß entleeren	
2.9.	spülen	

¹ nicht unbedingt erforderlich.

² Kalibrier- bzw. Standard-Additions-Lösung.

³ Probe und Titrant in verschiedenen Anteilen.

Die Messung kann kontinuierlich erfolgen; alle Arbeitsschritte, die mit diskontinuierlichen Prozessen verbunden sind, entfallen. Messgefäße müssen nicht gespült und Probe sowie Reagenzien nicht aufwendig in Schritten zudosiert werden. Durch die effizientere Arbeitsweise des neuen Systems ist es möglich, den Zeitaufwand pro Einzelanalyse sowie die direkten Betriebskosten zu reduzieren. Das zu entwickelnde System sollte somit eine wesentlich höhere Wirtschaftlichkeit und Benutzerfreundlichkeit als herkömmliche Systeme aufweisen.

Zur Realisierung dieses Systems sind lediglich eine Mikropumpe, ein Drei-Wege-Ventil, ein (Sensor-)Detektor und ein System zur Steuerung und Auswertung erforderlich. Die Kosten für ein solches on-line-Titrationssystem liegen bei deutlich unter 2.500 Euro.

Ein derartiges on-line-Titrationssystem würde im Vergleich zu kommerziell angebotenen Autotitratoren enorme Vorteile bieten: sowohl Anschaffungs- als auch Betriebskosten würden bei gleichzeitiger Effizienzsteigerung drastisch reduziert werden. Aufgrund des einfachen Funktionsprinzips könnte das System über lange Zeiträume unbeaufsichtigt arbeiten und würde kein speziell geschultes Personal erfordern.

2.3. Kapillarelektrophorese

2.3.1. Entwicklung elektrophoretischer Trennmethode

Die Entwicklung der Elektrophorese begann 1930 mit der Arbeit von A. Tiselius [57]. Er führte seine Messungen in einem gebogenen U-förmigen Quarzrohr durch und detektierte Proteine mit UV-Licht. Der große Nachteil dieser Apparatur war die Blasenbildung, hervorgerufen durch thermische Konvektion, die durch die Joulesche Wärme der angelegten Spannung verursacht wurde. Dieser Nachteil führte zur Entwicklung von Elektrophoresetechniken in konvektionsstabilisierten Medien. So erfuhr die Papierelektrophorese besonders durch die Arbeiten von T. Wieland und E. Fischer [58] seit 1950 einen großen Aufschwung. Die Einführung von Gelelektrophoreseverfahren in nahezu jedes biochemische und medizinische Labor erfolgte ebenfalls in dieser Zeit. Als sehr leistungsfähig erwiesen sich Polyacrylamid- (PAGE) [59] und Agarosegelelektrophorese [60]. Die Entwicklung der Polyacrylamidgelelektrophorese mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) erweiterte den Einsatz von elektrophoretischen Methoden erheblich [61]. Elektrophorese wird überwiegend, wie die seit 1950 entwickelten und hier beschriebenen Methoden, auf Platten durchgeführt. Elektrophorese in Säulen wurde erst seit 1965 wieder verstärkt durchgeführt. Die Verwendung von Säulen mit Innendurchmessern von weniger als 1 mm und die Entwicklung neuer Detektoren trugen u.a. dazu bei. An diesen Entwicklungen waren maßgeblich S. Hjertén [62] und F.M. Everaerts [63] beteiligt. Erst F.E. Mikkers et al. [64] und J.W. Jorgenson [65] verwendeten Kapillarsäulen mit geringen Innendurchmessern von weniger als 200 μm , so dass effektivere Trennungen erreicht werden konnten. J.W. Jorgenson erreichte 1981 bei seinen kapillarelektrophoretischen Trennungen Effektivitäten, die im Bereich der theoretisch berechneten Werte lagen.

2.3.2. Technische Voraussetzungen

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine elektrophoretische Trennmethode, in der Ionen und ionisierbare Komponenten aufgrund ihrer Mobilität im elektrischen Feld getrennt und dann detektiert werden. In einem elektrischen Gleichstromfeld wandern geladene Moleküle in die Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Die Proben-substanzen befinden sich dabei in wässriger oder zumindest protischer Lösung. Verschiedenartige Moleküle eines Gemisches wandern aufgrund unterschiedlicher Ladungen und Massen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden dabei in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Die elektrophoretische Mobilität, d.h. die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, ist eine charakteristische Größe eines geladenen Moleküls. Sie ist u.a. von der Zahl und den pK-Werten der geladenen Gruppen und der Molekülgröße abhängig. Diese wird von der Art, der Konzentration und dem pH-Wert des Puffers, der Temperatur

sowie der erzeugten Feldstärke beeinflusst. Der prinzipielle Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abbildung 9 schematisch dargestellt.

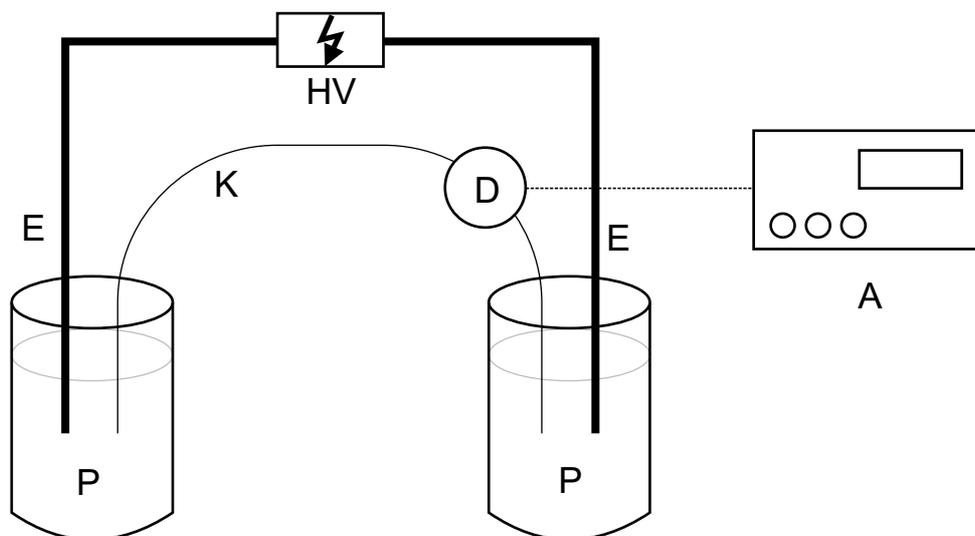


Abb. 9: schematischer Aufbau einer CE-Apparatur.

HV: Hochspannungsquelle; E: Elektrode; K: Kapillare; D: Detektor; A: Auswerteeinheit; P: Puffergefäß.

Die Kapillare (ID: 25 – 100 μm , OD: ca. 300 μm) besteht meist aus amorphem Siliciumdioxid (fused silica). Sie überbrückt mit Längen von 250 mm und länger die beiden Puffergefäße. In den beiden Puffergefäßen befinden sich die Elektroden, an die eine Spannung, meist bis zu 30 kV, angelegt wird [66]. Die Injektion der Probe erfolgt meistens am anodischen Ende der Kapillare, indem das Pufferreservoir kurz gegen das Probenreservoir austauscht und Druck oder ein elektrisches Feld angelegt werden. Durch die anliegende Spannung baut sich anschließend in der mit Puffer gefüllten Kapillare ein elektrisches Feld auf, in welchem die Wanderung und die damit verbundene Trennung der ionogenen Probenbestandteile erfolgt. Die elektrophoretische Wanderung ist immer einem mehr oder minder starken elektroosmotischen Fluss (EOF) überlagert (Kap. 2.3.3.1., S. 33). Es handelt sich dabei um einen Fluss der Pufferlösung als Folge der Oberflächenladung der Innenwand der Kapillare. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes bewegt sich in fused-silica-Kapillaren der sogenannte „bulk flow“ in Richtung Kathode, weshalb der Detektor gewöhnlich in der Nähe der Kathode angeordnet wird [34]. In der CE werden neben UV-, Fluoreszenz- und Leitfähigkeitsdetektoren auch die Kopplung an ein Massenspektrometer zur Detektion eingesetzt [67].

2.3.3. Theoretische Grundlagen der Elektrophorese

Ein elektrisches Feld (E) entlang der Achse einer Kapillare mit der Länge (L_{ges}) wird durch das Anlegen einer Potentialdifferenz (U) an die beiden Enden der Kapillare erzeugt.

$$E = \frac{U}{L_{ges}} \quad (31)$$

Das elektrische Feld übt auf die einzelnen Ionen in der Kapillare eine Beschleunigungskraft (F_B) aus, wobei (z) die effektive Ladung des Ions und (e) die Elementarladung ($e = 1,6 \cdot 10^{-19} C$) darstellen.

$$F_B = z \cdot e \cdot E \quad (32)$$

Die Ionen werden gebremst durch die Stokes'sche Reibungskraft (F_R), welche der Beschleunigungskraft entgegenwirkt. F_R ist proportional zur dynamischen Viskosität des Mediums (η), der Wanderungsgeschwindigkeit (u) und dem Stokes'schen Radius (r) des Ions, der auch die Solvatationshülle beinhaltet.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u \quad (33)$$

Im stationären Zustand herrscht Kräftegleichgewicht:

$$|F_B| = |F_R| \implies z \cdot e \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u \quad (34)$$

Somit ist die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (u) gegeben durch:

$$u = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (35)$$

Diese Geschwindigkeit (u) ist von den charakteristischen Größen des Ions, des Lösungsmittels und der elektrischen Feldstärke abhängig. Die Proportionalitätskonstante (μ) fasst die Eigenschaften eines Ladungsträgers im entsprechenden Puffermedium zusammen und wird als elektrophoretische Mobilität bezeichnet.

$$\mu = \frac{u}{E} = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (36)$$

Unterscheiden sich die Mobilitäten der Probenmoleküle, so wandern sie bei angelegter Spannung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Kapillare. Dadurch kommt es zur Trennung der einzelnen Substanzen. Gleichung 36 beschreibt die elektrophoretische Mobilität eines starren, kugelförmigen Ions, ohne diffuse Doppelschichten oder die sich um ein Ion anordnenden Gegenionen zu berücksichtigen. Deshalb wird die effektive Mobilität (μ_{eff}) experimentell bestimmt. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird berechnet aus der Migrationszeit (t_m) und der effektiven Kapillarlänge (L_{eff}), welche die Länge von

der Probenaufgabe bis zur Detektion darstellt. Das elektrische Feld wird mit Hilfe von Gleichung 31 ermittelt, so dass die effektive Mobilität folgendermaßen berechnet werden kann:

$$\mu_{eff} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{t_m \cdot U} \quad (37)$$

Die effektive Mobilität hängt außerdem stark vom pH-Wert und der Zusammensetzung des Puffers ab.

2.3.3.1. Elektroosmotischer Fluss

Der elektrophoretischen Wanderung ist immer ein mehr oder minder starker elektroosmotischer Fluss (EOF) überlagert, der aktiv zum Transport der Probenzonen, nicht aber zu ihrer Trennung beiträgt [68]. Es handelt sich dabei um einen Fluss der Pufferlösung als Folge der Oberflächenladung der Innenwand der Kapillare. Die Bildung und das Verhalten des EOF wird im einfachsten Fall bei einer unbeschichteten fused-silica-Kapillare durch die Sternsche Doppelschicht beschrieben. Die Oberflächenladung an der Kapillarwand bildet sich durch die pH-abhängige Dissoziation der Silanolgruppen und/oder durch Wandadsorption von ionischen Substanzen. Diese negativen Oberflächenladungen ziehen Kationen aus der Elektrolytlösung an. Dies führt zur Ausbildung der Sternschen Doppelschicht, welche sich in einer starren, nahe der Oberfläche befindlichen Schicht und einer beweglichen, weiter von der Oberfläche entfernten Schicht äußert. Abbildung 10 dient zur Veranschaulichung dieser Anordnung.

Liegt parallel zur Oberfläche ein elektrisches Feld an, so wandern die Kationen der mobilen Schicht mit ihren Hydrathüllen zur Kathode und transportieren so den gesamten Elektrophoresepuffer zu dieser Elektrode [69].

Da die treibende Kraft des elektroosmotischen Flusses einheitlich über die gesamte Kapillare verteilt ist, bildet sich ein extrem flaches, stempelförmiges Strömungsprofil aus, weshalb fast ausschließlich Longitudinaldiffusion möglich ist. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Bandenverbreiterung als bei hydrodynamischen Flüssen, wo das paraboloides Hagen-Poiseuille'sche-Strömungsprofil auftritt, welches zusätzlich noch stark vom Kapillarradius und der Strömungsgeschwindigkeit abhängig ist [70].

Die Wanderungsgeschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses (u_{eof}) wird nach der Smoluchowski-Gleichung von der Stärke des erzeugten elektrischen Feldes (E) und dessen elektroosmotischer Mobilität (μ_{eof}) beeinflusst. Für die Geschwindigkeit ergibt sich aus der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung [71]:

$$u_{eof} = \frac{\epsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot E \quad (38)$$

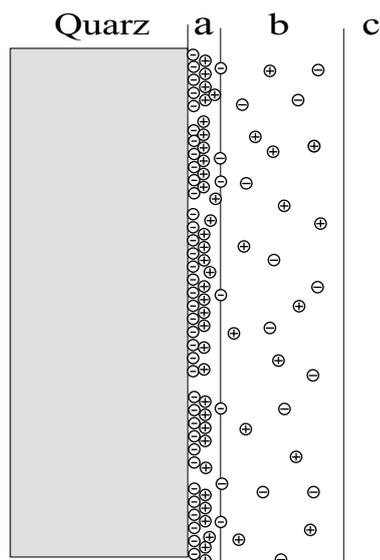


Abb. 10: Ladungsverteilung an der Kapillarinnenwand.

a: starre Grenzschicht mit adsorbierten Ionen; b: Stern-Grenzschicht (diffuse Grenzschicht); c: Elektrolyt.

Diese ist abhängig von der Viskosität des Elektrolyten, seiner Dielektrizitätskonstante (ϵ) und dem ζ -Potential („Zeta-Potential“). Das sich aufgrund der Ladungsverteilung an der Kapillarwand aufbauende Potential wird als ζ -Potential bezeichnet. Dieses ist abhängig von der Konzentration des Puffers. Eine hohe Ionenstärke bewirkt eine Abnahme des ζ -Potentials und damit eine Verlangsamung des EOF [72]. Eine Steigerung der Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Verwendung von Elektrolyten mit einem hohen pH-Wert, der eine verstärkte Dissoziation der Oberflächensilanolgruppen bewirkt, erreicht. Der Zusatz von organischen Komponenten vermindert gewöhnlich den elektroosmotischen Fluss. Dieser kann unterdrückt werden, indem die Analyse entweder im extrem sauren Milieu ($\text{pH} < 2$) oder mit Kapillaren, deren innere Oberfläche chemisch modifiziert ist, durchgeführt wird. Die Modifizierung der Kapillarwandoberfläche kann entweder durch kovalente Bindungen bestimmter Gruppen an die Silanolgruppen oder durch Zugabe von langkettigen Detergenzien erfolgen. Bei fused-silica-Kapillaren finden meist kationische Tenside Anwendung, wie z.B. Cetyltrimethylammoniumsalze. Abhängig von der Konzentration des positiv geladenen Zusatzes entsteht zunächst eine einfach adsorbierte Tensidschicht, die den Fluss des Leitmediums unterdrückt. Bei höheren Konzentrationen bildet sich eine Doppelschicht mit in Richtung des Elektrolyten gerichteten positiven Ladungen, welche sogar eine Umkehr des EOF bewirken [73].

Es ist kaum möglich den elektroosmotischen Fluss völlig auszuschalten [68]. Bei einer Quarzkapillare bewirkt er durch den Fluss zur Kathode eine erhöhte Wanderungsge-

schwindigkeit der Kationen, was zu kurzen Analysenzeiten führt. Neutrale Ionen werden ebenfalls zur Kathode transportiert, allerdings nicht getrennt. Anionen, deren Mobilität geringer ist als die des EOF, werden ebenfalls zur negativ geladenen Elektrode bewegt, weshalb in diesem Fall eine Simultanbestimmung von positiv und negativ geladenen Teilchen möglich ist. Dieses Verhalten ist in Abbildung 11 nochmals veranschaulicht.

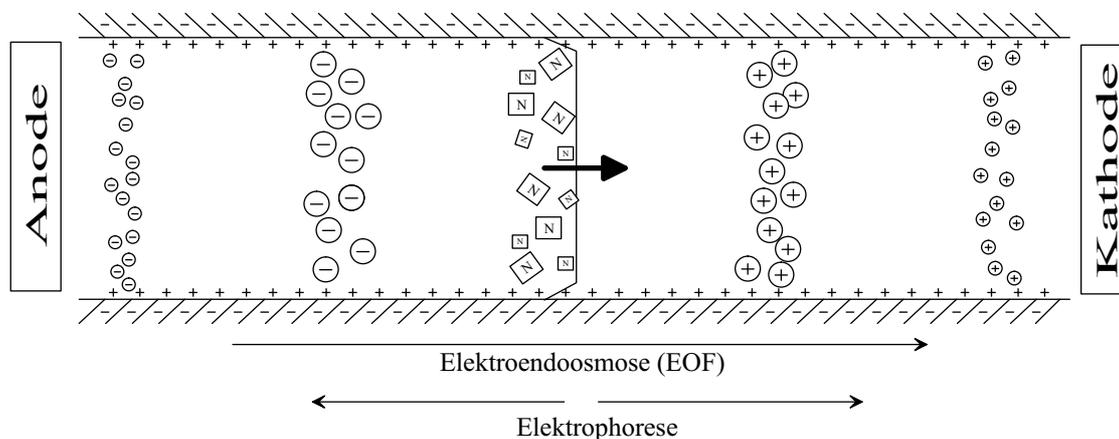


Abb. 11: elektroosmotische und elektrophoretische Wanderung.

Die Gesamtwanderungsgeschwindigkeit (u_{ges}) eines Ladungsträgers stellt die vektorielle Summe der effektiven und der elektroosmotischen Geschwindigkeit dar, welche mit Hilfe der Migrationszeit und der Länge der Kapillare (Puffergefäß bis Detektor) berechnet werden kann.

$$\vec{u}_{ges} = \vec{u}_{eff} + \vec{u}_{eof} = \frac{L_{eff}}{t_m} \quad (39)$$

Eine neutrale Probenkomponente bewegt sich nur aufgrund des elektroosmotischen Flusses durch die Kapillare. Anhand der Migrationszeit dieser ungeladenen Substanz kann auf die Bewegung des Leitmediums zurückgeschlossen werden. Die Migrationszeit eines geladenen Teilchens liefert dagegen dessen Gesamtwanderungsgeschwindigkeit.

Innerhalb des Leitelektrolyten bewegt sich die Analytsubstanz während der Migrationszeit (t_m) elektrophoretisch um die theoretisch angenommene Strecke:

$$L_e = \vec{u}_{eff} \cdot t_m \quad (40)$$

Aufgrund der Elektroendoosmose wird die virtuelle Strecke ($L_o = \vec{u}_{eof} \cdot t_m$) zurückgelegt. Durch Umformungen der vorangegangenen Gleichungen wird folgender Ausdruck erhalten:

$$L_e = L_{eff} - \vec{u}_{eof} \cdot t_m \quad (41)$$

Gleichung 41 zeigt, dass bei Comigration von Ion und EOF ($\vec{u}_{eof} = \vec{u}_{eff}$) nur in Ausnahmefällen, d.h. wenn der elektroosmotische Fluss nicht vorhanden ist ($u_{eof} = 0$), die gesamte Trennstrecke vom Puffergefäß bis zum Detektor elektrophoretisch genutzt wird. Bei Contramigration kommt es durch die Bewegung des Leitmediums theoretisch zu einer Verlängerung der Trennstrecke, praktisch äußert sich dies durch hohe Effizienz und lange Analysenzeit.

2.3.4. Trenntechniken der Kapillarelektrophorese

2.3.4.1. Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

In der Kapillarelektrophorese finden unterschiedliche Trenntechniken ihre Anwendung. Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE), auch freie Zonenelektrophorese genannt, ist die am häufigsten angewandte und einfachste Form der Kapillarelektrophorese. Zu den Anwendungsgebieten gehören die Analyse von Aminosäuren, Peptiden, anorganischen Ionen, Enantiomeren und die Reinheitsbestimmung von Proteinen [72]. Die Pufferkonzentration, der pH-Wert und die Feldstärke sind konstant über die gesamte Trennstrecke. Die Probensubstanzen wandern mit einer konstanten Geschwindigkeit durch die Kapillare und die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Mobilität der einzelnen Probensubstanzen. Es bilden sich diskrete Zonen aus, die durch Elektrolyt voneinander getrennt sind. Dieses Verfahren ist der Elutionschromatographie ähnlich [68]. Die gleichzeitige Trennung von Anionen und Kationen in einem Lauf ist mit Hilfe des elektroosmotischen Flusses (Kap. 2.3.3.1.) prinzipiell möglich.

2.3.4.2. Kapillargelelektrophorese (CGE)

Ionogene Makromoleküle, wie zum Beispiel DNA-Moleküle und mit Natriumdodecylsulfat denaturierte Proteine mit konstantem Masse-Ladungs-Verhältnis, können ohne zusätzliche Hilfsmittel in einem normalen elektrischen Feld nicht getrennt werden [72]. In solchen Fällen kommt die Kapillargelelektrophorese (CGE) zum Einsatz. Die Kapillare ist mit einer Polymerlösung oder einem Gel (z.B. Polyacrylamid mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad) gefüllt, welches einen Siebeffekt aufweist. Biopolymere unterscheiden sich auch bei konstantem Masse-Ladungs-Verhältnis meistens stark in ihrer Größe. Die voluminöseren Moleküle erfahren bei der Wanderung durch die Gelmatrix einen stärkeren Widerstand als die kleineren Moleküle. Die Trennung in der Kapillargelelektrophorese erfolgt neben dem Ladungs-Masse-Verhältnis auch durch den Siebeffekt des Gels nach der Molekülgröße. Wegen der kleinen Diffusionskoeffizienten der Makromoleküle in Gelen werden große Effizienzen erreicht.

2.3.4.3. Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Die methodischen Grundlagen der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) werden Mitte der 80er Jahre erarbeitet [74]. Sie stellt eine Mischung aus Elektrophorese und Chromatographie dar. Die MEKC besitzt besondere Bedeutung, da sie es ermöglicht, sowohl neutrale Moleküle als auch ionogene Verbindungen zu trennen. Mizellenbildner (Detergenzien, z.B. Natriumdodecylsulfat) werden dem Trennpuffer in Konzentrationen größer der kritischen Mizellarkonzentration zugesetzt. Die Mizellen sind nach außen hin geladen und bewegen sich deshalb im elektrischen Feld. Im Inneren besitzen sie hydrophoben Charakter. In der Regel wird so gearbeitet, dass der Betrag der elektroosmotischen Geschwindigkeit größer ist als die elektrophoretische Geschwindigkeit der Mizellen. Anionische Mizellenbildner besitzen eine elektrophoretische Mobilität in Richtung der Anode. Die Probensubstanzen verteilen sich aufgrund ihrer Hydrophobie zwischen den Mizellen und dem Puffer. Die ungeladenen Probenmoleküle wandern mit dem elektroosmotischen Fluss Richtung Kathode und werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in den Mizellen unterschiedlich lange zurückgehalten und dadurch getrennt. Das Trennprinzip ist mit der Verteilungschromatographie vergleichbar [71].

2.3.4.4. Isoelektrische Fokussierung (CIEF)

Die isoelektrische Fokussierung in Kapillaren (CIEF) wird für die Trennung von Zwitterionen und amphoteren Stoffen wie Proteinen und Peptiden aufgrund ihres isoelektrischen Punktes (pI-Wert) eingesetzt. Die Trennung von Proteinen, deren pI-Wert sich nur um 0,005 Einheiten unterscheidet, ist damit möglich [72]. Amphotere Stoffe tragen abhängig vom pH-Wert des Milieus, in dem sie sich befinden, unterschiedliche Nettoladungen. Am isoelektrischen Punkt tragen sie keine Ladung mehr und werden so im elektrischen Feld nicht mehr beschleunigt. Mit Hilfe von amphoteren Substanzen (häufig Aminocarbonsäuren), deren pI-Werte den gesamten gewünschten pH-Bereich beinhalten, wird ein pH-Gradient in der Kapillare erzeugt. Der Kathodenraum ist gefüllt mit einer basischen Lösung und der Anodenraum mit einer sauren Lösung. Durch die Wanderung der Protonen bzw. Hydroxidionen nach dem Anlegen der Spannung baut sich ein kontinuierlicher pH-Gradient durch die Anordnung der Ampholyten gemäß ihres pI-Wertes auf. Die Probenmoleküle wandern in der Trennsäule so lange, bis der pH-Wert ihrem pI-Wert entspricht und sie als neutrale Moleküle vorliegen. Diffundiert ein Probenmolekül über seinen pI-Wert hinaus, so erhält es durch die Abweichung des pH-Wertes von seinem pI-Wert eine Ladung. Diese bewirkt ein Zurücktreiben in die entgegengesetzte Richtung. Probensubstanzen werden somit in schmalen Banden fokussiert [75]. Eine hohe Effizienz ist das Ergebnis der isoelektrischen Fokussierung. Die Fokussierung ist beendet, wenn der Strom auf einen konstanten niedrigen Wert abgefallen ist. Durch Zugabe von Salzionen

in das detektorseitige Puffergefäß oder durch Erzeugung eines hydrodynamischen Flusses werden die Analytmoleküle mobilisiert und wandern am Detektor vorbei [76].

2.3.4.5. Isotachophorese (ITP)

Die älteste Kapillartechnik ist die Isotachophorese (ITP). Im Gegensatz zur CZE wird hier ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet. Die Probenionen befinden sich zwischen einem sog. Leitelektrolyten mit der größten und einem Folgeelektrolyten mit der niedrigsten elektrophoretischen Mobilität [75]. Es können jeweils nur Kationen oder Anionen analysiert werden. Bei der Trennung von beispielsweise Kationen mit nur einer Sorte Gegenionen in der Kapillarsäule reihen sich die Probenkationen im elektrischen Feld, bestimmt durch ihre Mobilität, zwischen den beiden Elektrolyten auf und wandern im stationären Fall mit der gleichen Geschwindigkeit durch die Kapillarsäule. Die konstante Wanderungsgeschwindigkeit entsteht durch die unterschiedliche Stärke des elektrischen Feldes in jeder Zone. Analytione mit kleinerer Mobilität füllen die hinter den schnelleren Elektrolytzone entstehende ionenverarmte Zone auf. Diese ionenverarmte Zone besitzt einen großen ohmschen Widerstand und bedingt dadurch eine große elektrische Feldstärke, welche zur Beschleunigung der langsameren Analytione führt. Die elektrische Feldstärke sinkt wieder, wenn die schnellsten der langsameren Ionen diese Zone erreicht haben. Die ITP führt zu einer Aufkonzentrierung verdünnter Proben, weshalb sie als Anreicherungsschritt vor einer CE-Trennung dienen kann. Bei der Verwendung eines Leitfähigkeitsdetektors wird ein Stufensignal erhalten, wobei die Gleichgewichtskonzentration bzw. die Signalintensität das qualitative und die Zonenlänge das quantitative Kriterium darstellt [77]. Nachteilig bei dieser Methode ist das Auffinden eines geeigneten Leit- und Folgeelektrolyten bei unbekanntem Probenzusammensetzungen und die Detektion der oft breiten Zonen.

2.3.5. Spezielle Anwendungen der Kapillarelektrophorese

2.3.5.1. Kapillarelektrophorese in der Bioanalytik

Das Hauptanwendungsgebiet der Kapillarelektrophorese liegt in der Trennung und Analyse von biologischen Proben. Ihre Wichtigkeit auf diesem Sektor kann durch die Vielzahl der betreffenden Publikationen in biochemischen und molekularbiologischen Journalen eingeschätzt werden. Sie ist zum einen die Methode der Wahl für biologische Proben, wie z.B. Aminosäuren, Nukleinsäuren, Peptide und Proteine, einschließlich viraler und subzellulärer Partikeln, da nur sehr kleine Probenmengen benötigt werden und die Empfindlichkeit im Picogramm-Bereich ($10^{-10} - 10^{-12}$ g) liegt. Es ist möglich Proben aus der Picoliter-Umgebung, wie beispielsweise Cytoplasma und einzelne Zellen (z.B. Nervenzellen) zu untersuchen [18]. Des Weiteren sind die meisten großen Moleküle von biolo-

gischem Interesse geladen und daher einer Trennung und Analyse mittels elektrophoretischer Methoden zugänglich. Der Nachweis erfolgt meist mittels UV-Detektion. Die leistungsfähigsten UV-Detektoren sind Diodenarraydetektoren. Sie gehören zur Gruppe der Vielkanal-Quantendetektoren. Diese bestehen aus einer Aneinanderreihung kleiner lichtempfindlicher Detektoren, die so angeordnet sind, dass alle Elemente eines Lichtstrahles, der von einem Gitter zerlegt worden ist, gleichzeitig gemessen werden können [38].

2.3.5.2. Kapillarelektrophorese mit Leitfähigkeitsdetektion

Seit einigen Jahren werden Versuche unternommen die Kapillarelektrophorese nicht nur zur Analyse von Biomolekülen, sondern unter anderem auch zur Trennung von anorganischen und organischen Ionen einzusetzen. Die Vorteile einer solchen Trennung des Analyten im elektrischen Feld sind dabei die Trennstufenzahl, die Handhabung, die kurzen Analysenzeiten, die geringen Betriebskosten, sowie die große Flexibilität der Methode bei der Trennung von Anionen und Kationen mit der gleichen Kapillare und der Einsatz bei schwieriger Probenmatrix. Ein Problem in diesem Zusammenhang stellt jedoch die Detektion mit spektrometrisch arbeitenden Detektoren wie UV/Vis und Fluoreszenz dar, da die weitaus meisten niedermolekularen Ionen nicht direkt detektiert werden können. Es wird deshalb auf das Verfahren der indirekten UV-Detektion zurückgegriffen, das aus der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bekannt ist. Dabei treten jedoch deutliche Nachteile dieser Detektionsmethode zu Tage, die es bisher verhindern, dass sich die kapillarelektrophoretische Ionenanalyse trotz ihrer Trennvorteile zu einer Alternative zur Ionenchromatographie entwickeln konnte [68, 78]. Die Lösung dieser Probleme kann wie in der Ionenchromatographie nur in der Verwendung eines Leitfähigkeitsdetektors liegen, mit dem es möglich sein sollte, die bekannten Vorteile der Kapillarelektrophorese mit denen der Leitfähigkeitsdetektion zu verbinden und eine Alternative nicht nur zur indirekten UV-Detektion, sondern auch zur Ionenchromatographie zu etablieren [79].

2.3.5.3. Elektrophorese von kleinen Anionen und Kationen mit indirekter UV-Detektion

Da die meisten kleinen Kationen und Anionen keine eigenen Chromophore zur direkten Detektion bei Wellenlängen oberhalb von 200 nm aufweisen, wird in der CE oft auf das Prinzip der indirekten UV-Detektion zurückgegriffen, um diese zwei Ionenklassen zu detektieren. Dem Puffer wird hierzu ein Elektrolyt mit UV-Absorption zugegeben, der ähnliche Mobilität wie die zu trennenden Proben besitzt. Er trägt die gleiche Ladung wie die Analytmoleküle und stellt daher für sie ein sogenanntes Co-Ion dar. Moleküle mit entgegengesetzter Ladung werden als Gegenionen bezeichnet. Die Probenmoleküle verdrängen wegen der erforderlichen Elektroneutralität die zugesetzten Co-Ionen, weshalb

an dieser Stelle der Puffer eine höhere Lichtdurchlässigkeit besitzt. Analytionen machen sich somit durch negative Peaks bemerkbar [80].

Der Hauptvorteil der indirekten Detektion ist die Möglichkeit eine große Anzahl von Analyten nachzuweisen, die durch direkte Methoden nicht zugänglich sind [20]. Sie weist jedoch einige Nachteile auf. Beispielsweise ist der lineare Messbereich nicht für alle Anwendungen ausreichend. Daneben ist die Empfindlichkeit relativ gering, da durch den Zusatz der chromophoren Substanz das Hintergrundrauschen höher wird. Zudem ist die Stabilität der Migrationszeiten vielfach unbefriedigend. Durch Konditionierungsschritte der Kapillare zwischen den einzelnen Analysen lässt sich die Reproduzierbarkeit zwar verbessern, jedoch bei Weitem nicht an beispielsweise die der Leitfähigkeitsdetektion heranführen. Ein weiterer Nachteil ist die relativ schwierige Auswahl des richtigen Trennelektrolyten. Die Mobilität des Chromophors und der Analyten sollten gleich sein, um die gewünschte Trennleistung und Nachweisempfindlichkeiten zu erreichen. Bei komplexen Proben ist dies kaum machbar, während es bei einfacheren immer mit einem Kompromiss zwischen der Auswahl des Chromophors und der Analyten verbunden ist [81].

Nur wenige Hintergrundelektrolyten sind für die Simultanbestimmung mit indirekter Detektion beschrieben [82–87]. Im Normalfall enthält der Elektrolyt sowohl ein UV-absorbierendes Kation für die positiven Probenkomponenten als auch ein UV-absorbierendes Anion zur Detektion der negativ geladenen Ladungsträger. Die elektrophoretische Mobilität der Additive und der Analytsubstanzen sollte bei dem verwendeten pH-Wert ungefähr übereinstimmen. Zusätzlich müssen die Chromophore eine gemeinsame Wellenlänge besitzen, bei der sie einen großen und die Probenkomponenten einen kleinen Extinktionskoeffizienten besitzen. Die Abstimmung der Elektrolytbestandteile ist daher in den meisten Fällen sehr schwierig.

Elektrolyte mit nur einem Chromophor bieten jedoch auch die Möglichkeit zum Einsatz in der Simultanbestimmung und vermeiden weitgehend die bei den dualen Hintergrundelektrolyten auftretenden Probleme. Neben dem Chromophor wird dazu ein entgegengesetzt geladenes Pufferion, das selbst keine Absorption aufweist, zugesetzt. In der Regel werden Elektrolyte, die nur einen UV-absorbierenden Chromophor enthalten, auch nur für eine Klasse von Analyten, d.h. Anionen oder Kationen, verwendet. Dieser Chromophor fungiert i.A. als Co-Ion. Bei der Verwendung in der Simultanbestimmung muss der Chromophor hingegen sowohl als Co- als auch als Gegenion im Hinblick auf die verschiedenen Analytklassen wirken. Als Folge ist in diesem Schema der Detektionsmechanismus zur Detektion nur einer Ionenart verschieden. Die Probenzonen mit gleicher Ladung wie der Chromophor weisen wie gehabt eine negative Absorption aufgrund der Verdrängung der UV-absorbierenden Substanz auf. Analytionen mit gleicher Ladung wie das Pufferion und entsprechend entgegengesetzter Ladung zum Chromophor führen zu einem negativen Signal, wenn deren Mobilität geringer ist als die des Pufferions und entsprechend zu einem

positiven Signal, wenn sie eine größere Mobilität aufweisen. Bei gleicher Mobilität wird kein Signal erhalten [86]. Die theoretische Vorhersage dieses Detektionsschemas wurde erstmals von Beckers [88] und Collet et al. [89] vorgestellt. Die praktische Anwendung für die Simultanbestimmung von Kationen und Anionen konnte vor kurzem von Lu et al. [90], Xiong et al. [87] und Raguénès et al. [86] gezeigt werden.

2.3.6. Bisherige Ansätze für Simultanentrennungen von Kat- und Anionen in der Kapillarelektrophorese

Die simultane Detektion und Trennung von kationischen und anionischen Analyten bietet den großen Vorteil, dass mehr Informationen über die Probenzusammensetzung mit nur einer einzigen Injektion erhalten werden. Da sich diese Ionenklassen im elektrischen Feld jedoch in unterschiedliche Richtungen bewegen, gestaltet sich deren synchrone Detektion als schwierig. Die bisherigen Versuche dieses Problem zu bewältigen ergeben vier Möglichkeiten:

- Simultantrennung durch starken EOF bei hohen pH-Werten,
- Simultantrennung durch Überlagerung eines hydrodynamischen Flusses,
- Simultantrennung durch beidseitige Injektion mit Detektion in der Mitte der Kapillare und
- Simultantrennung unter Verwendung einer „unterbrochenen“ Kapillare und zwei Detektoren.

Diese können dabei in zwei Kategorien im Hinblick auf die prinzipielle Betriebsweise eingeteilt werden. Bei der ersten erfolgt die Injektion an zwei Ende der Kapillare und die Detektion der getrennten Probenzonen mit einem Detektor in der Mitte bzw. mit zwei Detektoren an den anderen Enden der Kapillare [82, 83]. Die andere stellt den üblichen Modus mit Injektion an einem Ende der Kapillare und Detektion am anderen dar [84–87, 91]. Bei allen bisherigen Ansätzen kommen ausschließlich indirekte Fluoreszenz- bzw. UV-Methoden zum Einsatz. Im Folgenden werden die Methoden eingehender erläutert.

2.3.6.1. Simultantrennung durch starken EOF bei hohen pH-Werten

Bei dieser Methode wird durch eine Verstärkung des elektroosmotischen Flusses in fused-silica-Kapillaren bei hohen pH-Werten eine Comigration von Kationen und Anionen in Richtung des Detektors erzwungen. Vorteilhaft ist hierbei, dass dieses Prinzip für alle CE-Geräte ohne Modifizierung anwendbar ist und dass nur eine geringe Bandenverbreiterung auftritt. Probleme bereitet jedoch der hohe pH-Wert, der die Zusammenstellung

des Elektrolyten erschwert und limitiert [86]. Daneben entziehen sich trotz der extremen Bedingungen die schnellsten Anionen der Analyse, da ihre Migrationsgeschwindigkeit immer noch höher ist als die des entgegengesetzten EOF. Diese Methode ist daher eher für die Simultanentrennung von organischen Kationen und Anionen geeignet.

2.3.6.2. Simultanentrennung durch Überlagerung eines hydrodynamischen Flusses

Durch das Anlegen von Druck am Kapillareinlass wird ein hydrodynamischer Fluss erzeugt und somit alle Probenbestandteile durch den Detektor geführt. Es können hierbei alle interessierenden Analyten bestimmt werden und es sind auch keine Kompromisse bei der Wahl der Elektrolytkomponenten nötig, d.h. es ist kein bestimmter pH-Wert erforderlich. Allerdings erzeugt das paraboloides Flussprofil eine erhebliche Bandenverbreiterung und es sind auch nicht alle CE-Geräte für diese Methode geeignet.

2.3.6.3. Simultanentrennung durch beidseitige Injektion mit Detektion in der Mitte der Kapillare

Kuban und Karlberg erreichen eine simultane Trennung und Detektion von Kationen und Anionen durch eine Injektion an beiden Enden der Kapillare [83]. Die jeweiligen Analyten bewegen sich anschließend in entgegengesetzter Richtung auf den sich in der Mitte der Kapillare befindlichen Detektor zu. Auch hier können alle interessierenden Analyten bestimmt werden ohne Kompromisse bei der Wahl der Elektrolytkomponenten machen zu müssen. Des Weiteren tritt nur eine geringe zusätzliche Bandenverbreiterung auf. Jedoch ist auch diese Methode auf bestimmte CE-Geräte begrenzt und erfordert zur Optimierung eine variable Positionierung des Detektors.

2.3.6.4. Simultanentrennung unter Verwendung einer unterbrochenen Kapillare und zwei Detektoren

Bächmann et al. setzen im Prinzip zwei parallelgeschaltete CE-Systeme ein, wobei eines davon die Kationen, das andere die Anionen trennt [82]. Die Injektion erfolgt dabei quasi in der Mitte der Kapillare. Die Apparatur erfordert daher neben einem dritten Elektrolytgefäß auch zwei Detektoren. Die Aufzeichnung des Signals erfolgt demnach ebenso in zwei Elektropherogrammen. Obwohl diese Methode auf alle Analyten anwendbar ist und keine speziellen Elektrolyten erfordert, ist sie bislang nur in eigengebauten Geräten anwendbar.

2.4. Injektion in der Kapillarelektrophorese

An die Probenaufgabe werden bei der Kapillarelektrophorese hohe Anforderungen gestellt, da es sich beim Kapillarvolumen nur um wenige μL handelt und deshalb das System leicht überladen wird. Von entscheidender Bedeutung für die Auflösung und Effizienz ist die Injektionslänge [92], welche deutlich kleiner als die Zone sein sollte, die durch die Diffusion entsteht. Die Länge des mit Probe gefüllten Kapillarabschnitts wird Injektionslänge genannt. Diese entspricht dem Quotienten aus injiziertem Volumen und Innenquerschnitt der Kapillare ($L_{inj} = V_{inj} \cdot A^{-1}$). Als Faustregel kann gelten, dass die Injektionslänge weniger als 1 bis 2 % der Gesamtlänge der Kapillare betragen soll [68, 72]. Abhängig von der Länge und dem Innendurchmesser der Kapillare handelt es sich dabei um wenige Millimeter. Bei einer 500 mm Kapillare würde das eine maximale Injektionslänge von 10 mm bedeuten. Dies entspricht einem Volumen von 5 - 80 nL bei einem üblichen Kapillarinndurchmesser von 25 - 100 μm . Um die Nachweisgrenze zu verbessern, wird dabei eine Bandenverbreiterung akzeptiert. Neben der Peakverbreiterung durch zu große Injektionslängen führt eine Massenüberladung bei hohen Probenkonzentrationen zur Erhöhung der Bodenhöhe (H) [68].

2.4.1. Injektionsmethoden

Die Angabe der Probenmenge erfolgt häufig als eine Funktion der Zeit, während der die Probe eingeführt wird. Deshalb ist bei vielen Injektionsmethoden das absolute, aufgegebene Volumen nicht bekannt [20]. In frühen CE-Systemen wurde die Probe manuell injiziert und verursachte eine hohe Unpräzision. Mit der Einführung automatisierter Injektionssysteme wurde die Injektionswiederholbarkeit erheblich gesteigert [93, 94].

2.4.1.1. Hydrodynamische Injektion

Am häufigsten findet die Probenaufgabe mittels einer Druckdifferenz Anwendung. Diese wird auf drei verschiedene Arten erzeugt. Es besteht die Wahl zwischen dem Anlegen von Druck am Probengefäß oder der Erzeugung eines Unterdrucks am Puffergefäß. Die aufgegebene Probenmenge ist abhängig von den variablen Größen Druckdifferenz (Δp), Injektionszeit (t_I) sowie den festen Größen Innendurchmesser der Kapillare (d), Viskosität des Puffers (η) und der Gesamtlänge der Kapillare (L_{ges}), so dass das aufgegebene Volumen nach der Hagen-Poiseuille-Gleichung berechnet werden kann.

$$V_I = \frac{\Delta p \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t_I}{128 \cdot \eta \cdot L_{ges}} \quad (42)$$

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie zur notwendigen Spülung der Kapillare zwischen bzw. vor den Analysen mit Puffer- oder Konditionierungslösung (z.B. Natronlauge) die-

nen kann. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die geringe relative Standardabweichung von ca. 2 % und das Entfallen einer Diskriminierung der Probenkomponenten. Tatsächlich bereitet allerdings die Kompressibilität der Gase Probleme. Der Injektionsdruck im Puffergefäß wird nicht sprunghaft erreicht und fällt nicht schlagartig ab, weshalb mit einem Druck-Zeit-Integral gearbeitet wird. In der Praxis erfolgt die Bestimmung der eingeführten Probenmenge mittels einer Durchbruchmessung: Eine UV-aktive Lösung wird bis zum Detektor gesaugt. Das erhaltene Stufensignal, Viskositätsänderungen und ein möglicherweise ungleichmäßiger Kapillardurchmesser werden nicht berücksichtigt. Aus der Zeit, die benötigt wird, um die Kapillare bis zum Detektor zu füllen, und der Länge vom Einlass bis zum Detektor erfolgt die Berechnung des injizierten Volumens pro Zeit [68].

2.4.1.2. Hydrostatische Injektion

Eine weitere Möglichkeit zur Druckdifferenzerzeugung ist das Einsaugen der Probe durch den Siphoneffekt, welcher durch eine Höhendifferenz der beiden Puffergefäße erzeugt wird. Die aufgegebene Probenmenge ist abhängig von der Höhendifferenz (Δh , üblicherweise 50 – 100 mm) und der Zeit (t_I , 5 – 60 s). Mittels Erdbeschleunigung (g) und Dichte (ρ) des Puffers wird die Höhendifferenz in eine Druckdifferenz umgerechnet ($\Delta p = \rho \cdot g \cdot \Delta h$) und mit Gleichung 42 das eingeführte Volumen berechnet. Relative Standardabweichungen für Peakflächen zwischen 1,3 und 0,55 % sind bei Automatisierung erreichbar [95]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass eine positive Abweichung an eingebrachter Probenmenge auftritt, so dass ein Korrekturfaktor für die Injektionszeit notwendig wird [94, 95].

2.4.1.3. Elektrokinetische Injektion

Bei der elektrokinetischen Injektion wird das Probengefäß mit der Spannungsquelle verbunden und kurzzeitig Spannung angelegt, die 3- – 6-mal niedriger ist als die Spannung für die Trennung. Die Analyten gelangen aufgrund der elektrophoretischen Wanderung und des elektroosmotischen Flusses in die Kapillare. Somit ist die aufgegebene Probenmenge sowohl von der Höhe der angelegten Spannung (U_I) und der Zeit (t_I), in der die Spannung anliegt, als auch von der Mobilität μ_p der Ladungsträger abhängig. Diese führt zur Diskriminierung der geladenen Probenkomponenten, falls diese sich in ihrer Mobilität unterscheiden. Der folgende Ausdruck belegt diese Aussage:

$$Q = \frac{(\mu_p + \mu_{eof}) \cdot U_I \cdot \pi \cdot r^2 \cdot t_I \cdot c}{L_{ges}} \quad (43)$$

Q stellt die injizierte Menge [mol] und c die Analytkonzentration dar. Ionen, die gegen den elektroosmotischen Fluss wandern und deren Betrag der elektrophoretische Mobilität $|\mu_p|$

größer ist als μ_{eof} , werden nicht injiziert. Die Diskriminierung der Ladungsträger bringt sowohl Vorteile als auch Nachteile mit sich. Negativ ist die damit verbundene geringere Reproduzierbarkeit (rel. Standardabweichung $\sim 4\%$) und der Verlust der Quantifizierbarkeit. Zusätzlich machen sich Variationen der Leitfähigkeit der Probelösung bemerkbar. Bei hohen Widerständen des Analyten ist die Mobilität der verschiedenen Ionen entscheidend und es kommt zur Anreicherung der Probenkomponenten mit großer Beweglichkeit. Bei guter Leitfähigkeit der Probelösung und vorhandenem elektroosmotischem Fluss hingegen verliert die elektrophoretische Wanderung an Bedeutung und die Ionen werden hauptsächlich durch den Transport der Probelösung injiziert [68]. Positiv ist die Möglichkeit, besonders bewegliche Ionen anzureichern und damit die Nachweisgrenze zu verbessern. Darüber hinaus benötigt die elektrokinetische Injektion keine zusätzlichen Apparaturen und funktioniert selbst bei viskosen Medien oder Gelen.

2.4.1.4. Sonstige Injektionsmethoden

Die Verwendung eines Splits ist in Analogie zur Gaschromatographie auch bei der Kapillarelektrophorese denkbar. Eine Differenzierung in elektrische und hydrodynamische Splitsysteme ist möglich [68]. Die prinzipielle Bauweise eines elektrischen Probensplitters ist in Abbildung 12 zu sehen.

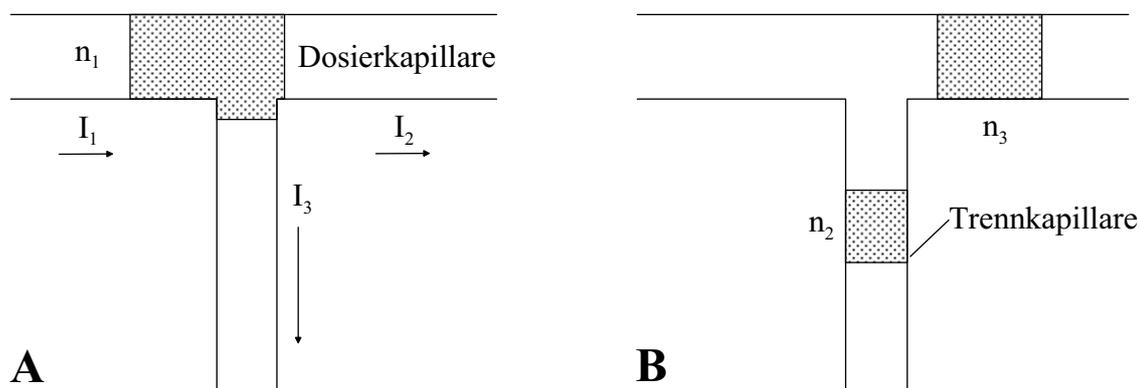


Abb. 12: Prinzip eines elektrischen Splitsystems [96].

A: während, B: nach Probensplit; $I_1 - I_3$: Ströme in den jeweiligen Kapillarteilstücken; n_1 : Probenmenge vor der Probenteilung; n_2 und n_3 : Restprobenmenge.

Der Strom (I_1) und entsprechend die aufgegebenen Probenmenge (n_1) teilt sich an der Verzweigung von Dosier- und Trennkapillare in den Strom (I_2) mit der Probenmenge (n_2) sowie den Strom (I_3) mit der letztendlich injizierten Probenmenge ($n_3, n_3 = n_1 - n_2$). Die Quantifizierung des Splitsystems erfolgt über das Verhältnis der beiden Ströme I_2 und I_1 , welches zu dem Quotienten n_2/n_1 direkt proportional ist. Somit können Bruchteile der aufgegebenen Probenmenge in die Trennkapillare eingeführt werden, wobei sich die

Zusammensetzung der Probenlösung nicht ändert. Die relative Standardabweichung ist $< 3\%$ [96].

Ein hydrodynamischer Probensplitter wird in einem Bericht von J. Tehrani beschrieben. Mittels HPLC-Spritze wird das Probenvolumen in ein T-Stück dosiert. Der Volumenanteil, der tatsächlich in die Trennkapillare injiziert wird, ist gegeben durch das Verhältnis von Durchmesser und Länge der Trennkapillare sowie einer Überlaufkapillare [97].

Bei integrierten Mikrokapillarelektrophoresesystemen auf Chip-Basis erfüllen weitere Injektionsmethoden ihren Zweck. Abbildung 13 zeigt eine Variante schematisch.

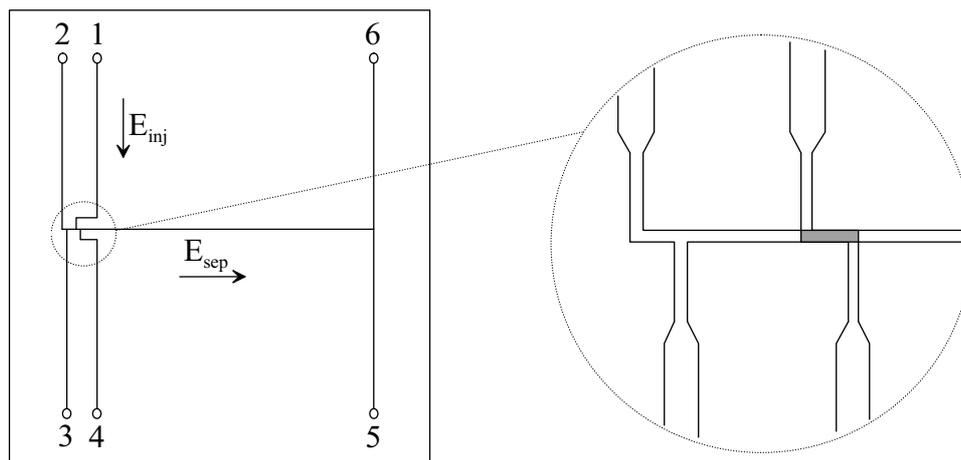


Abb. 13: Mikrokapillarelektrophorese mit integrierter Probeninjektion.

Sie besteht aus zwei nahe beieinanderliegenden T-Kreuzungen. Das Anlegen von Spannung zwischen dem Probengefäß 1 und dem Injektionsabfall 4 bewirkt eine elektrokinetische Wanderung der Probenlösung. Somit wird ein bestimmtes, geometrisch festgelegtes Volumen (z.B. 90 pL) des Trennkanals gefüllt. Liegt die Spannung so lange an, dass selbst die langsamsten Ionen den Injektionsraum vollständig ausfüllen, findet im Gegensatz zur elektrokinetischen Analyteinführung keine Diskriminierung der Probenkomponenten statt. Diese Picoliterinjektion wird ausschließlich über elektrische Felder gesteuert, ohne bewegliche Elemente zu benötigen. Die relative Standardabweichung der Peakhöhe liegt bei 2 % [98].

2.4.1.5. Sample Stacking

Um das Problem der oftmals geringen Detektionsempfindlichkeit bei kapillarelektrophoretischen Methoden zu bewältigen, sind eine Reihe von Probenaufgabetechniken entwickelt worden, die durch Fokussierungseffekte eine Verwendung von größeren Probenvolumina erlauben. Eine Übersicht über diese sogenannten Stacking-Techniken ist z.B. von N.A. Guzman und R.E. Majors zusammengestellt worden [99].

Mehrere Untersuchungen zeigen, dass Stacking-Techniken nützlich für die Quantifizierung sind [100–105]. Shihabi et al. beobachteten, dass Acetonitril und andere Stacking-Techniken indirekt die Präzision der Peakfläche und -höhe verbessern [100–102]. Mit steigender Peakfläche werden durch die Integration verursachte Fehler vermindert. Die richtige Wahl des Lösungsmittels hat einen erheblichen Einfluss auf die Präzision. Eine 10fache Verdünnung des Laufpuffers als Probenlösungsmittel hat sich oft als optimal herausgestellt [103, 104]. Die Injektionslösung ist nicht nur für den Erhalt von Stacking-Effekten wichtig, sondern auch für reproduzierbare Migrationszeiten und quantitative Ergebnisse durch Stabilisierung des elektrophoretischen Stroms [103].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Thomas et al. einen gegenteiligen Effekt des Stackings auf die Präzision beobachten. Sie berichten, dass Stacking-Techniken, die Unterschiede in der Ionenstärke zwischen Probe und Puffer ausnutzen, eine erhöhte Sensitivität jedoch auch eine verminderte Peakflächenpräzision liefern [106].

2.4.2. Einfluss der Probenaufgabe auf die Effizienz

Eine Injektionslänge, die länger ist als die durch die Diffusion ohnehin entstehende Zone, trägt entscheidend zur Bandenverbreiterung bei und wirkt sich somit auf die Effizienz eines CE-Systems aus. Ebenso wie in der HPLC gilt auch in der CE die Additivität der Varianzen der verschiedenen Einflüsse [107]. Die absolute, beobachtbare Varianz (σ_{tot}^2) ist demnach die Summe der bandenverbreiternden Einflüsse der Injektion (σ_{inj}^2) und der Detektion (σ_{det}^2), die als „extra-column-Varianzen“ bezeichnet werden und der Dispersion in der Kapillare (σ_{col}^2).

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{col}^2 + \sigma_{det}^2 \quad (44)$$

Die Dispersion in der Kapillare entsteht hauptsächlich durch Longitudinaldiffusion, Wandadsorption, Temperatureffekte und Mobilitätsdifferenzen von Proben- und Pufferionen. Eine 5- oder 10 %-ige Bandenverbreiterung infolge von „extra-column-Effekten“ beeinträchtigen die Effizienz und die Auflösung der Kapillare nicht stark [108]. Aus diesem Grund sind folgende Bedingungen tolerabel:

$$\sigma_{tot}^2 \leq (1,050 \cdot \sigma_{col})^2 = 1,103 \cdot \sigma_{col}^2, \quad (5 \% \text{ ige Bandenverbreiterung}) \quad (45)$$

$$\sigma_{tot}^2 \leq (1,100 \cdot \sigma_{col})^2 = 1,210 \cdot \sigma_{col}^2, \quad (10 \% \text{ ige Bandenverbreiterung}) \quad (46)$$

Wird die Bandenverbreiterung zu gleichen Teilen durch die Detektion und die Injektion verursacht, so bedeutet dies für die Varianz der Injektion: $\sigma_{inj}^2 \leq 0,051 \cdot \sigma_{col}^2$ bzw. $\sigma_{inj}^2 \leq 0,105 \cdot \sigma_{col}^2$. Bei einem rechteckigen Injektionsprofil gilt nach Sternberg [109]:

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{L_{inj}^2}{12} \quad (47)$$

Gleichung 47 beschreibt den Beitrag einer Pluginjektion zur Gesamtbodenhöhe, wobei L_{inj} die Injektionslänge darstellt. Diese Gleichung gestattet die Berechnung einer akzeptablen Injektionslänge für einen gegebenen Effizienzverlust. Durch Einsetzen in die Gleichungen 45 und 46 werden folgende Ausdrücke erhalten:

$$L_{inj} \leq 0,784 \cdot \sigma_{col} = 0,784 \cdot (H \cdot L_{eff})^{1/2}, \quad (5 \% \text{ige Bandenverbreiterung}) \quad (48)$$

$$L_{inj} \leq 1,122 \cdot \sigma_{col} = 1,122 \cdot (H \cdot L_{eff})^{1/2}, \quad (10 \% \text{ige Bandenverbreiterung}) \quad (49)$$

mit $\sigma_{col}^2 = H \cdot L_{eff}$ (H : Bodenhöhe, L_{eff} : Trennstrecke). Die Gleichungen gelten unter der Annahme einer plugförmigen Injektion.

Alternativ kann mit der Sternberg-Gleichung (Glg. 47) in Verbindung mit der Bodenhöhengleichung für die CZE (Glg. 50) [110] die Injektionslänge abgeschätzt werden (Glg. 51)

$$H = \frac{2 \cdot D}{u} \quad (50)$$

$$L_{inj} = (24 \cdot D \cdot E \cdot t)^{1/2} \quad (51)$$

Hierbei sind D der Diffusionskoeffizient, u die Migrationsgeschwindigkeit, t die Migrationszeit und E der akzeptable Anstieg von H relativ zum theoretischen Wert gemäß Gleichung 50 [92]. Diese Gleichung beinhaltet die Annahmen, dass der Probenplug eine echte δ -Funktion ist und dass die Dispersion in der Kapillare nur durch Diffusion verursacht wird. Für eine 5 %ige Bandenverbreiterung ist $E = 0,056$, für eine 10 %ige Bandenverbreiterung ist $E = 0,105$ wie o.a.. Die Definitionsgleichung für die Bodenzahl (Glg. 52) liefert den Zusammenhang mit effektiver Trennstrecke (L_{eff}), Migrationszeit (t_m) und dem Diffusionskoeffizienten (D).

$$N = \frac{L_{eff}^2}{2 \cdot D \cdot t_m} \quad (52)$$

Einsetzen von (52) in (51) führt zum Zusammenhang zwischen L_{inj} , L_{eff} und N . Da N gleich $L_{eff} \cdot H^{-1}$ ist, kann leicht nachvollzogen werden, dass das erhaltene Ergebnis mit den Gleichungen 48 und 49 identisch ist.

Mit den o.a. Gleichungen wird die maximale Injektionslänge in Abhängigkeit von der Bodenzahl und der effektiven Kapillarlänge für eine 5- bzw. 10 %ige Bandenverbreiterung

durch die Injektion berechnet. Das entsprechende Injektionsvolumen wird für Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 μm bzw. 75 μm ermittelt und in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tab. 3: maximal tolerierbare Injektionslängen und Volumina für eine 50- bzw. 75 μm -Kapillare bei 5- und 10 %-iger Bandenverbreiterung durch die Injektion.

Bodenzahl	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
L_{eff} [mm]	150	250	500	150	250	500	150	250	500
50 μm -Kapillare									
5 %ige Bandenverbreiterung									
L_{inj} [mm]	0,37	0,62	1,24	0,17	0,28	0,56	0,12	0,20	0,39
V_{inj} [nL]	0,73	1,22	2,44	0,33	0,55	1,09	0,23	0,39	0,77
10 %ige Bandenverbreiterung									
L_{inj} [mm]	0,53	0,89	1,77	0,24	0,40	0,79	0,17	0,28	0,56
V_{inj} [nL]	1,04	1,74	3,48	0,47	0,78	1,56	0,33	0,55	1,10
75 μm -Kapillare									
5 %ige Bandenverbreiterung									
L_{inj} [mm]	0,37	0,62	1,24	0,17	0,28	0,56	0,12	0,20	0,39
V_{inj} [nL]	1,65	2,75	5,49	0,74	1,23	2,46	0,52	0,87	1,74
10 %ige Bandenverbreiterung									
L_{inj} [mm]	0,53	0,89	1,77	0,24	0,40	0,79	0,17	0,28	0,56
V_{inj} [nL]	2,35	3,91	7,82	1,05	1,75	3,50	0,74	1,24	2,47

Die geringen Injektionsvolumina (0,23 – 7,82 nL) verdeutlichen die hohen Anforderungen an ein Probenaufgabesystem, wenn eine bestimmte Effizienz erreicht werden soll.

2.4.3. Probleme der Probenaufgabe im Nano- und Picoliterbereich

Die Probenaufgabe im Nano- und Picoliterbereich birgt zahlreiche Fehlerquellen. Im Folgenden sollen diese zusammengefasst und mögliche Lösungsansätze vorgestellt werden.

2.4.3.1. Siphoning

Durch den sog. Siphoneffekt kann es zu einer ungewollten Injektion von Probe bzw. zu einem laminaren Fluss innerhalb der Kapillare kommen. Die Ursache hierfür ist ein Druckunterschied entlang der Kapillare aufgrund:

- unterschiedlicher Höhe der Flüssigkeitslevel der Elektrolytgefäße,
- Tropfenbildung an den Kapillarenden während diese der Luft ausgesetzt sind [106].

Das Siphoning hat eine niedrige Präzision aufgrund sich ändernder Injektionsvolumina zur Folge. Es kann jedoch durch einige Maßnahmen unterdrückt werden.

- Es ist wichtig, dass die Flüssigkeitslevel der Elektroytlösungen auf gleicher Höhe liegen. Die Verwendung von unterschiedlichen Elektrolytgefäßen für die Konditionierung und Trennung ist empfehlenswert, um unterschiedliche Flüssigkeitslevel nach der Konditionierungsstufe zu vermeiden.
- Theoretische Überlegungen ergeben, dass das Siphoning durch lange Kapillaren mit kleinen Innendurchmessern oder durch gelgefüllte Kapillaren bzw. viskosen Elektrolyten unterdrückt werden kann [111]. Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von Restriktoren an den Enden von Kapillaren mit großem Innendurchmesser [112].
- Es wurde die Situation untersucht in der zum einen das Kapillarende in ein leeres Elektrolytgefäß und zum anderen in ein mit Laufpuffer gefülltes ragte. Obwohl keine Änderung der Injektionsvolumina beobachtbar waren, wird die Empfehlung zur Verwendung von gefüllten Vials am Kapillarende ausgesprochen [113].

2.4.3.2. Probenverschleppung

In der CE wird die Kapillare routinemäßig mit Wasch- und Equilibrierungslösung zwischen den Läufen gespült, wodurch adsorbierte Analyt- und Pufferkomponenten von der inneren Kapillarwand entfernt werden. Die Außenwand der Kapillare sowie die Elektrode können jedoch eine Probenverschleppung verursachen und Probe und Pufferlösung verunreinigen. Zur Vermeidung dessen werden einige einfache Vorschläge gemacht:

- Die Entfernung des Coatings an der Spitze der Kapillare reduziert die Menge an anhaftender Proben- und Pufferflüssigkeit [114].
- Das Kapillarende am Probeneinlass sollte vor der Injektion in ein mit Wasser gefülltes Vial getaucht werden. Zudem kann nach der Probeninjektion eine geringe Wassermenge injiziert werden [115].
- Die Außenseite des Kapillareinlasses und die Elektrode sollten nach jeder Injektion gewaschen werden. Die Restmenge an Probe kann durch Eintauchen in ein Vial mit frischem Puffer entfernt werden [116]. Diese Prozedur verhindert eine Kontamination des Probenpuffer auf Injektionsseite.
- Häufiges Erneuern der Elektrolyt-, Wasch- und Equilibrierlösungen beseitigt die Quellen der Probenverschleppung.

2.4.3.3. Probenverlust

Ein Mechanismus, der für Probenverlust verantwortlich ist, ist die thermische Expansion des Puffers und folglich Probenausstoß aus der Kapillare. Rasches Anlegen der

Trennungsspannung zu Beginn der Analyse kann zur schnellen Erhitzung des Puffers und in Folge zu o.a. Mechanismus führen [117]. Daher wird die Probeninjektion bei niedriger oder ohne angelegte Spannung durchgeführt [118]. Mathematische Untersuchungen ergeben einen maximal erlaubten Spannungsanstieg von $900 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ für ein typisches CZE-Experiment [117]. Es ist üblich die gewünschte Spannung von 20 bis 30 kV innerhalb der ersten 30 s der Trennung aufzubauen. Eine Co-Injektion von Laufpuffer verhindert ebenfalls einen Probenverlust aufgrund Expansion durch Spannungsanlegen [103, 113]. Ein weiterer Ansatz Probenverlust zu minimieren ist Elektrostacking in Luft wie von Sjögren und Dasgupta beschrieben [119]. Bei dieser Technik wird das elektrische Feld angelegt, noch während die Kapillare von einem Vial zum anderen transportiert wird. Daher ist eine Eliminierung von Problemen durch Diffusionsprozesse während der Injektion möglich, was in einer verbesserten Präzision und Bandensymmetrie resultiert.

2.4.3.4. Ubiquitäre Injektion

Abgesehen von den o.a. Effekten existieren zahlreiche weitere ungewollte Ereignisse, die während der Probenaufgabe und der Elektrophorese auftreten. Grund hierfür ist zum einen, dass beim Verlassen und Eintreten der Kapillarenden in die verschiedenen Lösungen Grenzflächen zwischen unterschiedlichen Phasen erzeugt werden.

- Beim Übergang von Vial zu Vial ist das Kapillarende der Luft ausgesetzt. An der Grenzfläche Luft – Flüssigkeit können dabei Ereignisse wie Tropfenbildung, Siphoning, Verdunstung und ein Probenfluss zur Kapillaraußenseite hin auftreten [106].
- Wenn die Kapillare eine Lösung verlässt oder in sie eintritt, entsteht ein Schock, der zu Phänomenen wie Siphoning oder Diffusion führt.

Ein Phänomen, das v.a. bei kurzen Injektionszeiten die Präzision ernsthaft beeinflusst, wird als ubiquitäre oder spontane Injektion bezeichnet. Rose und Jorgenson konnten einen positiven Achsenabschnitt beim Auftragen der Peakfläche gegen das Injektionsvolumen beobachten, d.h. die Peakfläche ohne beabsichtigte Injektion ist größer Null. Als Erklärung hierfür werden Diffusion des Analyten in die Kapillare und Siphoning angeführt [94]. Grushka and McCormick zeigen, dass eine Farblösung etwa $700 \mu\text{m}$ in die Kapillare eintritt. Die ubiquitäre Injektion überlagert die konventionelle Injektion [92]. Dose und Guiochon präsentieren Computersimulationen, die die Natur von quantitativen Fehlern bei der spontanen Injektion illustriert [111, 120]. Nettodiffusion an der Zonengrenze zwischen den Lösungen in der Kapillare und des Vorratsgefäßes könnte die Erklärung für die ubiquitäre Injektion sein. Wann immer sich die Analytkonzentration in der Injektionszone von der in der Elektrolytlösung, mit der sie in Kontakt steht, unterscheidet, finden Diffusionsvorgänge statt. Die Diffusion hängt von der Probenspezies ab, so dass sie selbst

bei Verwendung eines internen Standards zu Unsicherheiten in der Quantifizierung führt. Diffusionsprozesse können durch die Verwendung von langen, engen oder gelgefüllten Kapillaren und Elektrolyten mit erhöhter Viskosität unterdrückt werden [111]. Darüberhinaus sollte die Zeit (= Verzögerungszeit), die das Kapillarende der Luft ausgesetzt ist, kurz und reproduzierbar sein [121]. Daher sollten die Reservoir-Vials schnell gewechselt und das Potential so schnell wie möglich angelegt werden [111].

Fishman et al. erklären die ubiquitäre Injektion als spontane Flüssigkeitsverdrängung. Wenn die Kapillare die Probenlösung verlässt, formt sich die Lösung zu einem Tropfen, der am Ende der Kapillare anhaftet. Aufgrund einer Druckdifferenz zwischen den Phasen gelangt der gesamte Tropfen spontan in die Kapillare [121, 122]. Sie schlagen mehrere Wege zur Reduzierung der spontanen Injektion vor:

- Modifizierung der Oberflächenrauheit kann die Form und Menge des Tropfens am Kapillareinlass kontrollieren;
- eine ebene Fläche des Kapillarendes stellt eine reproduzierbare Morphologie der Kapillarwand am Einlass sicher;
- die Geschwindigkeit, mit der die Kapillare die Probenlösung verlässt, kann die Tropfenbildung beeinflussen;
- die Probenmenge, die am Kapillarende anhaftet, kann durch Entfernung der Polyimidschicht und durch Verminderung des Kapillaraußendurchmessers reduziert werden, z.B. durch Verwendung von dünnwandigen oder mit Flußsäure geätzten Kapillaren;
- Vibrationen von Pumpen und anderen Einflüssen beeinflusst die Form des Injektionstropfen. Daher sollte das Gerät von externen Vibrationsquellen isoliert werden [122].

Diffusion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll ermittelt werden, welche Probenmenge allein durch Diffusion während des Injektionsprozesses in die Kapillare gelangt. Dazu wird angenommen, dass die Kapillare in die Probe geführt wird und für eine gewisse Zeit in der Probenlösung verbleibt ohne dass eine anderweitige Injektion erfolgt. Zur einfachen Abschätzung der eindiffundierenden Stoffmenge wird die quadratisch gemittelte Entfernung, die ein diffundierendes Teilchen in der Zeit (t) zurücklegt, herangezogen. Diese aus der Diffusionswahrscheinlichkeit erhaltene Gleichung lautet [123]:

$$\langle x^2 \rangle^{1/2} = (2 \cdot D \cdot t)^{1/2} \quad (53)$$

Es kann so die Länge der eindiffundierenden Probenmenge abgeschätzt werden. Störungen an den Kapillarwänden bleiben unberücksichtigt. Für den Diffusionskoeffizienten wird ein Wert von $D = 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ verwendet. Abbildung 14 zeigt die durch Diffusion zurückgelegte quadratisch gemittelte Wegstrecke in Abhängigkeit der Zeit (t). Es handelt sich um eine Wurzelfunktion, die zu Beginn steil ansteigt und mit zunehmender Zeit abflacht.

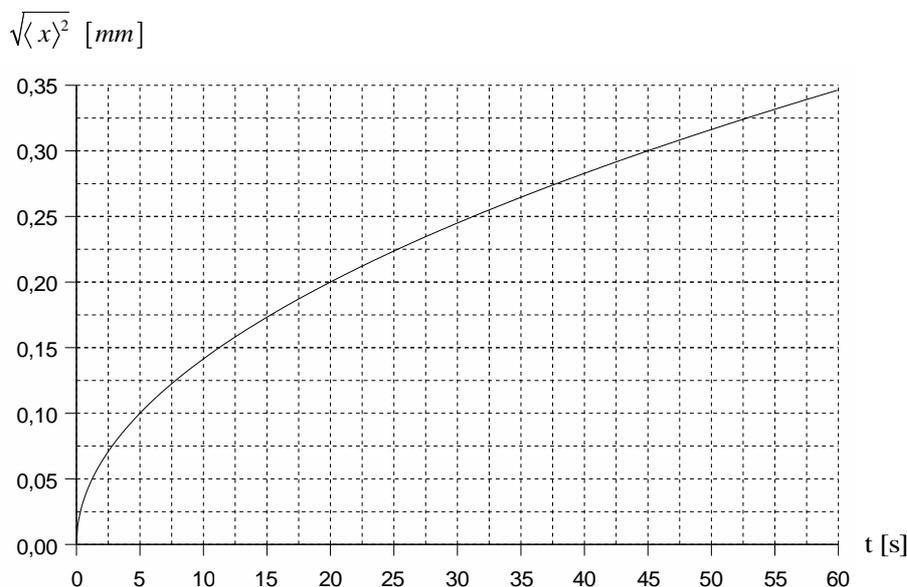


Abb. 14: quadratisch gemittelte Entfernung in Abhängigkeit der Zeit.

Bei einer Wartezeit von z.B. 30 s berechnet sich die Wegstrecke zu 0,25 mm, bei 60 s zu 0,35 mm. Wird stark vereinfachend angenommen, dass es sich bei der eindiffundierenden Probenmenge um einen Plug handelt, zeigt ein Vergleich mit Tabelle 3, dass diese Menge nicht vernachlässigt werden kann. Besonders bei kurzen Kapillaren liegen die o.a. Werte bereits im Bereich der akzeptablen Injektionslänge.

2.5. Anforderungsprofil für das neue Injektionssystem

Aufgrund der Neuartigkeit des Systems zur Injektion und Flusssteuerung müssen zunächst Kriterien entwickelt werden, die zur Charakterisierung der zu verwendenden Komponenten geeignet sind. D.h. es wird ein Anforderungsprofil benötigt, anhand dessen ein Aktor, ein Element, das dessen lineare Bewegung in ein Volumen umsetzt, und eine dafür zugeschnittene Steuerung dimensioniert werden können.

Im Folgenden wird eine Vorgabe für die aufzulösenden Volumina aufgestellt. Die dazu zunächst willkürlich festgelegten Werte für die Anzahl der Substanzen und Messpunkte pro Längeneinheit werden sehr hoch gewählt, um Spielraum für die späteren Analysen

mit einzuplanen. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird diese Vorgabe aufgegriffen und deren Erfüllbarkeit geprüft.

Vorbetrachtung

Anhand einfacher geometrischer Berechnungen ergeben sich folgende Verhältnisse für eine 50- bzw. 75 μm -Kapillare.

- Volumen einer 50 μm -Kapillare: $1,96 \text{ nL}\cdot\text{mm}^{-1} = 1,96 \mu\text{L}\cdot\text{m}^{-1}$
- Volumen einer 75 μm -Kapillare: $4,42 \text{ nL}\cdot\text{mm}^{-1} = 4,42 \mu\text{L}\cdot\text{m}^{-1}$

Vorgabe

Es werden Kapillarstücke mit einer Länge von 100 mm und Durchmessern von 50 μm bzw. 75 μm angenommen. Darin sollen 100 Substanzen mit je 100 Messpunkten erfasst werden. D.h. es werden 10.000 Messpunkte je 100 mm bzw. 100 Messpunkte $\cdot\text{mm}^{-1}$ benötigt. Mit o.a. Volumina folgt:

erforderliche Auflösung für 50 μm -Kapillaren: 20 pL,

erforderliche Auflösung für 75 μm -Kapillaren: 44 pL.

Die zu entwickelnde Flusssteuerung sollte in der Lage sein die Volumina mit vorgegebener Genauigkeit auflösen zu können. Ein tolerierbarer Fehler sollte dabei unter 1 Prozent liegen.

Für die Erzeugung der Volumina sind hierzu 3 Faktoren zu berücksichtigen:

- das Auflösungsvermögen der elektronischen Steuerung
- und damit verbunden der (minimal mögliche) Stellweg des Aktors,
- sowie die Kolbenfläche des „Volumenelements“.

Der Gesamtfehler ergibt sich aus der Summe der drei Einzelfehler.

2.6. Nanopositionierung

Das zu entwickelnde Probenaufgabesystem für die Kapillarelektrophorese benötigt ein Stellelement, das eine Bewegung erzeugen kann (Aktor). Flüssigkeiten im Nanoliter- und Subnanoliterbereich müssen dabei in eine Kapillare injiziert werden. Es stehen eine Reihe von miniaturisierten, konventionellen und mikromaschinellen Aktoren zur Verfügung. Ihre Eigenschaften sind in Tabelle 4 aufgelistet [124].

Ein piezoelektrisches Stellglied besitzt neben einer schnellen Ansprechzeit und einer guten Zuverlässigkeit vor allem den Vorteil, selbst bei hohen Drücken kleine Stellwege zu

Tab. 4: Eigenschaften einiger Mikro-Aktoren.

Aktor	Druck	Hub	Ansprechzeit	Zuverlässigkeit
Miniaturisiert				
Elektromagnetisch mit Tauchspule	klein	groß	mittel	gut
Shape-Memory-Legierung mit Vorspannfeder	groß	groß	langsam	nicht ausreichend
Piezoelektrisch:				
Scheibentranslator	klein	mittel	schnell	gut
Stapeltranslator	sehr groß	sehr klein	schnell	gut
Pneumatisch	groß	groß	langsam	gut
Mikromaschinell				
Elektrostatisch	klein	sehr klein	sehr schnell	sehr gut
Thermopneumatisch	groß	mittel	mittel	gut
Elektromagnetisch	klein	groß	schnell	gut
Bimetalle	groß	klein	mittel	ausreichend

erzeugen. Aus den genannten Gründen und wegen der einfachen Handhabbarkeit werden u.a. piezoelektrisch angetriebene Positioniersysteme (Aktoren) gewählt. Piezo-Aktoren werden vielseitig als Stellglieder für den Nanometerbereich eingesetzt [125]:

- Optik, Photonik und Messtechnik;
- Disk-Drive;
- Mikroelektronik;
- Präzisionsmechanik und Maschinenbau;
- Medizin, Biologie.

Nanopositioniersysteme bieten Subnanometer-Auflösung und die höchste Genauigkeit, die sich mit mechanischen Stellelementen erreichen lässt [125]. Aufgrund des hohen Preises von Stellgliedern auf Piezo-Basis soll daneben untersucht werden, ob kostengünstigere Alternativen für sogenannte low-cost-Geräte einsetzbar sind. Hierbei kämen z.B. (Schritt)Motoren mit Gewindestange in Frage, wie sie bereits häufig in Verbindung mit Mikroliterspritzen als Spritzenpumpen verwendet werden. Seit kurzem sind dabei auch hochauflösende motorgetriebene Aktoren erhältlich, die Nanometerauflösung bei vergleichsweise langen maximalen Stellwegen versprechen. Aufgrund des Vorteils der hohen Auflösung bei großem Stellweg sollen solche Motorsysteme in die Untersuchungen eingebunden werden.

2.6.1. Grundlagen der Piezoelektrizität

Der direkte piezoelektrische Effekt (PE) wird von den Brüdern Pierre und Jacques Curie im Jahre 1880 entdeckt. Dabei wird die mechanische Deformation eines piezoelektrischen Körpers von einer zu ihr proportionalen Änderung der elektrischen Polarisierung begleitet. Der reziproke piezoelektrische Effekt, auch indirekter PE genannt, wandelt elektrische Energie in mechanische Energie um. Voraussetzung für den Piezoeffekt ist ein unsymmetrischer Kristallaufbau (kein Symmetriezentrum im Kristall) [126].

Oberhalb einer bestimmten Temperatur bestehen die entsprechenden Materialien aus einem einfachen kubischen Gitter, wobei die negativen und positiven Ladungen zusammenfallen und somit keine Dipole vorhanden sind. Unterhalb dieser sogenannten Curie-Temperatur weisen die Elementarzellen eine tetragonale, nicht völlig symmetrische Struktur auf und bilden somit einen elektrischen Dipol. Durch die gegenseitige Beeinflussung der Dipole bilden sich spontan Bereiche einheitlicher Dipolausrichtung, sogenannte Weiss'sche Bezirke oder Domänen. Aufgrund der statistischen Verteilung der Domänen in einem makroskopischen Körper heben sich die Ladungen der individuellen Dipolmomente gegenseitig auf, so dass keine Polarisierung und auch kein piezoelektrischer Effekt auftritt [127].

Am Ende des Herstellungsprozesses liegt das Material mit regellos angeordneten Dipolen vor, was schematisch in Abbildung 15a dargestellt ist. Nach dem Aufbringen der Elektroden wird durch das Anlegen einer hohen elektrischen Spannung (etwas unterhalb der Curie-Temperatur) der makroskopische Körper polarisiert. Die Polarisierung ist in Abbildung 15b zu sehen. Die Ausrichtung ist mit einer bleibenden Längenänderung verbunden. Nach der Polarisierung behalten die Dipolmomente des piezoelektrischen Körpers ihre Richtung ungefähr bei (Abb. 15c).

Wird an einem piezoelektrischen Körper eine Spannung gleicher Polarität wie die Spannung beim Polarisieren angelegt, so wird der Körper weiter verlängert. Die Änderung der Abmessungen wird (zur Verdeutlichung übertrieben) in Abbildung 16 dargestellt. Im entgegengesetzten Fall findet eine Verkürzung der Piezokeramik statt [128].

Die Piezoelektrizität tritt stets in einem Kristall mit einer oder mehreren polaren Achsen auf. Ferroelektrische Körper sind auch immer piezoelektrisch, besitzen allerdings nur eine polare Achse, und die spontane Polarisierung kann durch das Anlegen einer elektrischen Spannung umgekehrt werden. Seit den 50iger Jahren gewinnt die ferroelektrische Keramik $\text{Pb}(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$ (PZT) immer mehr an Bedeutung. Sie besitzt einen extrem großen PE und wird heutzutage bei den meisten piezoelektrischen Anwendungen eingesetzt [129].

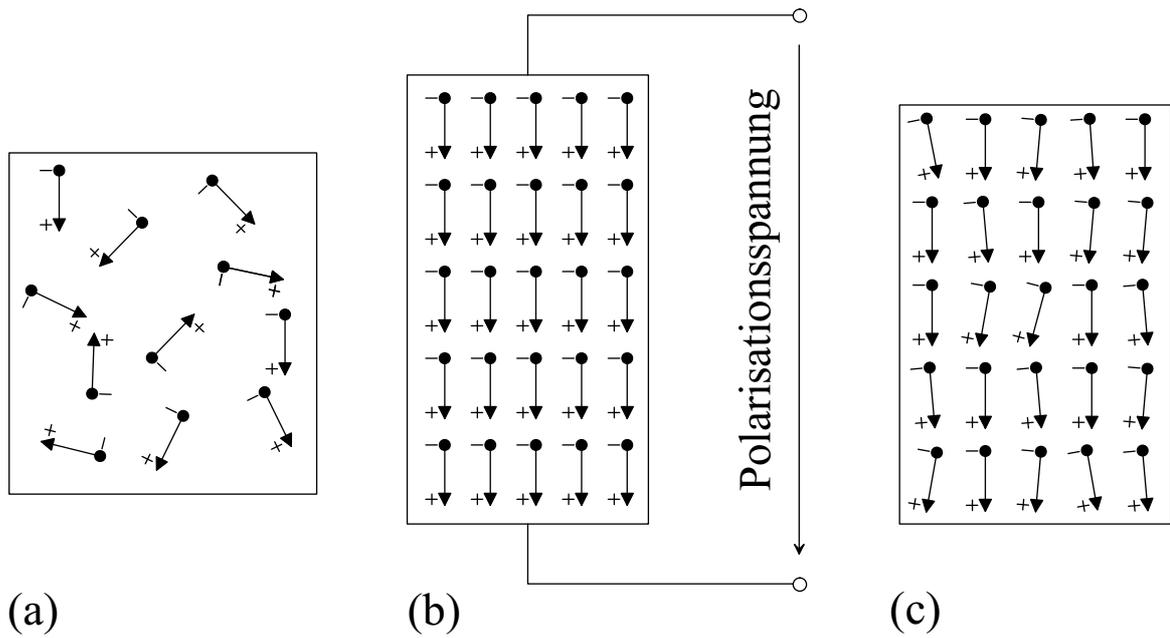


Abb. 15: elektrische Dipolmomente in den Weiss'schen Bezirken.
 (a) vor, (b) während und (c) nach der Polarisierung.

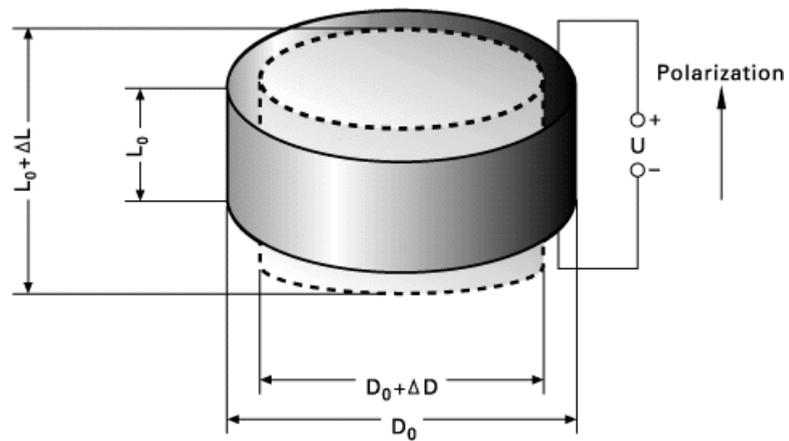


Abb. 16: Ausdehnung und Kontraktion einer Piezokeramikscheibe, wenn eine Spannung angelegt wird.

2.6.2. Aufbau und Vorteile von Piezo-Nanopositioniersystemen

Piezelektrische Aktoren sind keramische Stellglieder, die elektrische Energie in mechanische Energie umwandeln. Sie können Bewegungen im Subnanometer-Bereich mit großer Geschwindigkeit und höchster Genauigkeit durchführen oder Lasten bis zu mehreren Tonnen bewegen. Gegenüber anderen Positionierelementen wirken Piezo-Aktoren elektrisch wie kapazitive Lasten und benötigen praktisch keine Leistung im statischen Betrieb. Zusätzlich sind sie wartungsfrei, da sie keine beweglichen Teile im klassischen Sinn besitzen [130].

Aufgrund ihres großen piezelektrischen Effekts werden heutzutage meistens Blei-Zirkonat-Titanat-Keramiken (PZT) als Piezo-Aktoren verwendet. Sie erreichen eine Dehnung von ca. 0,1 - 0,15 % bei einer zulässigen Feldstärke von 1 bis 2 $\text{kV}\cdot\text{mm}^{-1}$. Da zum Erreichen vertretbarer Aktorwege sehr hohe Spannungen angelegt werden müssten, werden viele kleine Wege in einem Aktorenstapel addiert, wodurch die benötigte Feldstärke handhabbar wird. Stellglieder, die aus dünnen Keramiklagen bestehen, welche elektrisch parallel geschaltet sind, werden als Stapeltranslatoren bezeichnet. Ein Translator ist ein Aktor, der eine Linearbewegung erzeugt. In der Nanopositionierung finden Stapeltranslatoren häufig Anwendung [125]. Ihr elektrischer Aufbau ist in Abbildung 17 gezeigt.

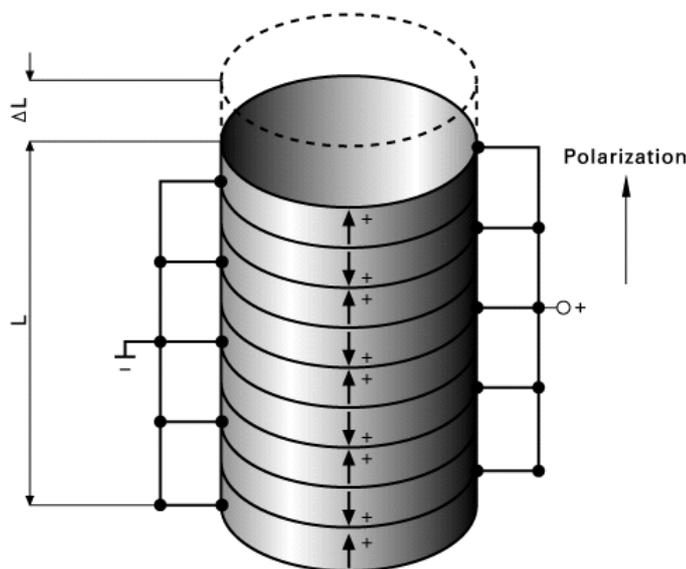


Abb. 17: elektrischer Aufbau eines Piezo-Stapeltranslators.

Theoretisch ist die Auflösung eines Piezo-Aktors unbegrenzt, da er reibungsfrei arbeitet und die Bewegung auf kristallinen Festkörpereffekten beruht. Praktisch wird die Auflösung durch mechanische (Konstruktion und Montagepräzision von Sensoren, mikroskopische Reibung durch mechanische Vorspannung) und elektrische (Verstärker, Sensor- und

Regelelektronik) Parameter begrenzt. Trotzdem wird eine Subnanometer-Auflösung mit piezoelektrischen Stellgliedern erreicht.

Um die Abmessungen des Stapel-Aktors klein zu halten und den Strombedarf zu reduzieren, werden die Stellwege eines Piezo-Positioniersystems häufig durch die Integration einer Hebelübersetzung vervielfacht. Kugel- und Rollenlager scheidet aus, da das Hebel- und Führungssystem extrem steif, reibungsfrei und spielfrei sein muss. Festkörperführungen erweisen sich als brauchbar. Besondere Aufmerksamkeit bedarf die Ankopplung des Hebels an den Piezo-Aktor, die einerseits sehr steif in Druckrichtung sein, andererseits zerstörende Kräfte von der Keramik fernhalten muss.

Um extrem geradlinige Bewegungen in einer oder mehreren Achsen zu realisieren, stehen integrierte passive oder aktive Federführungen zu Verfügung. Auf der elastischen Deformation eines Festkörpers basierend, ist eine Federführung ein haft- und gleitreibungsfreies Element, welches völlig ohne rollende oder gleitende Teile auskommt. Eine Parallelogramm-Federführung, welche in Abbildung 18 gezeigt ist, ermöglicht eine Führungsgenauigkeit im nm-Bereich oder darunter.

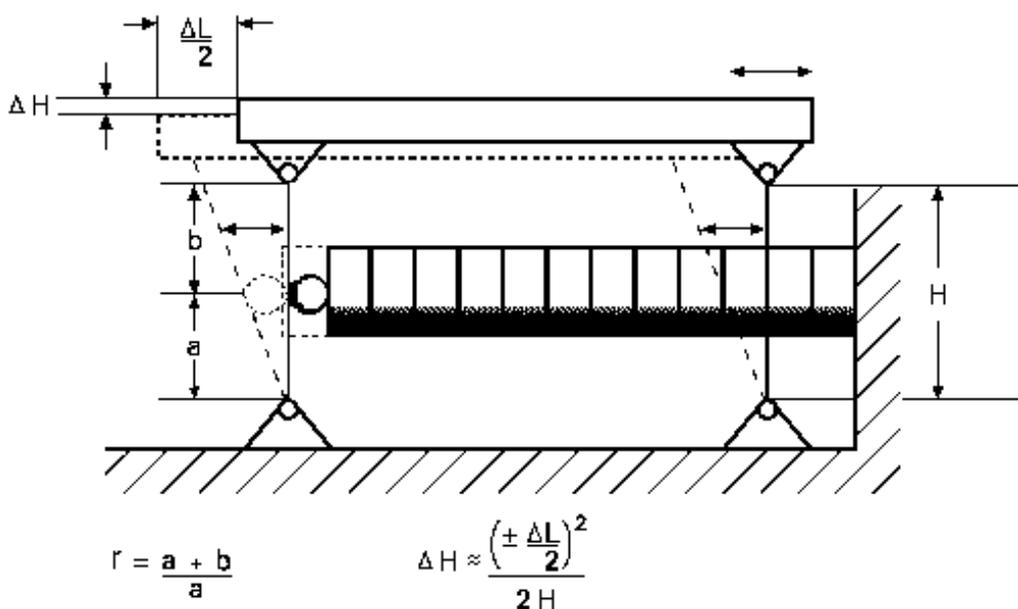


Abb. 18: Parallelogramm-Führungssystem mit Hebelübersetzung.

r: Übersetzungsverhältnis, ΔH : Querversatz.

Die Drehbewegung des Parallelogramms führt jedoch zu einem geringen Querversatz, so dass geradlinige Bewegungen im μrad -Bereich durch aktive Führungen realisiert werden. Bei Piezo-Aktoren, die im offenen Regelkreis betrieben werden, treten Ungenauigkeiten wie Hysterese, Nichtlinearität und Kriechen (Kap. 2.6.3.) auf. Durch die Verwendung eines Positionssensors im geschlossenen Regelkreis werden diese Fehlermöglichkeiten kompensiert und eine Subnanometer-Auflösung tatsächlich erreicht.

2.6.3. Ungenauigkeiten unregelter Piezo-Aktoren

Die Hystereseschleife ist eines der wichtigsten Kennzeichen der Ferroelektrika. Ein ferroelektrischer Kristall (z.B. $\text{Pb}(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$) ist ein piezoelektrischer Kristall mit umklappbarer Polarisation und einer polaren Achse [126]. Die resultierende Längenänderung der Keramik ist in diesem Fall von der elektrischen Vergangenheit abhängig. Wird das elektrische Feld erhöht und anschließend wieder auf den ursprünglichen Wert gebracht, so sind die aufsteigende und die absteigende Kurve der absoluten Auslenkung des Piezo-Aktors nicht identisch. Diese Erscheinung (Hysterese) ist in Abbildung 19 dargestellt und wird mit kristallinen Polarisations-effekten sowie molekularer Reibung begründet. Die Hysterese hängt von der tatsächlichen Positionsänderung, nicht aber von der maximalen Auslenkung ab [125].

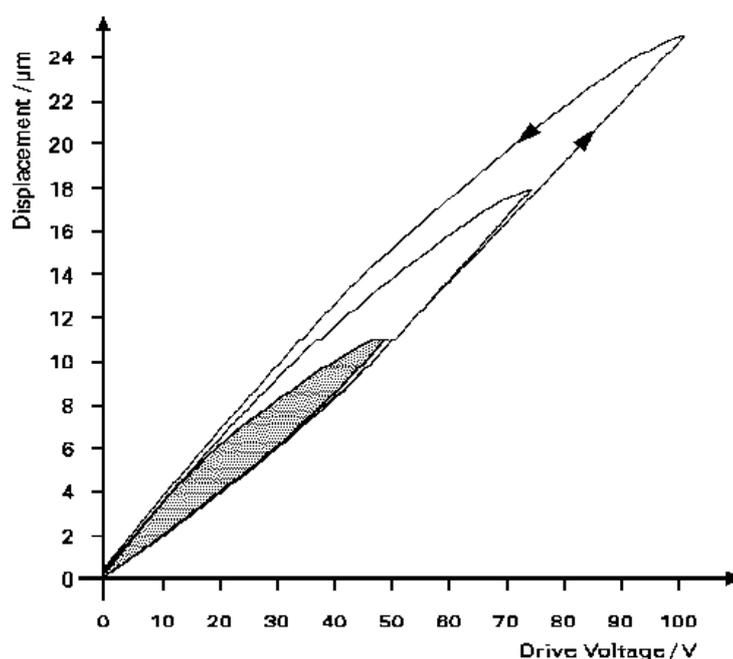


Abb. 19: Hysteresekurven eines spannungsgesteuerten Piezo-Aktors bei verschiedenen Spitzenspannungen.

Werden mit einem piezoelektrischen Stellglied alle Vorgänge periodisch ausgeführt, so hat die Hystereseschleife keine Auswirkung auf das Ergebnis.

Kristalline Polarisations-effekte rufen neben der Hysterese auch ein Positionskriechen (Drift) hervor, das im spannungsgesteuerten Betrieb auftritt. Wenn die angelegte Spannung eines Piezo-Aktors erhöht/reduziert wird, führt das zu einer Erhöhung/Reduktion der bleibenden Polarisation. Nach dem Abschluss der Feldstärkenänderung wird die Auslenkung weiterhin langsam erhöht bzw. reduziert. Das Kriechen nimmt logarithmisch mit der Zeit ab und wird durch folgende Gleichung beschrieben [130]:

$$\Delta L(t) \gg \Delta L \cdot \left(1 + g \cdot \lg \left(\frac{t}{0,1} \right) \right) \quad (54)$$

ΔL = Auslenkung, 0,1 Sekunden nach dem Ende der Spannungsänderung [m]

g = Kriechfaktor, abhängig von den Keramikeigenschaften (ungefähr 0,01 bis 0,02)

Die Drift beträgt ungefähr 1 % der letzten gesteuerten Positionsänderung pro Zeitdekade in Sekunden.

Bei Aktoren, die im spannungsgesteuerten Betrieb ohne Positionssensor eingesetzt werden, ist die Auslenkung nur in etwa proportional zur angelegten Spannung. Diese Nichtlinearität sowie das Kriechen und die Hysterese können durch einen geschlossenen Regelkreis (mit einem Positionssensor) eliminiert werden. Positionsgeregelte Piezo-Translatoren und -Systeme bieten eine Wiederholbarkeit bis in den Sub-nm-Bereich und eine Linearität bis zu 0,01 % [125].

Die Temperatur beeinflusst sowohl die Länge des Piezokristalls aufgrund der linearen thermischen Ausdehnung als auch den piezoelektrischen Effekt. Je höher die Temperatur, desto größer ist die Auslenkung. Liegt die Temperatur oberhalb der Curie-Temperatur (bei Hochspannung-Piezo-Aktoren ca. 300°C), depolarisieren piezoelektrische Keramiken. Im Bereich von -90°C bis 190°C beträgt die Temperaturabhängigkeit der Auslenkung des Piezokristalls, bezogen auf die Auslenkung bei 20°C, ca. 0,2 %·K⁻¹ [125].

2.6.4. Anwendungsbeispiele der Nanoliterdosierung in der Chemie

Der immer stärker werdende Trend zur Miniaturisierung in der Chemie führt zu einem erhöhten Bedarf an automatisierten Techniken zum Volumenhandling im Nano- und Picolitermaßstab. Vor allem bei biochemischen Anwendungen ist oftmals nur wenig Probenmaterial vorhanden, das effizient genutzt werden muss. Seit kurzem sind daher Pipettierroboter verfügbar, die bis hinunter in den Picoliterbereich dosieren können [5, 6, 131, 132]. Die Pipettierroboter basieren dabei meist auf piezoelektrischen Elementen. Die prinzipielle Arbeitsweise ist seit geraumer Zeit von Tintenstrahldruckern aus dem EDV-Bereich bekannt. Die zu dosierende Flüssigkeit wird durch die schnelle Ausdehnung der Piezokeramik mit dem daraus resultierenden Druckstoß in Picoliter großen Tröpfchen auf das entsprechende Target transferiert. Zur Anwendung kommen die Mikropipettiersysteme beispielsweise als sogenannte Nano-Plotter bei der Herstellung von micro arrays, bei der Biochip-Beladung, in der Biosensorik und bei Verdünnungsreihen. Das große Problem bei der Dosierung in diesen extremen Bereichen ist die Erzeugung der Tröpfchen mit den sich hierbei ergebenden geringen Durchmessern, d.h. das Abreißen des Tropfens. Neben den Druckstößen wird das Abreißen der Tropfen auch durch das Heranfahren des Targets und Abstreifen bewerkstelligt. Darauf basierend ist ein Mikrofraktionssammler konzipiert worden, mit dem kleinste Volumina z.B. aus einem Kapillarelektrophoresesystem

aufgefangen werden können [133]. Zum Einsatz kommen auch moderne Autosampler, die Volumina von bis zu 50 nL handhaben. Das Herzstück der beiden letztgenannten Applikationen stellt eine Spritzenpumpenmechanik mit Mikroliterspritze dar.

3. Experimenteller Teil

3.1. Titrationssystem

3.1.1. Apparatur und Chemikalien

Der experimentelle Aufbau für die zu entwickelnde on-line-Titrationsmethode basiert auf einem stark modifizierten FIA-System. Der prinzipielle Fließplan der verwendeten Apparatur ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

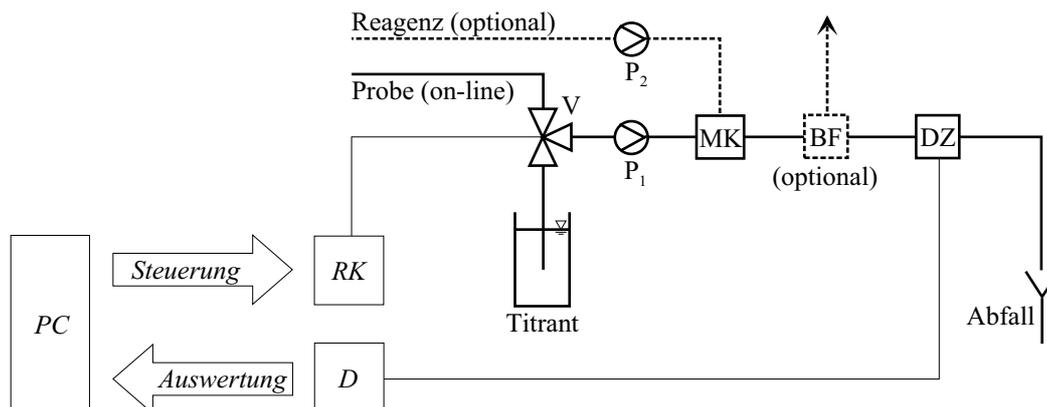


Abb. 20: schematischer Aufbau des on-line-Titrationssystems.

V: Drei-Wege-Magnetventil; P_1 und P_2 : Pumpen; MK: Mischkammer; BF: Blasenfalle; DZ: Durchflusszelle; D: Detektor; RK: Relaiskarte; PC: Computer; Probe (on-line): Fluss, Abwasserkanal, etc; Reagenz: z.B. Indikator, Puffer für komplexometrische Titration.

Die Probe wird durch eine Pumpe (P) angesaugt und wechselweise mit dem Titranten durch ein Drei-Wege-Magnetventil (V) gefördert. Während des Transports durch die Kapillare und die Mischkammer (MK) werden Analyt und Titrant vermischt und reagieren miteinander. Entstehende Gasblasen können durch eine Blasenfalle (BF) bei Bedarf abgezogen werden. Nach der Detektion in der Durchflusszelle (DZ) wird der Probenstrom dem Abfall zugeführt. Die Steuerung einer Relaiskarte (RK) und die Auswertung von Detektorsignalen wird mit Hilfe eines handelsüblichen Computers (PC) durchgeführt. Optional ist auch eine Reagenzienzugabe möglich, die z.B. bei der komplexometrischen Titration zur Wasserhärtebestimmung benötigt wird.

3.1.1.1. Steuerung und Auswertung

Das Herzstück des Systems stellt ein Mikro-Drei-Wege-Magnetventil, Typ 127, Firma Bürkert GmbH, Ingelfingen, dar. Das Totvolumen des Ventils beträgt $75 \mu\text{L}$, die Schaltzeit 25 ms .

Die Steuerung des Magnetventils erfolgt über eine Standard-Relaiskarte für die serielle bzw. parallele PC-Schnittstelle, Firma Conrad, Hirschau. Diese wird von einem selbst in Visual-Basic, Firma Microsoft, Redmond, entwickelten Programm gesteuert. Die primären Eingabeparameter des Programms sind die Anzahl der Stufen, die Schleifendauer und die Anzahl der Wiederholungen einer Schleife. Die Stufen stellen den Titrationsfortschritt dar, d.h. von Stufe zu Stufe steigt das Volumenverhältnis von Titrant zu Probe definiert an (i.d.R. von 0 bis 2). In Abbildung 4 (Seite 13) sind beispielsweise drei Stufen dargestellt, der Titrationsfortschritt nimmt hierbei von oben nach unten zu. Durch eine hohe Anzahl von Stufen wird der Titrationsbereich fein gerastert, durch eine geringe Anzahl entsprechend gröber. Die Programmierung erfolgt derart, dass die Summe der Volumina von Titrant und Probe immer gleich ist. Dies wird über die sog. Schleifendauer, die dem Volumen proportional ist, festgelegt. Im eigentlichen Sinne entspricht die Schleifendauer der Zeit eines Schaltzyklus, d.h. der Summe der Schaltzeiten von Titrant und Probe innerhalb einer Stufe und Schleife. In Abbildung 4 ist die Schleifendauer durch ein weißes (für den Titranten) und ein schwarzes Element (für die Probe) gekennzeichnet. Die Anzahl der Wiederholungen einer Schleife dient letztlich dazu, das Gesamtvolumen einer Stufe festzulegen. Bei einer Anzahl der Schleifenwiederholungen von 1 entspricht die Schleife einer Stufe.

In Abbildung 21 ist ein Bildschirmfenster mit den wichtigsten Elementen des entwickelten Steuerprogramms dargestellt. Die Eingabe der o.a. Parameter erfolgt innerhalb des Rahmens „Eingabe der Titrationsparameter“. Der rechte obere Rahmen „Aktuelle Werte“ dient zur Information und Orientierung während der Titration. Über die „Auswahl“ lässt sich wahlweise der Modus Titration, oder die zur Ermittlung der Totzeit (Kap. 3.1.7.4.) dienende Stoß- bzw. Verdrängungsmarkierung einstellen. Eine beliebige Schaltung aller acht Relais ermöglicht schließlich der unterste Rahmen „manuelle Relaiskartensteuerung“. Das Programm bietet die nötige Flexibilität bei einfacher Bedienung. Eine Erweiterung ist bei Bedarf durch die modulare Gestaltung einfach realisierbar. Die gewählte Entwicklungsumgebung Visual Basic 6.0, Firma Microsoft, Redmond, ermöglicht eine rasche Programmentwicklung mit flacher Lernkurve und ideale Integration in die Windows-Betriebssysteme. Zur Steuerung der Relaiskarte werden Funktionen des Betriebssystems bzw. für Visual-Basic vorhandene Steuerelemente verwendet.

Über die Stufen lassen sich indirekt quasi linear ansteigende Volumenverhältnisse von Probe zu Titrant erzeugen, indem die Ein- bzw. Ausschaltzeit des Magnetventils entsprechend gesteuert wird. Abbildung 22 zeigt, dass durch geeignete Programmierung ein linearer Anstieg der Volumenverhältnisse von Titrant zu Probe realisiert werden kann. Als Auswertesoftware kommt WinPeak, Version 3.26, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, zum Einsatz.

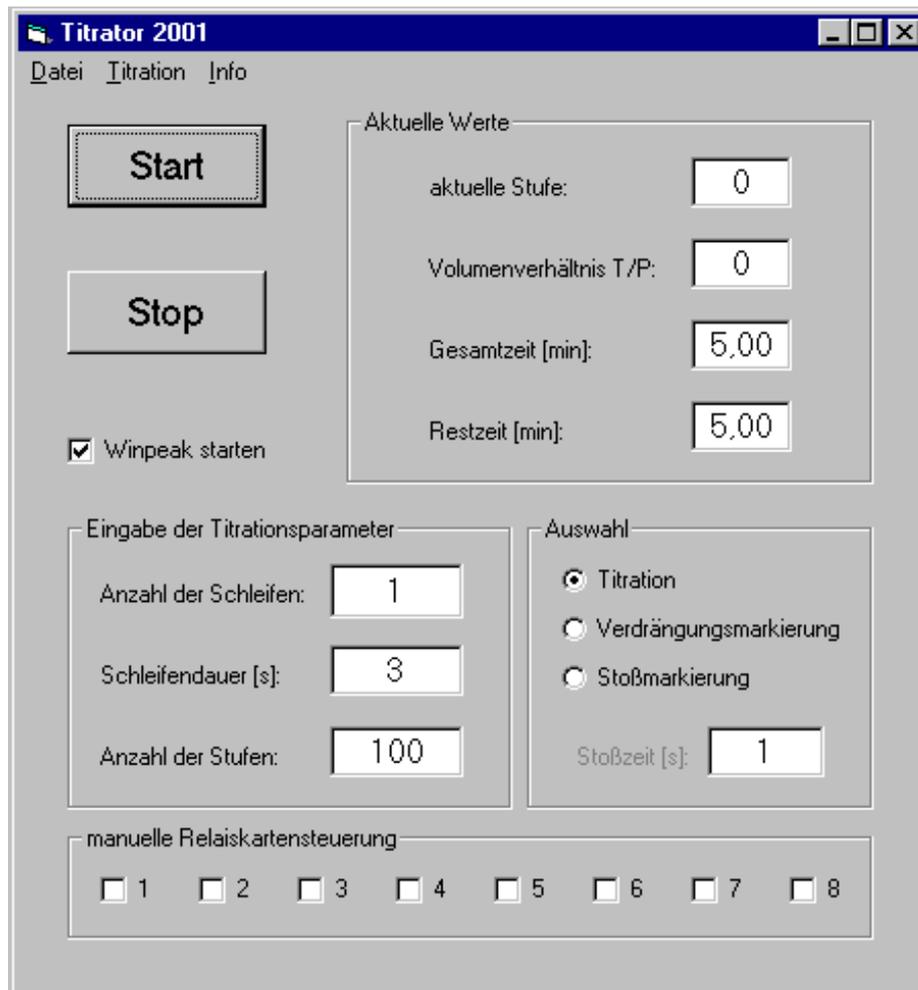


Abb. 21: Bildschirmfenster des Steuerprogramms des Titrationssystems.

Die Schaltzeiten für Titrant und Probe werden aus den Eingabeparametern des Programms (Anzahl der Stufen, Schleifendauer, Anzahl der Wiederholungen einer Schleife, sowie Beginn und Ende des Volumenverhältnisses von Titrant zu Probe) berechnet und mit Hilfe einer Timer-Funktion realisiert. Ein linearer Anstieg der Volumenverhältnisse kann nur, aufgrund der Mischungsbedingungen, durch einen kurvenförmigen Verlauf der Schaltzeiten erreicht werden.

Durch die Anzahl der Stufen wird der relevante Volumenverhältnisbereich gerastert. Eine hohe Stufenanzahl, d.h. ein sehr feines Raster, sollte die genauesten Ergebnisse erzielen. Gleichzeitig nähern sich die in Stufen ansteigenden Volumenverhältnisse immer mehr einem „echten“ linearen Anstieg an. Das Raster kann jedoch nicht beliebig eng gewählt werden, da die Schaltzeitdifferenzen von Titrant bzw. Probenstrom gegen Ende der Titration sehr gering werden (Abb. 22). Die Limitierung des VB-internen Timers (wird unter Windows 9x standardmäßig alle 55 ms aktualisiert) und die Schaltzeit des Magnetventils wirken der scheinbaren Erhöhung der Genauigkeit entgegen. Der durch den Visual-Basic-

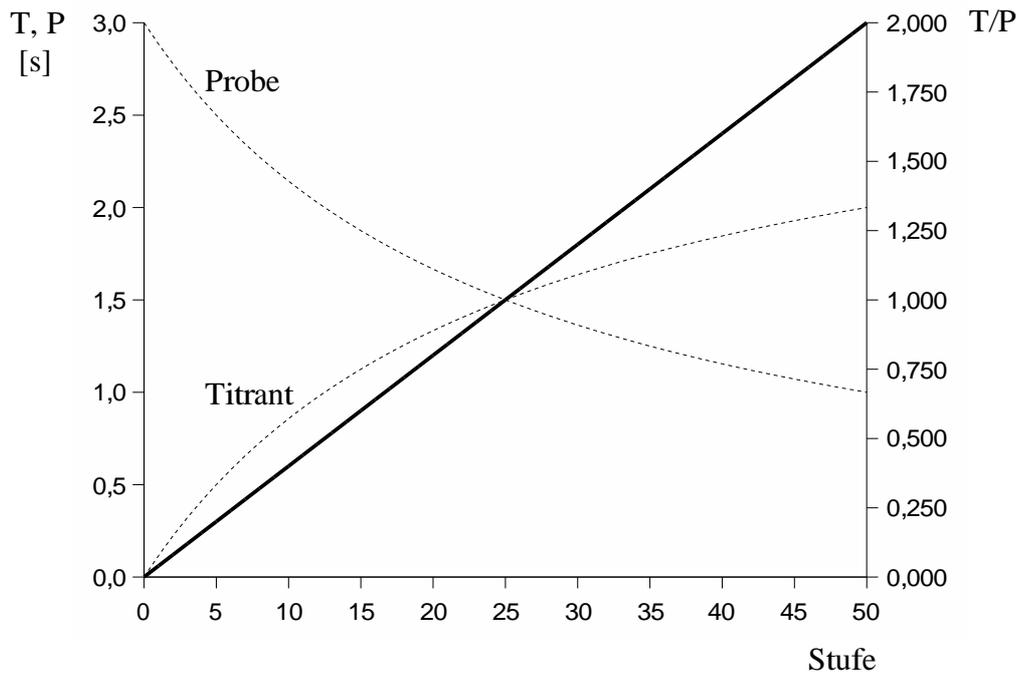


Abb. 22: linearer Anstieg der Volumenverhältnisse mit steigender Stufennummer. gestrichelte Linien: Schaltdauer Titrant (T) bzw. Probe (P); durchgezogene Linie: Volumenverhältnis T/P von 0 bis 2; Anzahl der Stufen: 50; Schleifendauer: 3 s; Wiederholungen einer Schleife: 1.

Timer verursachte Fehler wird durch die Verwendung eines speziell für hohe Zeitauflösung programmierten Timers minimiert (Auflösung unter 10 ms) [134].

Berechnung der Schaltzeiten von Titrant und Probenstrom

In Abbildung 23 ist schematisch ein typisches Zeitprogramm für die Ansteuerung des Ventils dargestellt.

Die Zunahme des Volumenverhältnisses von Titrant zu Probe von einer beliebigen Stufe zur nächsten wird durch die Volumenverhältnisdifferenz (Δ) beschrieben (Glg. 55).

$$\frac{\text{Schaltzeit}_{\text{Titrant}(\text{Stufe}_n)}}{\text{Schaltzeit}_{\text{Probe}(\text{Stufe}_n)}} - \frac{\text{Schaltzeit}_{\text{Titrant}(\text{Stufe}_{n-1})}}{\text{Schaltzeit}_{\text{Probe}(\text{Stufe}_{n-1})}} = \Delta = \frac{Q_{\text{Beginn}} - Q_{\text{Ende}}}{\text{Stufenzahl}} \quad (55)$$

Q: Volumenverhältnis (T/P).

Das Verhältnis der Schaltzeiten von Titrant zu Probe bei einer beliebigen Stufe kann nun mit Hilfe von Δ berechnet werden (Glg. 56).

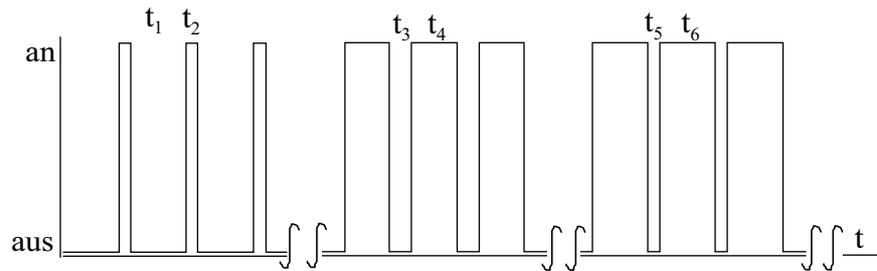


Abb. 23: Typisches Zeitprogramm für die Ansteuerung des Ventils.

$t_1 + t_2 = t_3 + t_4 = t_5 + t_6 = \text{konstant} = \text{Zeitfenster bzw. Schleifendauer}$ (Summe der Ansteuerzeiten von Probe und Titrant); Ansteuerzeiten Probe: t_1, t_3, t_5 ; Ansteuerzeiten Titrant: t_2, t_4, t_6 .

$$\frac{\text{Schaltzeit}_{\text{Titrant}(\text{Stufe}_n)}}{\text{Schaltzeit}_{\text{Probe}(\text{Stufe}_n)}} = Q_{\text{Beginn}} + \text{Stufe}_n \cdot \Delta \quad (56)$$

Q_{Beginn} : Volumenverhältnis (T/P) zu Beginn der Titration.

Die Schaltzeit des Titranten ergibt sich aus der Differenz von Schleifendauer und Schaltzeit des Probenstroms (Glg. 57).

$$\text{Schaltzeit}_{\text{Titrant}(\text{Stufe}_n)} = \text{Schleifendauer} - \text{Schaltzeit}_{\text{Probe}(\text{Stufe}_n)} \quad (57)$$

Aus Gleichung 56 und 57 ergibt sich durch Einsetzen und Umformen eine Gleichung, welche die Berechnung der Schaltzeit für Titrant und somit auch Probe bei jeder beliebigen Stufe ermöglicht (Glg. 58):

$$\text{Schaltzeit}_{\text{Titrant}(\text{Stufe}_n)} = \frac{\text{Schleifendauer} \cdot (Q_{\text{Beginn}} + \text{Stufe}_n \cdot \Delta)}{Q_{\text{Beginn}} + \text{Stufe}_n \cdot \Delta + 1} \quad (58)$$

Das Struktogramm des Steuerungsprogramms ist in Abbildung 24 dargestellt.

Beschreibung des Visual-Basic-Steuerungsprogramms

- Eingabe der Parameter: Volumenverhältnisbeginn und -ende, Stufenanzahl, Schleifenanzahl, Schleifendauer.
- Berechnung der relevanten Größen (Δ , $\text{Schaltzeit}_{\text{Probe}(\text{Stufe})}$, $\text{Schaltzeit}_{\text{Titrant}(\text{Stufe})}$) und Ablegen der berechneten Werte in Arrays (ermöglicht schnellen Zugriff auf Daten während der eigentlichen Titration).
- Starten des Auswerteprogramms Winpeak durch einen kurzen Impuls auf Triggerkanal der D/A-Wandler-Karte.

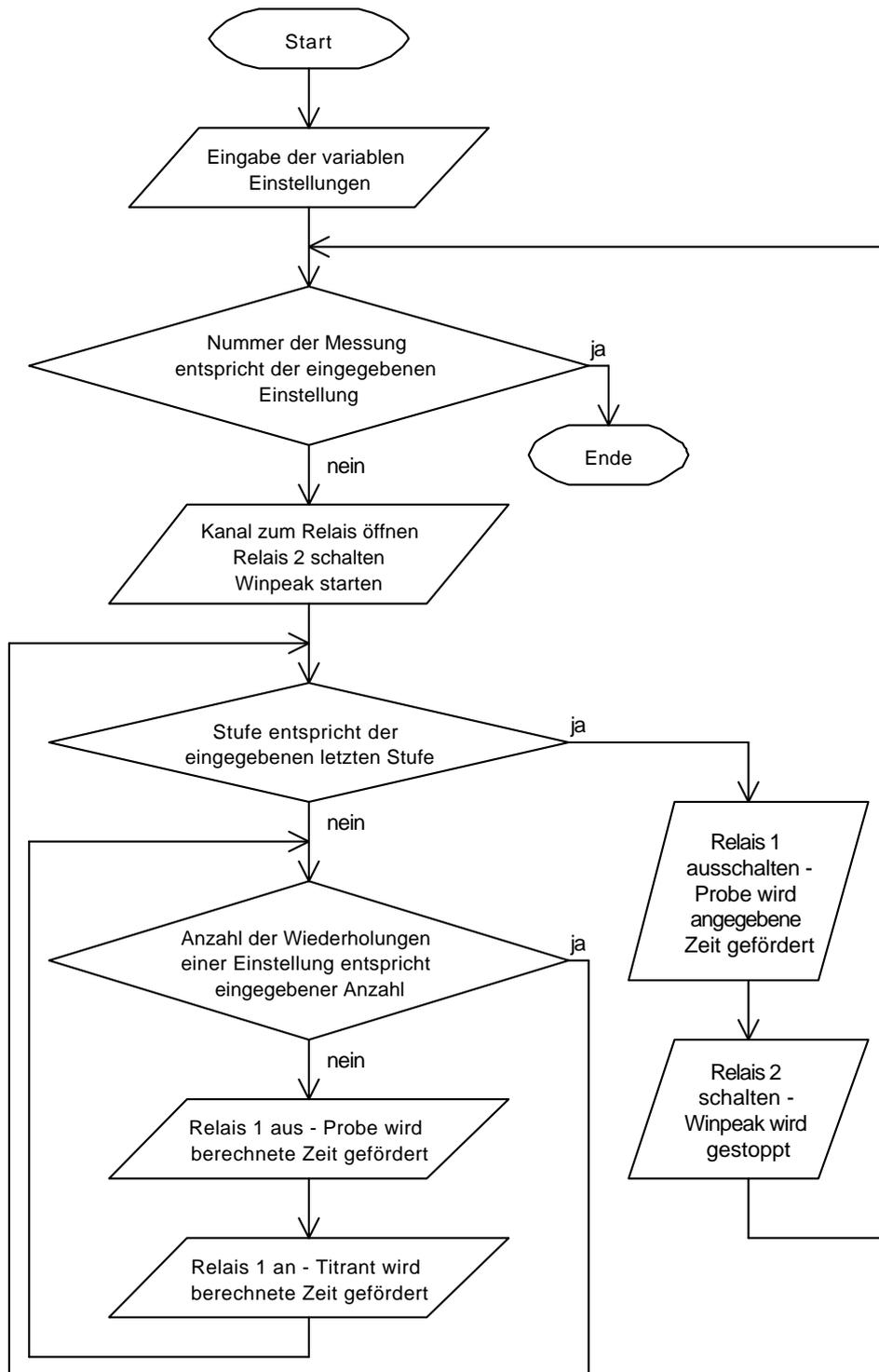


Abb. 24: Ablaufplan des entwickelten Steuerprogramms für die Autotitratorsteuerung.

- Programm durchläuft geschachtelte FOR-Schleifen; jede äußere Schleife entspricht einer Stufe, jede innere dient zur Erhöhung des Stufenvolumens (Schleifen). Das Ventil wird entsprechend den berechneten Zeiten für Titrant und Probe ein- bzw. ausgeschaltet.
- Eine Abbruchbedingung beendet die Titration (Zählervariable erreicht Anzahl der eingegebenen Stufen bzw. Anzahl der Schleifenwiederholungen oder Abbruch durch den Benutzer).

3.1.1.2. Detektoren, Pumpen und Zubehör

Detektoren und Durchflusszelle

Die potentiometrische Detektion erfolgt in einer speziell angefertigten PMMA- (Polymethylmethacrylat) Durchflusszelle (Abb. 25). Durch eingelassene O-Ringe zur Abdichtung am Elektrodenschaft, zentrale Anströmung der Elektrodenmembran und ein minimales Messkammervolumen wird die Bandenverbreiterung durch die Detektion weitgehend unterdrückt.

Als Sensor dient eine pH-Einstabmesskette, SENSOLYT SE, Firma Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim. Die mit Gelelektrolyt gefüllte pH-Messkette ist über ein pH-Meter 620, Metrohm, Filderstadt, mit der Auswertesoftware WinPeak verbunden. Gelelektrolyt-Messketten sind wartungsfreundlich, da ein Wechsel der Elektrolytlösung entfällt und sie, im Gegensatz zu Elektroden mit Elektrolytlösungen, für Messungen bei geringen Überdrücken von wenigen mbar geeignet sind. Allerdings kann durch den fehlenden Elektrolytausfluss ungehindert Lösung in die Messkette eindringen; ein merklicher Verdünnungseffekt tritt jedoch erst nach längerer Betriebszeit auf [135]. Eine Messkette mit Gegendruck wäre daher von Vorteil, ist aber nicht zwingend erforderlich.

Für die konduktometrische Detektion werden kommerziell erhältliche HPLC-Konduktometer auf ihre Eignung für das zu entwickelnde System überprüft. Eingesetzt werden die Geräte S3111, Firma Sykam, Eresing; CDD-6A, Firma Shimadzu, Kyoto; BT0330, Firma Biotronik, Maintal und der conductoMonitor III, Firma LDC/Milton Roy, Riviera Beach. Alle Geräte erweisen sich als prinzipiell einsetzbar. Aufgrund der einfachen Bedienung wird jedoch vorwiegend der S3111, Firma Sykam, verwendet. Alle Modelle besitzen eine temperierbare Leitfähigkeitszelle.

Für die Versuche mit photometrischer Detektion dient das Photometer Ultraspec 4051, Firma LKB Biochrom, Cambridge mit speziell aus fused silica gefertigter Durchflussküvette, Firma Zeiss, Oberkochen. Der Wellenlängenbereich erstreckt sich von 325 bis 900 nm mit einer Genauigkeit von ± 1 nm und Reproduzierbarkeit von $\pm 0,5$ nm. Die Bandbreite beträgt 5 nm, der photometrische Bereich -0,3 bis 3,0 Extinktionseinheiten.

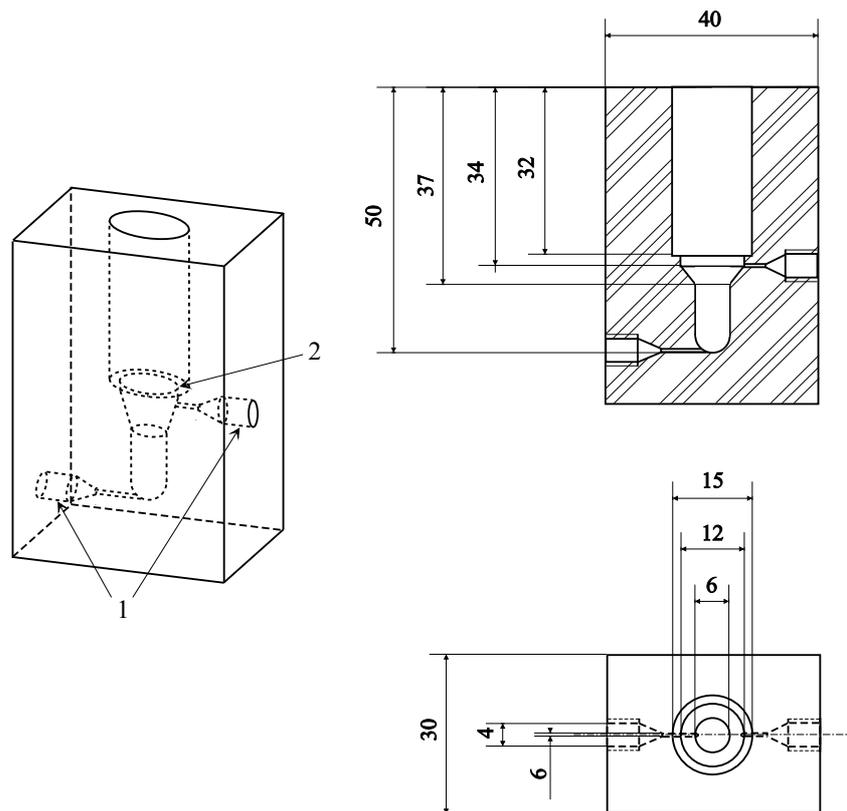


Abb. 25: eigens hergestellte Durchflusszelle aus PMMA für die pH-Einstabmesskette SENSOLYT SE, Firma WTW, Weilheim.

1: Schlauchanschlüsse, 2: Position für O-Ring-Dichtung; alle Bemaßungen in mm.

Bei Bedarf ist eine Serienschaltung von mehreren Detektoren möglich.

Schlauchverbindungen

Als Pumpenschlauch hat sich das Modell PharMed (Ismaprene) SC0307, Firma Ismatec, Wertheim-Mondfeld, bewährt. Die Kapillaren bestehen aus Teflon mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm. Sämtliche Verbindungselemente sind aus PEEK gefertigt.

Pumpen

Zur Förderung der Probe wird eine Peristaltikpumpe S 1410, Firma Sykam, Eresing, verwendet. Dieser Pumpentyp besitzt neben den verhältnismäßig niedrigen Anschaffungskosten viele Vorteile, z.B. beschädigen aggressive Medien nur den leicht zu ersetzenden Pumpenschlauch. Ein konstanter Durchfluss kann trotz geringer Änderungen der Viskosität und des Druckverlusts aufrecht erhalten werden. Dieser Punkt besitzt besondere Bedeutung, da die Volumenverhältnisse in der Kapillare über Zeitverhältnisse eingestellt

werden, was konstante Durchflussraten voraussetzt. Nachteilig wirkt sich allerdings aus, dass Peristaltikpumpen keine absolut pulsationsfreien Strömungen erzeugen.

Zur Untersuchung einer kostengünstigen Alternative zu der o.a. Peristaltikpumpe werden sogenannte Scheibenwaschpumpen, die in Personenkraftwagen zur Reinigung der Front- und Heckscheibe verwendet werden, geprüft. Im Einzelnen sind dies:

- Kreiselpumpe, Firma Hella, Lippstadt, Typ A067 (interne Bezeichnung);
- Kreiselpumpe, Firma VDO, Schwalbach am Taunus, Typ 988 (interne Bezeichnung);
- Zahnradpumpe, Firma VDO, Schwalbach am Taunus, Typ 10.80 (interne Bezeichnung);
- Drehflügelpumpe, Firma Jideco, Yokohama, Typ 2 (interne Bezeichnung).

Blasenfalle

Da bei der Titration carbonathaltiger Wässer Kohlendioxid freigesetzt werden kann, ist es manchmal zweckmäßig vor dem Detektor eine Blasenfalle (PMMA eignet sich als Material) anzubringen, da Gasblasen in der Durchflusszelle das Messergebnis deutlich stören. Entstehende Gasblasen können z.B. mittels eines Splitsystems im Nebenstrom abgezogen werden. Auch die Verwendung einer Gasdiffusionszelle ist möglich. Wenn keine Gasblasen zu erwarten sind, kann die Blasenfalle jederzeit abgestellt werden.

Mischkammer, Reaktor

Zur effizienten Durchmischung von Probe und Titrant wird in den Versuchsreihen eine gerührte Mischkammer, Firma Sykam, Eresing, mit einem Volumen von 400 μL verwendet. Daneben werden selbst gefertigte Mischkammern und ein sog. Serpentina-Reaktor auf ihre Eignung untersucht.

3.1.1.3. Chemikalien und Probenvorbereitung

Für sämtliche Lösungen wird Reinstwasser aus einer Milli-Q Plus-Anlage, Millipore, Eschborn, verwendet. Die eingesetzten Chemikalien besitzen p.A.-Qualität und einen Reinheitsgehalt von mindestens 98 %. Bei Bedarf werden die Lösungen unter Vakuum bei kontinuierlichem Rühren oder ersatzweise im Ultraschallbad entgast. Durch diesen Vorgang werden eine Gasbildung innerhalb der Apparatur verhindert und somit Störungen bei der Detektion unterbunden.

3.1.2. Dispersionsverhalten des Systems

Das Dispersionsverhalten des Systems bei potentiometrischer Detektion wird untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich, wie gezeigt werden konnte, auf die anderen eingesetzten Detektionsarten übertragen.

3.1.2.1. Geometrie des Reaktors

Die geometrische Form des Reaktors wirkt sich deutlich auf die Dispersion eines Tracers aus. Es werden deshalb Versuche mit unterschiedlichen Reaktortypen durchgeführt. Z.B. fördert eine Kapillare mit vielen starken Änderungen der Flussrichtung (Abb. 26) die in Kapitel 2.2.4.3. beschriebenen „Secondary-Flow-Effekte“.

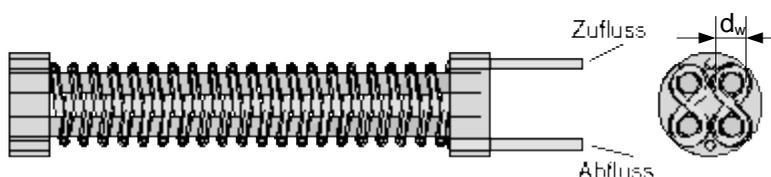


Abb. 26: Serpentin-Reaktor mit vielen Änderungen der Flussrichtung zur effizienten Vermischung von Probe mit Reagenz bei minimaler Dispersion.

ID_C : 0,5 mm; OD_C : 1,6 mm; d_w : Innendurchmesser der von der Kapillare gebildeten Wicklung.

Die Bandenbreite der erhaltenen Antwortkurven auf Stoßmarkierungen in Serpentinreaktoren beweisen eine stark verminderte axiale Dispersion im Vergleich zu gestreckten Kapillaren (Abb. 27).

Die bessere Eignung von Serpentinreaktoren im Vergleich zu solchen mit gestreckter Kapillare und gleicher effektiver Länge ist deutlich zu erkennen. Reaktoren mit Serpentinwicklung werden daher für die Titrations in Betracht gezogen. Wie in Kapitel 3.1.2.3. gezeigt werden kann, lässt sich damit allerdings ebenso keine ausreichende Vermischung erreichen. Die Wahl fällt somit auf eine gerührte Mischkammer.

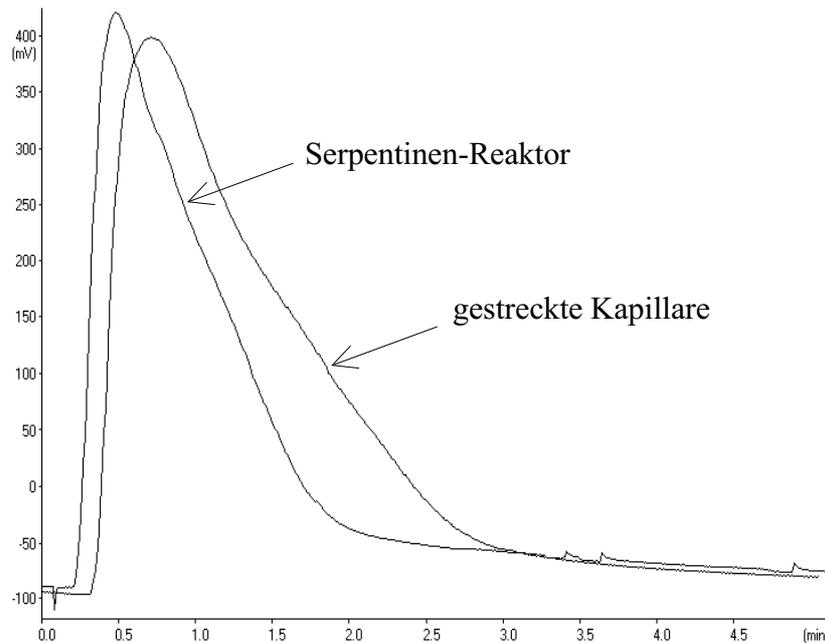


Abb. 27: Einfluss der Reaktorgeometrie auf die Dispersion.

Antwortkurve auf eine Stoßmarkierung in einem Serpentin-Reaktor bzw. einer gestreckten Kapillare; \dot{V} : $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Tracer: NaOH ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Tracervolumen: $60 \mu\text{L}$; Reaktorlänge: $1,3 \text{ m}$; Serpentin-Reaktor: 80 Windungen; d_w : 2 mm ; ID_C : $0,5 \text{ mm}$; OD_C : $1,6 \text{ mm}$ (PTFE).

3.1.2.2. Einfluss des Detektors

Hohe Zeitkonstanten des Detektorsystems und Totvolumina können einen systematischen Fehler der Messanordnung hervorrufen. Das Detektorsignal spiegelt zeitlich verzögert die Konzentration der Probe wider. An Abbildung 28 wird deutlich, dass die Dispersion in der Kapillare im Vergleich zum Einfluss des Detektors vernachlässigt werden kann. Die Antwortkurven auf eine Stoßmarkierung direkt in den Detektor bzw. mit vorgeschaltetem Serpentinreaktor besitzen die gleiche Höhe und Bandenbreite. Sie sind lediglich um die Verweilzeit des Tracers im Serpentinreaktor parallelverschoben. Wenn die Kapillare einen deutlichen Einfluss hätte, würde der Peak eine breitere und flachere Form annehmen.

Die starken Verzögerungseffekte des Detektors beruhen neben einem hohen Durchflusszellenvolumen von ca. $400 \mu\text{L}$ (durch die Bauweise der Elektrodenmesszelle nicht kleiner realisierbar) und Totvolumina im oberen Bereich der Messzelle auch auf der Trägheit der Elektrode. Glaselektroden besitzen zwar eine sehr geringe Ansprechzeit, es laufen jedoch Diffusionsvorgänge an der Elektrodenoberfläche oft zu langsam ab [37].

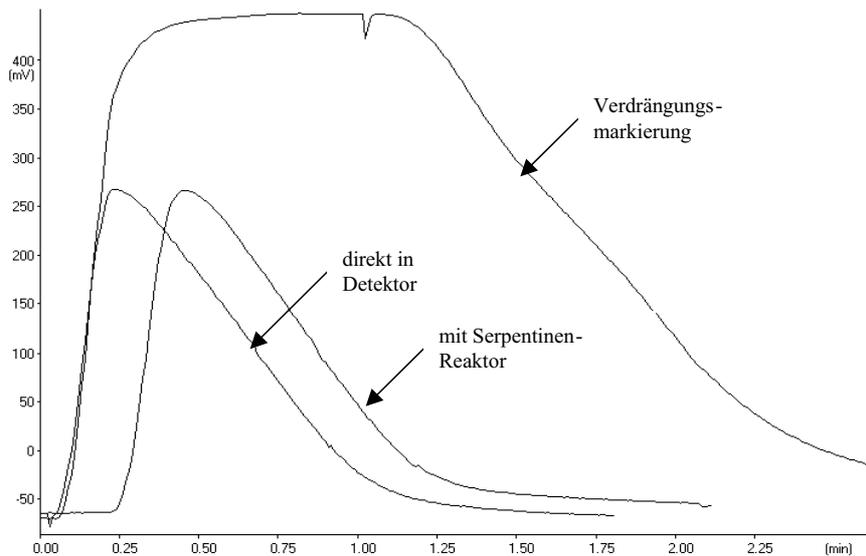


Abb. 28: Einfluss des Detektors auf die Dispersion eines Tracers im System.

Antwortkurve auf eine Stoßmarkierung mit bzw. ohne vorgeschalteten Serpentina-Reaktor; \dot{V} : $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Tracer: NaOH ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Tracervolumen: $10 \mu\text{L}$; Reaktorlänge: $1,3 \text{ m}$; Serpentina-Reaktor: 80 Windungen; d_w : 2 mm ; ID_C : $0,5 \text{ mm}$; OD_C : $1,6 \text{ mm}$ (PTFE).

Durch Rühren kann die Diffusion erhöht und somit der Stoffaustausch an der Elektrodenoberfläche erheblich beschleunigt werden. Der Einfluss dieser Transportvorgänge kann zu starken Abweichungen des Messergebnisses von der realen Konzentration führen. Die Ansprechzeit einer Glaselektrode beim Übergang von NaOH , $0,001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, in gerührtes destilliertes Wasser unterscheidet sich deutlich von der des ungerührten (Abb. 29). Die Verdrängungsmarkierung bestätigt die Verzögerung des Detektorsignals durch mangelnde Diffusion. Während der Detektor noch einen pH-Wert von 9 anzeigt, besitzt der die Durchflusszelle verlassende Probenstrom schon einen Wert von 7.

Der Detektor spiegelt nur dann die wahren Konzentrationsverhältnisse in der Messkammer wider, wenn die Diffusionsvorgänge an der Elektrodenoberfläche mit ausreichender Geschwindigkeit ablaufen. Eine Rührung der Durchflusszelle ist bauartbedingt nicht möglich, so dass die Diffusion nur über das vorbeiströmende Medium beeinflusst werden kann. Eine Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit fördert die Diffusion durch Verstärkung des Konzentrationsgradienten und vermindert den Einfluss der Totvolumina in der Messzelle und muss daher angestrebt werden.

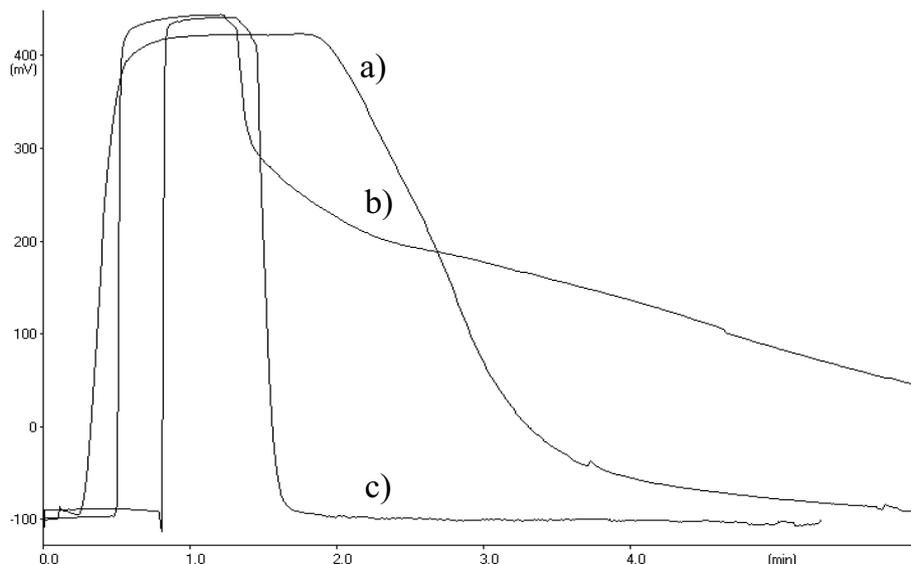


Abb. 29: Einfluss der Diffusionsvorgänge an der Elektrodenoberfläche auf die Zeitkonstante des Detektors.

- a) Verdrängungsmarkierung von NaOH durch destilliertes Wasser (Reaktor);
Serpentinen-Reaktor: 80 Windungen; d_w : 2 mm; ID_C : 0,5 mm; OD_C : 1,6 mm (PTFE); Reaktorlänge: 1,3 m; $\dot{V} = 1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $c(\text{NaOH}) = 0,001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.
- b) Übergang von NaOH ($0,001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in destilliertes Wasser ohne Rühren;
- c) Übergang von NaOH ($0,001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in destilliertes Wasser unter Rühren.

3.1.2.3. Volumen der Mischkammer

Eine ausreichende Vermischung von Titrant und Probe muss bereits vor Erreichen des Detektors gewährleistet sein, um ein zu starkes Rauschen des Signals zu verhindern. Die Dispersion kann durch eine Mischkammer gefördert werden. Mit steigendem Mischkammervolumen nimmt sie zu, d.h. die Peaks werden breiter und flacher (Abb. 30).

Kapillaren alleine ermöglichen keine ausreichende Vermischung von Titrant und Probe, da diese aufgrund des hohen Druckverlustes nicht beliebig lang gewählt werden können. Aus diesem Grund ist die Verwendung einer Mischkammer unerlässlich. Mit zunehmendem Mischkammervolumen nimmt allerdings auch die Messfrequenz ab, da die Rückkehr des Messsignals zur Basislinie verzögert wird. Ferner muss der durch die Ventilschaltung erzeugte Gradient aufrecht erhalten werden, d.h. die Titrationsstufen dürfen nicht zu stark miteinander vermischt werden, da ansonsten die gewünschte Information verloren geht. Dies begrenzt ebenfalls das Mischkammervolumen nach oben hin. Das optimale Volumen der Mischkammer ist eng mit dem Volumenstrom verbunden, da dieser in Verbindung mit der Schleifendauer das zu vermischende Volumen aus Titrant und Probe bestimmt. Die entsprechende Optimierung wird in Kapitel 3.1.6.5. aufgegriffen.

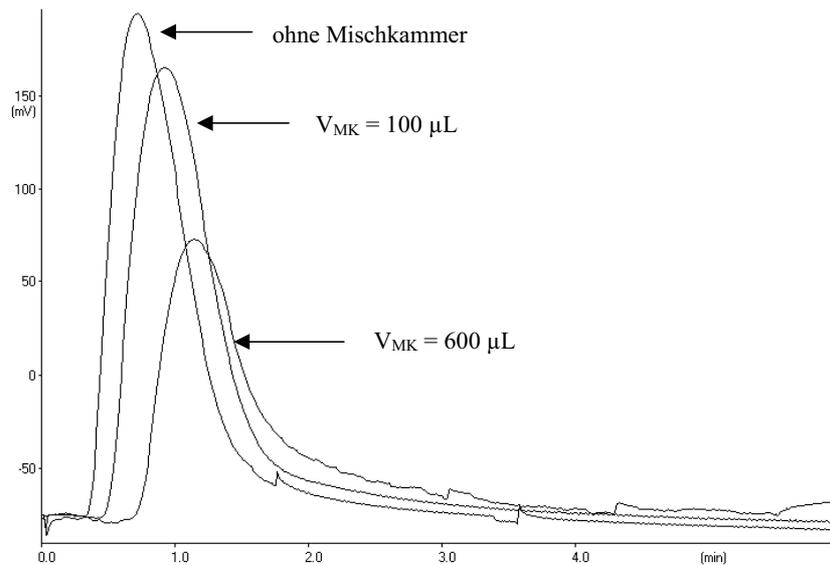


Abb. 30: Einfluss des Mischkammervolumens auf die Dispersion.

\dot{V} : $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Tracer: NaOH ($0,001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Tracervolumen: $10 \text{ }\mu\text{L}$; Reaktorlänge: $1,3 \text{ m}$; Serpentina-Reaktor: 80 Windungen; d_w : 2 mm ; ID_C : $0,5 \text{ mm}$; OD_C : $1,6 \text{ mm}$ (PTFE); V_{MK} : Mischkammervolumen.

3.1.2.4. Volumen des Tracers

Die Dispersion kann durch Erhöhung des injizierten Tracervolumens herabgesetzt werden. Die Peakhöhe wächst mit steigendem Probenvolumen, bis ein Beharrungswert erreicht wird (Abb. 31).

Mit zunehmendem Tracervolumen nimmt die Verdünnung innerhalb eines injizierten Plugs ab, bis schließlich ein Teil der injizierten Markierungssubstanz unverdünnt den Detektor durchströmt. Die Schleifendauer des Steuerungsprogramms muss somit kurz genug gewählt werden, damit noch eine ausreichende Vermischung der injizierten Plugs stattfinden kann. Andererseits kann die Schleifendauer nicht beliebig vermindert werden, da die Genauigkeit durch die Steuerung begrenzt ist. Besonders am Ende der Titration werden die Differenzen der Schaltzeiten von Stufe zu Stufe sehr klein; eine ausreichende Auflösung ist dann nicht mehr gewährleistet (Abb. 22, S. 66 und Kap. 3.1.6.3., S. 91).

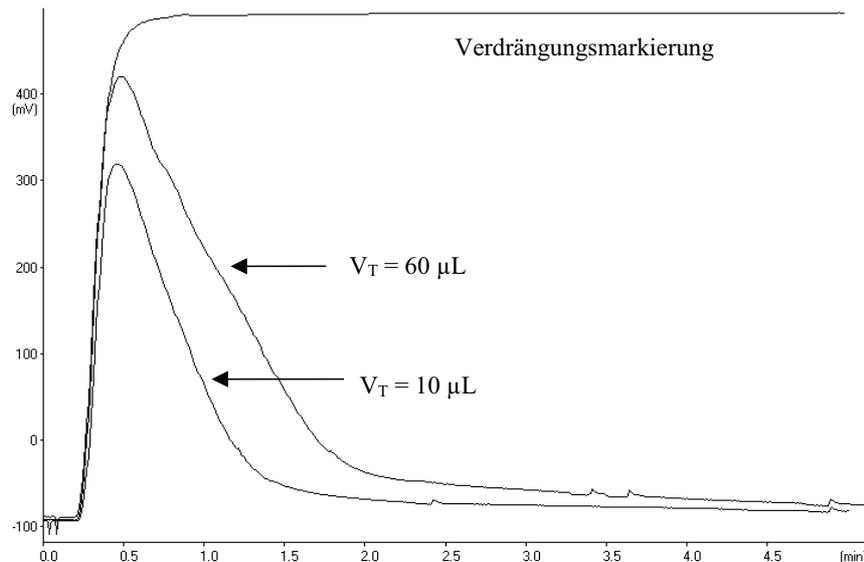


Abb. 31: Abhängigkeit der Dispersion vom Volumen der injizierten Probe (ohne Mischkammer).

\dot{V} : $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Tracer: NaOH ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$); Reaktorlänge: 1,3 m; Serpentina-Reaktor: 80 Windungen; d_w : 2 mm; ID_C : 0,5 mm; OD_C : 1,6 mm (PTFE); V_T : Tracervolumen.

3.1.2.5. Durchflussgeschwindigkeit

Mit zunehmender Durchflussgeschwindigkeit nimmt die Peakhöhe im untersuchten Bereich zu und die Bandenbreite ab (Abb. 32). Die Dispersion kann nach den durchgeführten Experimenten offensichtlich durch Erhöhung des Durchflusses wesentlich reduziert werden.

Das Ergebnis widerspricht scheinbar der Theorie, wonach ein erhöhter Durchfluss aufgrund eines laminaren Strömungsprofils eine erhöhte Dispersion bedeutet. Entgegen der Theorie ($\sigma = k \cdot \sqrt{F}$) nimmt jedoch die Dispersion im Experiment mit steigender Durchflussgeschwindigkeit ab. Dies dürfte auf den bereits angesprochenen Secondary-Flow-Effekten beruhen, wonach die radiale Diffusion selbst bei leichten Änderungen der Fließrichtung verstärkt wird. Das Tracervolumen beträgt in allen Fällen $60 \mu\text{L}$ und wird durch entsprechend kürzere Schaltzeiten bei höheren Durchflussgeschwindigkeiten eingestellt. Hieraus folgt, dass ein geringer Volumenstrom die gewünschten Vermischungseffekte fördert. Die damit erforderlichen längeren Analysenzeiten sind aber einerseits unerwünscht und erhöhen andererseits genauso wie zu große Volumenströme den Reagenzienverbrauch und wirken somit einem Hauptziel der Systementwicklung, eben die umweltschonende Auslegung mit sehr geringem Chemikalienverbrauch, entgegen. Eine Kompromissfindung ist daher erforderlich (Kap. 3.1.6.6.).

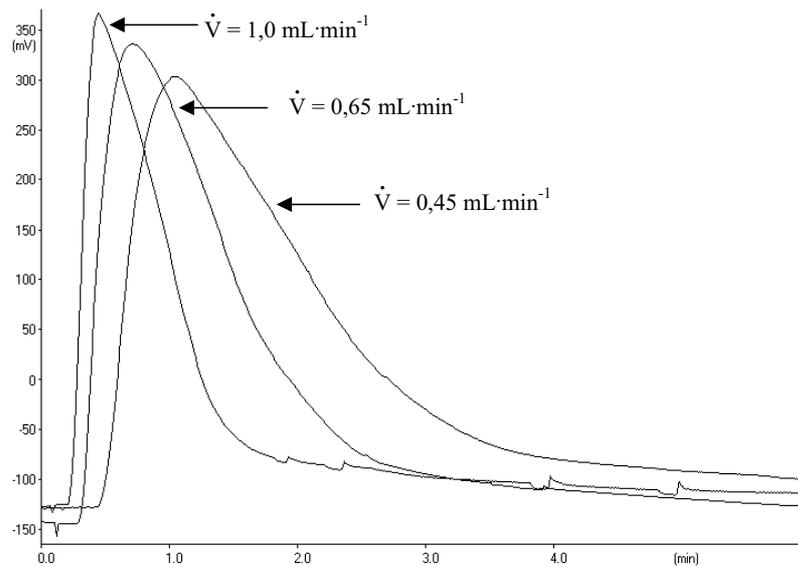


Abb. 32: Einfluss der Durchflussgeschwindigkeit auf die Dispersion (ohne Mischkammer).

Tracer: NaOH ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Reaktorlänge: 1,3 m; Serpentina-Reaktor: 80 Windungen; d_w : 2 mm; ID_C : 0,5 mm; OD_C : 1,6 mm (PTFE); Tracervolumen: 60 μL ; \dot{V} : Volumenstrom.

3.1.2.6. Konzentration des Tracers

Bei hohen Konzentrationen des injizierten Tracers machen sich starke Verschleppungseffekte bemerkbar (Abb. 33). Ursache dafür sind wahrscheinlich die schon erwähnten Totvolumina des Systems sowie mangelnde Diffusion an der Elektrodenoberfläche. Weiterhin besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Ordinate und dem Logarithmus der Aktivität der H_3O^+ -Ionen, d.h. der pH-Wert nimmt erst bei zehnfacher Verdünnung um eine Einheit ab.

Die Konzentration der zu untersuchenden Proben sollte demnach nicht zu groß sein und vor der Analyse eventuell durch Verdünnen gesenkt werden. So kann während der Titration eine gleichmäßige Dispersion des injizierten Plugs erfolgen und unerwünschte Verschleppungseffekte werden vermieden. Die für das System ermittelten Konzentrationsgrenzen sind in Kapitel 3.1.7.2. aufgeführt.

3.1.3. Erprobung verschiedener Pumpentypen

Neben der vorhandenen Schlauchpumpe werden weitere Pumpen geprüft. Es handelt sich ausschließlich um Pumpen wie sie in Personenwagen zur Reinigung der Front- und Heckscheiben verwendet werden (Scheibenwaschpumpen). Aufgrund der großen Stückzahlen ist dieser Artikel entsprechend preisgünstig. Die kompakte Bauweise ist bei allen Schei-

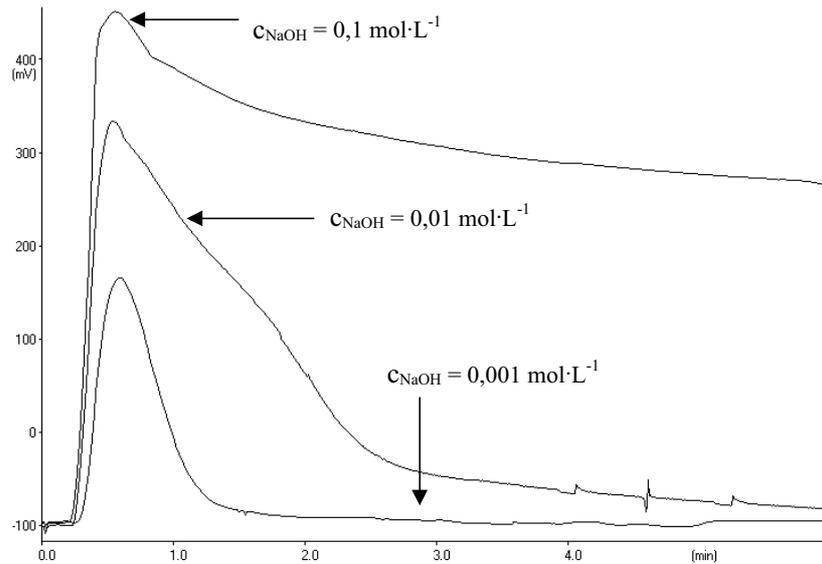


Abb. 33: Einfluss der Konzentration des Tracers auf die Dispersion (mit Mischkammer).
 \dot{V} : $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Tracer: NaOH; Tracervolumen: $10 \text{ }\mu\text{L}$; Mischkammervolumen: $40 \text{ }\mu\text{L}$.

benwaschpumpen gegeben. Zu Testzwecken werden gebrauchte Pumpen aus Altfahrzeugen verwendet. Gemeinsam ist allen Pumpen der angekoppelte Gleichstrommotor, der entsprechend der Bordspannung eines Personewagens mit 12 V betrieben wird. Die Abmessungen der Pumpen sind in etwa gleich, die Länge beträgt ca. 80 mm , der Durchmesser ca. 35 mm . Lediglich der Pumpenkopf weist unterschiedliche Maße auf. Aus der Auflistung in Kapitel 3.1.1.2. (Seite 70) lassen sich die unterschiedlichen Ausführungen ersehen.

Anhand eines Anforderungsprofils wird deren Eignung überprüft:

- Volumenstrom bei verschiedenen Spannungen;
- Förderverhalten bei Verwendung von Kapillarschläuchen;
- Verhalten bei Dauerbetrieb;
- Lauf mit Steuerprogramm;
- Resistenz gegenüber den geförderten Medien;
- Verschleiß nach längeren Testphasen;
- Verhalten bei Titrationsversuchen.

Anhand dieses Profils wird eine Beurteilung über die Tauglichkeit der einzelnen Pumpentypen erstellt.

3.1.3.1. Versuche mit Kreiselpumpen

Die verwendeten Kreiselpumpen, VDO Kienzle, Schwalbach am Taunus (interne Bez. 988) und Hella, Lippstadt, (interne Bez. A067) sind abgesehen vom Gehäuse baugleich. Die Pumpe von Hella hat lediglich ein zweiteiliges Gehäuse.

Der dreiflügelige Rotor der Kreiselpumpe liegt motorseitig auf einer Gummischeibe auf. Über das Saugrohr des Gehäuses wird dem Rotor das Medium axial zugeführt. Aus den Kammern, die sich zwischen den Rotorblättern und dem Gehäuse bilden, verlässt das Medium die Pumpe radial über den im Gehäuse sitzenden Druckstutzen. Die dreizackige Rotorverlängerung läuft im Saugrohr und reicht bis zu dessen Ende. Trotz der in Kapitel 2.2.3.2. genannten Nachteile, wie Schwankungen der Fördermenge bei sich veränderndem Vordruck, soll eine Tauglichkeitsprüfung durchgeführt werden. Die Nachteile können, wenn auch aufwendig, kompensiert werden. Der einfache Aufbau und die verwendeten Materialien lassen auf eine Beständigkeit gegenüber den zu fördernden Flüssigkeiten schließen.

Nach dem Anforderungsprofil wird die Förderleistung bei verschiedenen Spannungen gemessen. Hierbei werden flexible Kunststoffschläuche mit einem Innendurchmesser von 5 mm verwendet. Sowohl bei der Pumpe VDO 988 als auch bei der Hella A067 besteht kein linearer Zusammenhang zwischen Volumenstrom und angelegter Spannung. Der Vorversuch zeigt, dass die Pumpe Hella A067 bei gleicher Spannung durchwegs die höheren Förderraten liefert. Da es sich um gebrauchte Pumpen handelt, ist die Ursache in einem höheren Verschleiß der VDO-Pumpe zu vermuten. Der Versuch wird unter Verwendung von Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm wiederholt (Tab. 5). Damit verringert sich die Querschnittsfläche auf 1 % gegenüber der Verwendung der 5 mm-Schläuche.

Tab. 5: Volumenstrom der getesteten Kreiselpumpen in Abhängigkeit der angelegten Spannung (0,5 mm Kapillare).

	VDO 988	Hella A067
U [V]	\dot{V} [mL·min ⁻¹]	\dot{V} [mL·min ⁻¹]
5,0	5,08	8,22
4,0	2,96	4,72
3,5	1,70	3,61
3,0	1,05	2,20

Für die weiteren Versuche wird die Pumpe der Firma Hella verwendet, da sie offensichtlich in besserem Zustand ist. Beim Dauerbetrieb mit einer angelegten Spannung von 3,0 V zeigen sich keine Schwankungen im Volumenstrom. Nach einer Stunde beträgt er

nach wie vor $2,20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Der Motor erwärmt sich bei dieser geringen Spannung nur leicht, der gekapselte Pumpenkopf erwärmt sich nicht merklich. Dieser Punkt ist wichtig, weil v.a. die konduktometrische Titration stark temperaturabhängig sind. Beim Steuerprogramm wird ein Schalttakt von drei Sekunden zwischen Titrant und Probe gewählt. Die Schlauchlängen zu den Gefäßen sind gleich lang, trotzdem ergibt sich aus der unterschiedlichen Füllhöhe ein geringer Druckunterschied. Er beträgt bei einer Höhendifferenz von etwa 100 mm nur 10 mbar. Als Folge dessen schwankt der Volumenstrom um mehr als 100 %. Zusätzlich bilden sich Luftbläschen in den Kapillaren, nicht zuletzt deshalb, weil sich der Pumpenkopf nicht vollständig mit Flüssigkeit füllt. Die Verwendung von Schläuchen mit einem Innendurchmesser von 2 mm auf der Saugseite bringt keine bessere Füllung des Pumpenkopfes, die Förderraten ändern sich nur wenig und auch die Empfindlichkeit gegenüber Druckdifferenzen bleibt. Die Beständigkeit gegen die verwendeten Medien wird mit $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Salzsäure bzw. Natronlauge geprüft. Hierzu werden die Säure oder die Lauge zunächst mehrere Stunden gefördert, anschließend verbleibt das Medium ca. 30 Stunden im Pumpenkopf. Das Material der Pumpe ist, wie eine Untersuchung unter dem Mikroskop zeigt, weitgehend beständig gegen die verwendeten Säuren und Laugen. Es sind auch bei 50-facher Vergrößerung keine Beschädigungen der Oberfläche von Rotor oder Gehäuse erkennbar. Der nicht reproduzierbare Fluss bei Verwendung des Steuerprogramms schließt diesen Pumpentyp jedoch von einer späteren Verwendung aus. Bei Verwendung einer Zusatzeinrichtung zum Ausgleich der unterschiedlichen Vordrucke würde immer noch das Problem der unvollständigen Füllung des Pumpenkopfes bleiben. Daher erscheint es nicht erfolgversprechend eine Regelung des Förderstromes zu versuchen.

3.1.3.2. Versuche mit einer Zahnradpumpe

Als kompakte, preisgünstige Option soll eine Zahnradpumpe getestet werden. Es handelt sich um ein Produkt des Herstellers VDO Kienzle. Aktuell wird dieser Pumpentyp vom Hersteller nicht mehr verwendet.

Das angetriebene Messingzahnrad dreht ein Kunststoffzahnrad in die entgegengesetzte Richtung. Das über den oberen Kanal zugeführte Medium wird in den sich aus Zähnen und Gehäusewand bildenden Kammern zur Druckseite transportiert und verlässt die Pumpe über den unteren Druckkanal durch den Druckstutzen. Nach einer gründlichen Reinigung wird die Pumpe zunächst auf ihre Förderkonstanz hin überprüft. Zunächst wird mit flexiblen Schläuchen mit einem Innendurchmesser von 6 mm gearbeitet. Diese Schläuche entsprechen den im Auto verwendeten. Bei einer Spannung von 6,0 V liegt der Volumenstrom bei $566 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Als minimale Spannung werden 3,0 V ermittelt. Beim Dauerbetrieb, der sich über ca. 12 Stunden erstreckt, zeigt sich ein deutlicher Abfall der För-

derleistung. Da bei den verwendeten Materialien die Resistenz gegen Säuren und Laugen fraglich ist, wird dieser Punkt der Anforderungsliste vorgezogen. Wie erwähnt besteht eines der Zahnräder aus Messing. Üblicherweise wird zur Fertigung von Zahnrädern sprödes Messing verwendet. Der Verdrängerraum der Pumpe ist mit einer 1 mm starken Platte, die ebenfalls aus Messing gefertigt ist, abgedeckt, mit einer Gummidichtung versehen und einem gelbverzinkten Deckel verschlossen. Der Grund für das Abfallen der Förderleistung wird in einem erhöhten Verschleiß durch die aggressiven Medien vermutet. Als Probe bzw. Titrant werden verdünnte Salzsäure und Natronlauge verwendet. Beide haben eine Konzentration von ca. $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Eine Untersuchung unter dem Auflichtmikroskop zeigt bei 50-facher Vergrößerung deutliche Ätzspuren sowohl an der Messingplatte als auch am Zahnrad. Die rötliche Färbung der angegriffenen Bereiche deutet darauf hin, dass sich das Legierungselement Zink aus dem Messing herausgelöst hat. An den Zahnoberflächen ist der sichtbare Verschleiß geringer als an den Flanken. Das angetriebene Zahnrad aus Kunststoff zeigt bei 50-facher Vergrößerung nur geringen Verschleiß, die tragenden Flächen der Zähne sind glatt, lediglich an den Flanken zeigen sich kleinste Ausfranzungen. Um weitere Versuche machen zu können, müssten das Messingzahnrad und die Abdeckung ersetzt werden. Die Abdeckung kann leicht aus nichtrostendem Stahl, beispielsweise V2A-Stahl gefertigt werden. Das Zahnrad wird charakterisiert, um eventuell Ersatz aus einem besser geeigneten Material, z.B. Edelstahl, zu beschaffen. Das Modul und die Zähnezahzahl sind ausreichend, um ein Zahnrad eindeutig festzulegen. Das Modul ist das Verhältnis des Kopfkreisdurchmessers zur Zähnezahzahl + 2 [136]. Daraus ergibt sich ein Modul von 1 mm bei einer Zähnezahzahl von zehn Zähnen. Bei der benötigten Stückzahl ist nur eine Einzelanfertigung der Zahnräder möglich, die aus finanziellen Gründen nicht in Frage kommt. Aufgrund der Korrosion wird von einem Lauf mit Steuerprogramm und Titrationsversuchen abgesehen.

3.1.3.3. Versuche mit einer Drehflügelpumpe

Eine ebenfalls als Scheibenwaschpumpe eingesetzte Drehflügelpumpe des japanischen Herstellers Jideco wird anhand des Anforderungsprofils auf ihre Tauglichkeit hin überprüft.

Der in ein Kunststoffgehäuse eingepasste Verdrängerraum ist aus Silizium gefertigt und weist auf den Laufflächen eine glatte Oberfläche auf. Der elastische Rotor besteht aus Neopren und ist auf die Motorachse aufgesteckt. Ein Metallplättchen in der geschlitzten Achse sorgt für den nötigen Kraftschluss zwischen Welle und Rotor. Der Pumpenkopf wird mit einer Teflonscheibe, die ein gekrümmtes Langloch aufweist, abgedeckt. Eine Messingscheibe gleicher Form sorgt für ein glattes Aufliegen der ca. 0,6 mm starken Teflonscheibe. Vor dem mit drei Schrauben gehaltenen Deckel ist eine Dichtung, ebenfalls

mit Langloch, eingelegt. Die Förderflüssigkeit strömt durch den Ansaugstutzen im Deckel durch das Langloch axial in den Verdrängerraum. Die Einströmöffnung gibt etwa zwei Zellen frei. Der Druckstutzen liegt am Rand des Verdrängerraums.

Zur Reinigung der Pumpe wird die Flügelzellenpumpe zunächst unter Verwendung von Schläuchen mit einem Innendurchmesser von 5 mm gründlich mit deionisiertem Wasser gespült. Hierbei ergibt sich ein konstanter Volumenstrom von $1450 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ bei einer angelegten Spannung von 7,0 V. Der Volumenstrom der Pumpe Jideco 2 wird unter Verwendung von Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm gemessen. Unterhalb von 6,0 V ist ein Betrieb der Pumpe nicht möglich. In einer Reihe von zehn Messungen bei einer angelegten Spannung von 8,0 V ergibt sich ein Mittelwert von $5,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Der Variationskoeffizient liegt bei 2,6 %. Der Motor der Pumpe erwärmt sich nach etwa 10 – 15 min deutlich, die Stromaufnahme erhöht sich von 1,7 A auf 2,2 A. Nach 25 Minuten liegt die Gehäusetemperatur des Motors bei ca. 50°C . Die Pumpe ist selbstansaugend, Luftbläschen sind im Leitungssystem nicht zu sehen. Eine Titration mit Steuerprogramm und konduktometrischer Detektion ist grundsätzlich möglich, allerdings sind die Ergebnisse aufgrund fehlender Optimierung unbefriedigend. Bei der Titration von Salzsäure, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, mit einer gleich konzentrierten Natronlauge ergeben sich Fehler im zweistelligen Prozentbereich. Dennoch zeigen die Kurven von 48 durchgeführten Versuchen grundsätzlich die gewünschte Form. Der im Vergleich zu Schlauchpumpen etwa viermal höhere Volumenstrom hat keine negativen Auswirkungen auf die Form der Titrationskurven.

Die Erwärmung der Pumpe und der Anstieg der Stromaufnahme lassen vermuten, dass der Verdrängerraum der Pumpe nicht vollständig geflutet ist. Dadurch läuft die Pumpe teilweise trocken, was eine erhöhte Reibung und damit einen größeren Drehmomentbedarf des Motors verursacht. Der Motor braucht dadurch mehr Strom und erwärmt sich. Als Abhilfe werden alle Kapillaren gegen Schläuche mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm ausgetauscht. Die Querschnittsfläche steigt dadurch auf das 9-fache. Dabei ergibt sich bei einer angelegten Spannung von 7,0 V ein mittlerer Fluss von $19,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Bei dieser Förderrate ist der Reagenzienverbrauch zu groß. Auch bei diesem Durchsatz erwärmt sich die Pumpe deutlich, der Strombedarf steigt an.

Um die Widerstandsfähigkeit der Pumpe gegenüber den geförderten Medien zu beurteilen werden sowohl Natronlauge als auch Salzsäure, jeweils $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, über zwei Stunden hinweg gefördert, anschließend verbleibt die Säure bzw. Lauge ca. 30 Stunden in der Pumpe. Der Pumpenkopf wird mit Wasser gespült und demontiert. Unter dem Auflichtmikroskop erfolgt die Analyse des Verschleißes. Am Gehäusedeckel und der Dichtung sind keine Beschädigungen erkennbar. Auf der Messingscheibe sind im Bereich des Langlochs ähnliche Korrosionserscheinungen wie bei der Zahnradpumpe zu sehen. Die Teflonscheibe weist auf der dem Rotor zugewandten Seite deutliche, mit bloßem Auge erkennbare,

Riefen auf. Auf der Scheibe haften kleine Plättchen mit unregelmäßig geformten Rändern an. Es handelt sich um Abrieb der Drehflügel. Der Rotor selbst weist an den Flanken den größten Verschleiß auf, eine Fransenbildung ist zu erkennen. Die Laufflächen der Lamellen hingegen zeigen zwar etwas Abrieb aber keine Beschädigungen, die auf eine Reaktion mit dem Medium hinweisen. Auch bei 50-facher Vergrößerung sieht die Oberfläche der nicht mechanisch belasteten Teile einheitlich aus. Die Oberflächenstruktur sieht aus wie geprägtes Kunstleder. Wie bei der Kreiselpumpe Hella A067 ist auch bei der Flügelzellenpumpe die unzureichende Füllung des Verdrängerraums aufgrund zu geringer Förderraten das Hauptproblem. Insgesamt ist das Trockenlaufen der Pumpen aufgrund zu großer Volumina in den Pumpenköpfen der Hauptgrund warum die geprüften Scheibenwaschpumpen für den Einsatz im Autotitrator als bedingt geeignet erscheinen.

3.1.3.4. Schlauchpumpe S 1410, Firma Sykam, Eresing

Bei den getesteten Pumpen handelt es sich um Scheibenwaschpumpen für PKW, also Pumpen, die für eine völlig andere Anwendung konzipiert wurden. Die Preise für Pumpen dieses Typs liegen zwischen 50 und 86 Euro. Für den Laborbereich konzipierte Pumpen liegen preislich naturgemäß erheblich höher. Membranpumpen sind aufgrund der starken Pulsation von der Anwendung ausgeschlossen. Alle getesteten Pumpentypen sind problemlos über den Fachhandel zu beziehen, allerdings nicht mit derart geringen Förderraten. Erst ab Volumenströmen von $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ sind diese Pumpen erhältlich. Für den geforderten Durchfluss von $0,5 - 2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ bieten nur spezielle Firmen Pumpen an. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um Peristaltik- und Zahnrادpumpen. Für den zu entwickelnden Autotitrator wird daher auf die Schlauchpumpe S 1410, Firma Sykam, Eresing, zurückgegriffen, die sich bereits in einem dieser Dissertation vorangegangenen Projekt bewährt hat [137].

Schlauchpumpen finden im Laborbereich vielfältige Einsatzmöglichkeiten. Bei ihrer Verwendung müssen jedoch einige Eigenheiten berücksichtigt werden, um optimale Resultate zu erzielen. So ist die Pulsation dieses Typs nur durch die Verwendung eines Dämpfungssystems oder einer Mischkammer weitgehend zu beseitigen. Der Volumenstrom ist bei der verwendeten Pumpe nach oben begrenzt, der maximale Volumenstrom beträgt mit Doppelkopfausführung ca. $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($ID_{\text{Pumpenschlauch}}: 0,76 \text{ mm}$) bei einer maximalen Drehzahl von $42,4 \text{ min}^{-1}$. Über zwei Rändelschrauben wird der Anpressdruck auf die Schläuche eingestellt. Modelle mit starren Schrauben haben sich als ungeeignet erwiesen. Die Modelle mit gefederten Rändelschrauben sind besser geeignet, da sie Gleichlaufschwankungen des Pumpenkopfes kompensieren. Nachteilig wirkt sich auch aus, dass die Pumpenschläuche nur eine begrenzte Lebensdauer aufweisen. Die eingesetzten Schläuche PharMed SC0307, Firma Ismatec, Wertheim-Mondfeld, haben sich jedoch mit einer

durchschnittlichen Verwendbarkeit von 3 Monaten als ausreichend langzeitstabil erwiesen.

3.1.4. Titrationsen mit Linearisierung der Titrationskurven

Zu Beginn der Untersuchungen wird derart titriert, dass die einzelnen Stufen des Steuerprogramms in der Titrationskurve sichtbar sind. Es werden dazu nur wenige (10 – 20) Stufen gewählt und durch mehrere Schleifen (15 – 20) und großer Schleifendauer (ca. 12 s) das Volumen je Stufe erhöht. Durch diese Vorgehensweise ist das Detektorsignal bei einem gegebenen Volumenverhältnis von Titrant zu Probe einfach bestimmbar. Die Auswertung der Titrationskurven erfolgt anschließend durch graphische Auftragung der Volumenverhältnisse gegen das mit dem Verdünnungsfaktor berichtigte Stufensignal.

3.1.4.1. Konduktometrische Detektion

Als Probe wird zunächst Natronlauge mit einer bekannten Konzentration ($c(\text{NaOH})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) verwendet. Als Titrant wird Salzsäure ($c(\text{HCl})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) eingesetzt (Abb. 34). Für die Untersuchungen wird ein Fluss von $0,33 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ eingestellt. Die Optimierung der Variablen des Steuerprogramms ergibt ein Zeitfenster von 12 s, eine Anzahl der Wiederholungen der Zeitfenster (Anzahl der Schleifen) von 15 und eine Gesamtstufenzahl von 10. Bei diesen Einstellungen wird ein gut auswertbares und reproduzierbares Detektorsignal erhalten.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors werden die Werte graphisch aufgetragen (Abb. 35).

Der berechnete Schnittpunkt der beiden Äste entspricht analog der klassischen konduktometrischen Titration dem Äquivalenzpunkt. Das Verhältnis Titrant zu Probe am Äquivalenzpunkt dient zur Bestimmung der Konzentration der Probe. Die experimentell ermittelte Konzentration der Probe beträgt $0,096 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, die tatsächliche Konzentration der Vorlage $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Bei einer Messreihe mit 10 Bestimmungen ergibt sich ein Variationskoeffizient von 1,6 %. Das Ergebnis zeigt, dass die vorgesehene neue Methode prinzipiell anwendbar ist. Der Titrationsverlauf ist erwartungsgemäß durch die beiden Geraden charakterisiert.

3.1.4.2. Potentiometrische Detektion

Für die vorgesehene Auswertemethode nach Gran [37] wird die Elektrodensteilheit benötigt. Hierzu wird die pH-Einstab-Messkette mit drei den Messbereich abdeckenden Puffern kalibriert. Es werden sowohl der pH-Wert als auch das Elektrodenpotential aufgenommen. Die ermittelte Elektrodensteilheit beträgt 56,5 mV, der Messkettennullpunkt liegt bei pH 6,8.

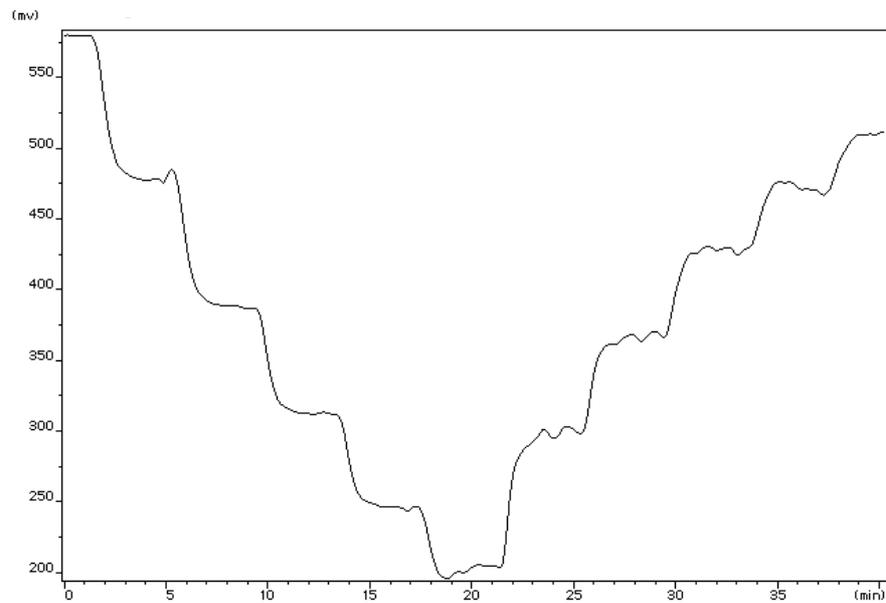


Abb. 34: experimentell ermitteltes Detektorsignal einer konduktometrischen Titration von Natronlauge.

$c(\text{NaOH})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Titrant: Salzsäure ($c(\text{HCl})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); \dot{V} : $0,33 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Einstellung des Steuerprogramms: Schleifenanzahl: 15, Zeitfenster (Schleifendauer): 12 s, Gesamtstufenzahl: 10.

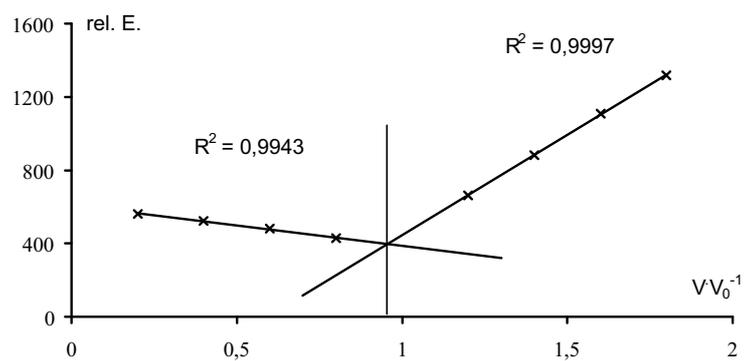


Abb. 35: graphische Auswertung der Messsignale der konduktometrischen Titration. Exp. Bedingungen wie Abb. 34.

Es wird untersucht, ob die Konzentration einer Probe mittels der potentiometrischen pH-Methode zufriedenstellend bestimmt werden kann. Hierfür wird als Probe Natronlauge mit einer bekannten Konzentration ($c(\text{NaOH}): 0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) verwendet. Als Titrant wird Salzsäure der Konzentration $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ eingesetzt. Für die Bestimmung wird ein optimaler Fluss von $0,33 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ gefunden. Die Variablen des Steuerprogramms werden folgendermaßen gewählt: die Anzahl der Schleifen beträgt 20, das Zeitfenster ist 12 s. Die Gesamtstufenzahl wird auf 20 festgelegt. Die Schaltung des Ventils wird derart programmiert, dass nur die Stufen 3 bis 8 und 12 bis 17 aufgenommen werden, d.h. die Titration beginnt bei Stufe 3, endet bei Stufe 17 und wird nach der 8. Stufe unmittelbar bei Stufe 12 fortgesetzt. Die Aufzeichnung der Werte im Bereich des Äquivalenzpunkts unterbleibt, da sie in der Gran-Funktion vernachlässigt werden [37]. Abbildung 36 zeigt die erhaltene Titrationskurve. Auf der y-Achse entsprechen pH-Werte kleiner 7 positiven mV-Werten, d.h. der pH-Wert nimmt von unten nach oben ab.

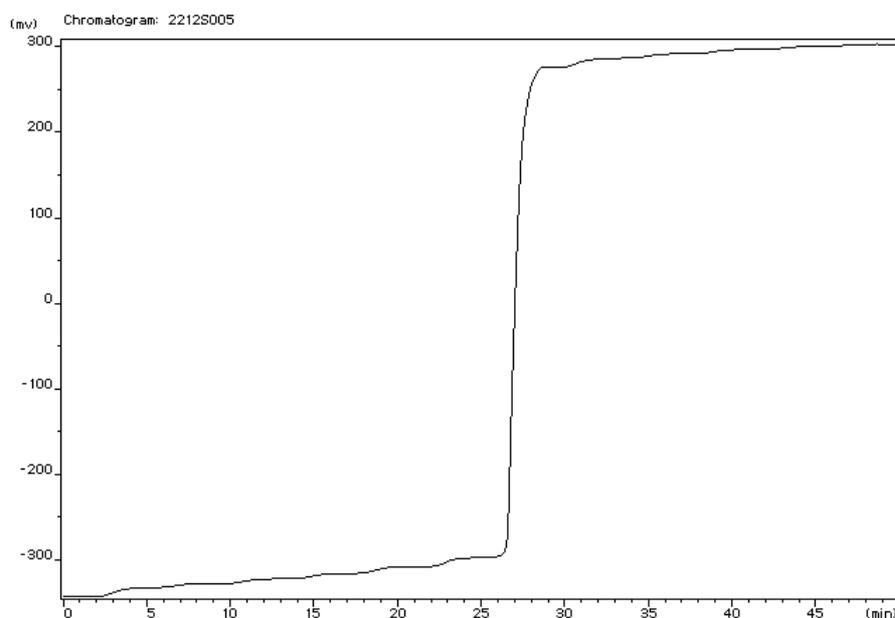


Abb. 36: experimentell ermitteltes Detektorsignal einer potentiometrischen Titration von Natronlauge.

$c(\text{NaOH}): 0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Titrant: Salzsäure ($c(\text{HCl}): 0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); $\dot{V}: 0,33 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Schleifenanzahl: 20, Schleifendauer: 12 s, Stufenanzahl: 20; aufgenommene Stufen: 3 – 8, 12 – 17 (siehe Text).

Bei der Auswertung nach Gran wird die Titrationskurve in eine lineare Form gebracht. Dazu wird die Nernst-Gleichung entlogarithmiert. Für die aufgenommenen Detektorsignale werden die zugehörigen Verdünnungsfaktoren (Glg. 59) und die zur Auswertung benötigten y-Werte (Glg. 60) experimentell bestimmt. Zur besseren graphischen Darstel-

lung werden die y-Werte normiert. Die Ermittlung des Schnittpunkts der beiden Äste kann rechnerisch und graphisch erfolgen. Dieser Schnittpunkt gibt das Volumenverhältnis Probe zu Titrant am Äquivalenzpunkt an.

$$f = \frac{V + V_0}{V_0} \quad (59)$$

$$y = f \cdot 10^{\frac{\Delta E}{S}} \quad (60)$$

Bei einer experimentell ermittelten und nach Gran ausgewerteten Titrationskurve von Natronlauge ($c(\text{NaOH}): 0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) mit Salzsäure ($c(\text{HCl}): 0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) werden die Messwerte zunächst linear approximiert (Abb. 37).

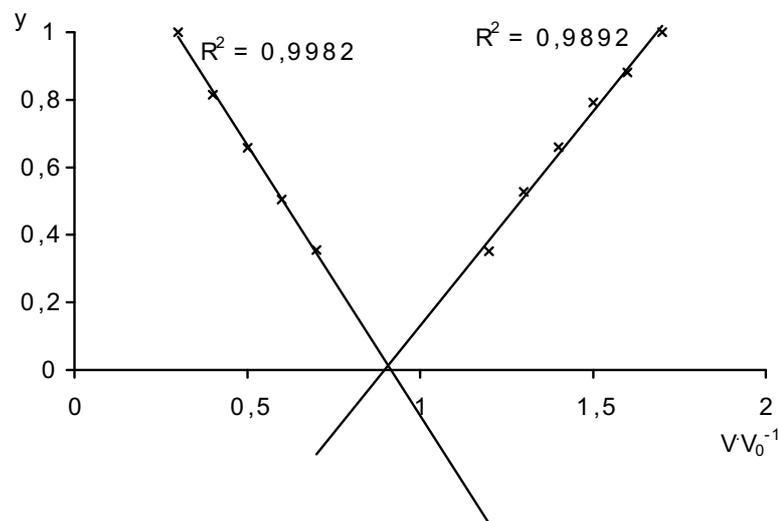


Abb. 37: lineare Approximation der nach Gran ausgewerteten Messdaten einer potentiometrischen Titration von Natronlauge.

Exp. Bedingungen wie Abb. 36.

Es ist keine zufriedenstellende Linearisierung möglich (Abb. 37). Die hieraus ermittelte Konzentration der Natronlauge beträgt $0,091 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, die vorgegebene jedoch $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Die Gründe hierfür dürften multiplikativ eingehende Faktoren sein, wie Verstärkungsfaktoren am Messinstrument, Aktivitätskoeffizient und Elektrodensteilheit. Diese weicht mit $56,5 \text{ mV}$ von der theoretischen Steilheit ($S = 59 \text{ mV}$) ab.

Zur Ermittlung der Streuung der experimentell ermittelten Volumenverhältnisse $V \cdot V_0^{-1}$ am Äquivalenzpunkt werden Messreihen mit jeweils 10 Messungen aufgenommen. Alle 10 experimentell ermittelten Werte liegen in der Streubreite $\pm 2\sigma$. Es ergibt sich damit ein Variationskoeffizient von $1,1 \%$.

Ein noch genaueres Ergebnis sollte erzielbar sein, wenn die Gran-Funktion nicht als Gerade, sondern als Orthogonalpolynom 2. Ordnung [37] approximiert wird (Abb. 38).

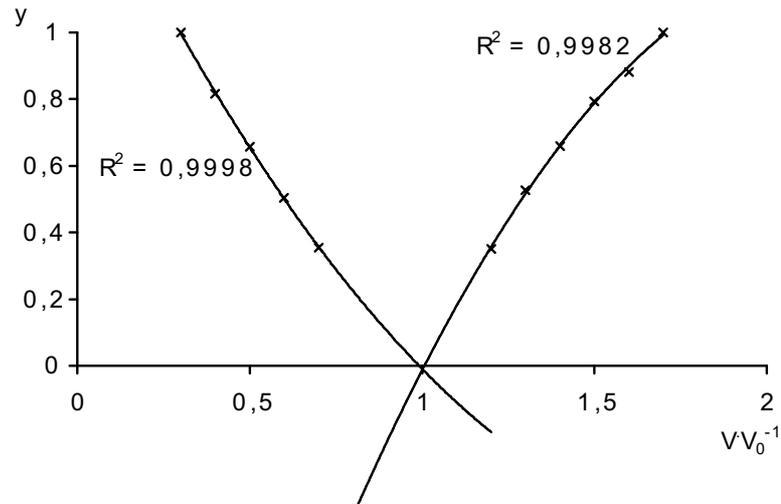


Abb. 38: orthogonalpolynome Approximation der nach Gran ausgewerteten Messdaten einer potentiometrischen Titration von Natronlauge.

Exp. Bedingungen wie Abb. 36.

Am Äquivalenzpunkt der Titrationskurve ergeben sich häufig Abweichungen von der Kurve. Diese systematischen Fehler können durch zeitabhängige Effekte und die Kinetik der Reaktion auftreten. Deshalb werden die nach Gran ausgewerteten Messdaten normiert und nur die normierten Werte zwischen 0,15 und 1,0 bei der weiteren Auswertung berücksichtigt (Abb. 38). Die experimentell bestimmte Konzentration der Natronlauge beträgt $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, die vorgegebene Konzentration entspricht ebenfalls $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Die Auswertung mit einem Orthogonalpolynom 2. Ordnung ist offensichtlich besser geeignet als eine lineare Annäherung. Dies wird auch durch einen Variationskoeffizienten für die Volumenverhältnisse am Äquivalenzpunkt von 1,03 % bestätigt.

Die neue Titrationstechnik mit potentiometrischer Detektion liefert Ergebnisse, die eine Präzision von mindestens drei Stellen garantieren. Damit werden die analytischen Aussagen hinsichtlich der Präzision in Bezug auf die klassischen Methoden offensichtlich deutlich verbessert.

3.1.5. Titrationsen mit kontinuierlichen Titrationskurven

Obwohl die Titrationstechnik mit anschließender Linearisierung der Titrationskurven sehr gute Ergebnisse liefert, birgt sie doch einige Nachteile. Zum einen ist die Titrationsdauer erheblich, zum anderen ist die Auswertung aufwendig und kompliziert. Damit die Methode Akzeptanz findet, muss sie demnach kurze Titrationszeiten aufweisen und einer einfachen Auswertung zugänglich sein. Durch eine Erhöhung der Stufen bei gleichzei-

tiger Verminderung des Stufenvolumens sollte dies realisierbar sein. Es werden dabei Titrationskurven erwartet, wie sie von gängigen Autotitratoren bekannt sind.

3.1.6. Optimierung der Parameter des Systems

Die Optimierung des Systems wird mit potentiometrischer Detektion durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich jedoch auf die anderen eingesetzten Detektionsarten übertragen.

Das vorliegende System besitzt sechs Freiheitsgrade:

- Stufenanzahl
- Schleifenanzahl
- Stufendauer
- Länge der Kapillare
- Durchflussgeschwindigkeit
- Mischkammervolumen

Diese Einflussgrößen können nicht unabhängig voneinander optimiert werden. Aus diesem Grund findet eine Optimierung der Systemparameter auf Basis der Eingabeparameter des Steuerungsprogrammes statt.

3.1.6.1. Stufenanzahl

Die Stufenanzahl bestimmt die Titrationsgenauigkeit. Wird die Titration in zu wenige Stufen unterteilt, entspricht der Wendepunkt der Kurve nicht dem Äquivalenzpunkt. Die Wahrscheinlichkeit einer Überbestimmung der Probe steigt, da der Äquivalenzpunkt übersprungen wird. Allerdings sind einer Erhöhung der Stufenanzahl durch das System physikalische Grenzen gesetzt. Das Magnetventil besitzt eine Schaltzeit von 25 ms, das Steuerungsprogramm eine Ungenauigkeit von ca. 10 ms. Eine zu hohe Stufenzahl führt zu minimalen Schaltzeitdifferenzen, die vom System nicht mehr aufgelöst werden können. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen, dass bei einer Titration, die einen Volumenverhältnisbereich Titrant/Probe von 0 bis 2 abdeckt, 100 Stufen bei einer Schleifendauer von 3 Sekunden zu den genauesten Ergebnissen führen. Eine Stufenanzahl von 100 führt zu einer Rasterung des Titrationsbereichs, die den systematischen durch das Steuerungsprogramm verursachten Fehler auf unter 1 % reduziert. Die Schleifendauer von 3 Sekunden kann nicht weiter verkürzt werden, da in diesem Fall die Schaltzeitdifferenzen gegen Ende der Titration bereits bei ca. 8 ms liegen.

3.1.6.2. Schleifenanzahl

Experimentreihen zeigen, dass es nicht notwendig ist, Schleifen zu wiederholen, um Titrationskurven in gewohnter Form zu erzeugen. Dies führt lediglich zu einer Verlängerung der Analysendauer und einem schleppenden Anstieg des Messsignals am Wendepunkt.

3.1.6.3. Schleifendauer

Eine längere Schleifendauer führt zu genaueren Ergebnissen, da ein langer Zeitraum besser in viele voneinander unterscheidbare Zeitabschnitte unterteilt werden kann. Allerdings verlängert sich die Analysendauer mit steigender Schleifenlänge. Bei einer Stufenanzahl von 100 bietet eine Schleifendauer von 3 Sekunden die besten Resultate bei einer Titrationsdauer von nur 5 Minuten. Die Schleifendauer muss auf die Stufenanzahl abgestimmt werden. Tabelle 6 zeigt, dass die Schaltzeitdifferenzen gegen Ende der Titration schon an die Grenzen des Systems stoßen.

Tab. 6: Ausschnitt der Schaltzeiten und Schaltzeitdifferenzen für den Titranten aus dem Steuerungsprogramm.

Stufe	Titrant [s]	Differenz [ms]	Stufe	Titrant [s]	Differenz [ms]
1	0,059		91	1,936	7,6
2	0,115	56,6	92	1,944	7,5
3	0,170	54,4	93	1,951	7,4
4	0,222	52,4	94	1,958	7,3
5	0,273	50,5	95	1,966	7,2
6	0,321	48,7	96	1,973	7,1
7	0,368	47,0	97	1,980	7,0
8	0,414	45,4	98	1,986	6,9
9	0,458	43,8	99	1,993	6,8
10	0,500	42,4	100	2,000	6,7

Volumenverhältnis (T/P) von 0 bis 2; Stufenanzahl: 100; Schleifendauer: 3 s; dargestellter Ausschnitt: Stufen 1 bis 10 und 91 bis 100.

3.1.6.4. Länge der Kapillare

Der Anteil der Kapillare an der Gesamtdispersion kann vernachlässigt werden, wenn eine Mischkammer verwendet wird. Ohne Mischkammer können zwar gute Titrationskurven erzeugt werden, allerdings erschwert ein starkes „Rauschen“ in der ersten Ableitung aufgrund unzureichender Vermischung die Auswertung. Kapillaren werden deswegen nur als

Verbindungsstücke zwischen Magnetventil, Mischkammer und Detektor eingesetzt. Die Gesamtlänge der Kapillaren im vorliegenden System beträgt 300 mm.

3.1.6.5. Mischkammervolumen

Das Mischkammervolumen muss auf Durchflussgeschwindigkeit und Schleifendauer abgestimmt werden. Bei einem Durchfluss von z.B. $1,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ und einer Schleifendauer von 10 Sekunden beträgt das Gesamtvolumen von Probe und Titrant in einer Schleife $300 \mu\text{L}$. Ohne eine ausreichend dimensionierte Mischkammer kann die gewünschte Dispersion nicht erreicht werden (Abb. 39).

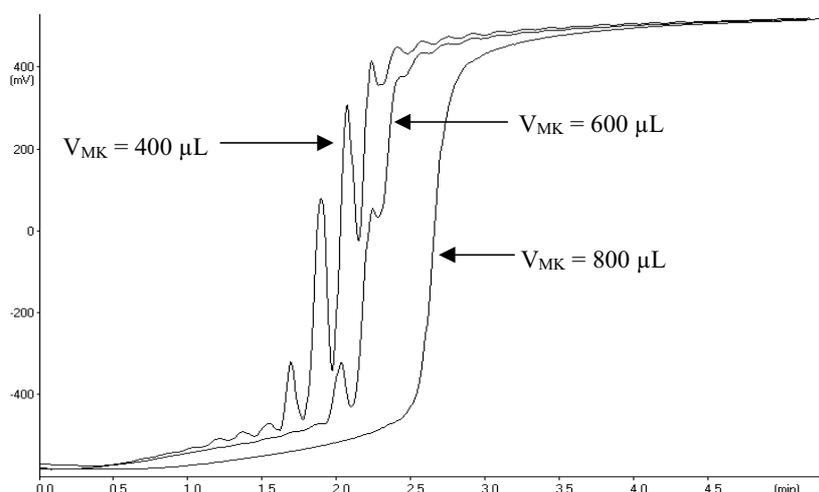


Abb. 39: Vermischungsprobleme bei nicht ausreichend dimensionierter Mischkammer. \dot{V} : $1,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 30; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 10 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2; V_{MK} : Mischkammervolumen.

In Abbildung 39 sind bei Verwendung einer gerührten Mischkammer mit einem Volumen von $400 \mu\text{L}$ noch deutliche Vermischungsprobleme in Form von Schwingungen zu erkennen, die mit steigendem Mischkammervolumen abnehmen. Ein Mischkammervolumen von $800 \mu\text{L}$ ermöglicht schließlich eine gleichmäßige, auswertbare Titrationskurve. Bei einem Fluss von $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ erweist sich ein Mischkammervolumen von $400 \mu\text{L}$ als optimal. Es werden deshalb in Folge stets, sofern nicht anders angegeben, Kammern mit einem Volumen von $400 \mu\text{L}$ verwendet.

3.1.6.6. Durchflussgeschwindigkeit

Die Durchflussgeschwindigkeit kann nach verschiedenen Gesichtspunkten optimiert werden. Eine niedrige Durchflussgeschwindigkeit führt zu einem sehr geringen Reagenzienverbrauch und erhöhter Dispersion. Allerdings erfordert das hohe Messzellenvolumen

des Detektors einen erhöhten Durchfluss, um Verschleppungseffekte zu vermeiden. Ein zu niedriger Volumenstrom führt zu einem schleppenden Übergang am Wendepunkt, und die erste Ableitung kann nicht zur Auswertung herangezogen werden. Eine Erhöhung des Durchflusses hat einen schärferen Wendepunkt zur Folge, allerdings treten ab einer bestimmten Geschwindigkeit (abhängig von der Größe der Mischkammer) Vermischungsprobleme in Form von Schwingungen auf, deren Periodendauer mit der Schleifendauer übereinstimmt (Abb. 40).

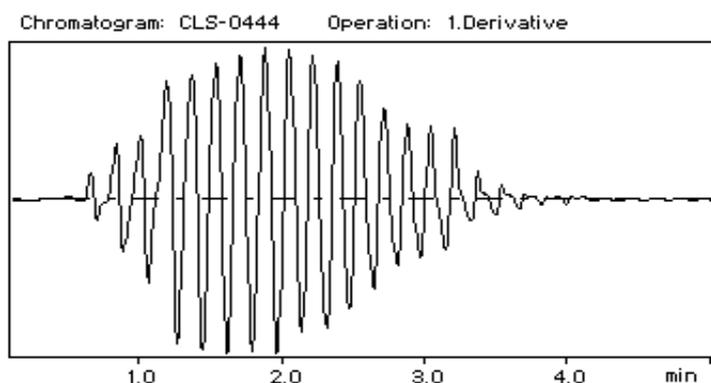


Abb. 40: erste Ableitung einer Titrationskurve mit Vermischungsproblemen bei zu hohem Durchfluss.

\dot{V} : $1,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Mischkammervolumen: $400 \mu\text{L}$; Stufenanzahl: 30; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 10 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Da das Steuerprogramm nur Volumenverhältnisse erzeugt, hat ein erhöhter Durchfluss auch erhöhte Volumina von injiziertem Titrant und Probe zur Folge, deren Vermischung ab einer gewissen Größe nicht mehr gewährleistet werden kann. Bei einem Mischkammervolumen von $400 \mu\text{L}$, einer Schleifendauer von 3 Sekunden, einer Stufenanzahl von 100 und einem Volumenverhältnis (T/P) von 0 bis 2 bietet eine Durchflussgeschwindigkeit von $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ die besten Ergebnisse. Der Titrantverbrauch beträgt hierbei lediglich $3,6 \text{ mL}$ je Analyse.

3.1.7. Systemvalidierung und Applikationsbeispiele

3.1.7.1. Ermittlung des Äquivalenzpunktes und der Probenkonzentration

Die Äquivalenzpunktbestimmung der Titrationskurve erfolgt über die Ermittlung des Wendepunktes bei potentiometrischer Detektion bzw. anhand des Schnittpunktes von Reaktions- und Überschussgerade bei konduktometrischen Titrationsen. Herkömmliche Titratoren können mit der bis zum Äquivalenzpunkt verbrauchten Menge an Reagenz sofort aufgrund der stöchiometrischen Umsetzung von Probe mit Titrant auf die Probenkonzentration rückschließen. Mit dem neuen on-line-Titrationssystem kann ebenso mit Hilfe

des Volumenverhältnisses von Titrant zu Probe am Äquivalenzpunkt die Probenkonzentration berechnet werden. In diesem Falle wird ausgenutzt, dass das Volumenverhältnis von Titrant zu Probe direkt proportional dem Verhältnis der Schaltzeiten ist (Glg. 61).

$$c_{Probe} = c_{Titrant} \cdot \frac{V_{Titrant, \ddot{A}P}}{V_{Probe, \ddot{A}P}} = c_{Titrant} \cdot \frac{Schaltzeit_{Titrant, \ddot{A}P}}{Schaltzeit_{Probe, \ddot{A}P}} \quad (61)$$

Um die bis zum Wendepunkt verstrichene Zeit dem tatsächlichen Volumenverhältnis am Äquivalenzpunkt zuordnen zu können, muss die Totzeit des Systems berücksichtigt werden. Die gemessene Totzeit geht als Korrekturgröße in die Berechnung der Probenkonzentration ein.

3.1.7.2. Konzentrationsgrenzen des Systems

Die Grenzen des Systems hinsichtlich der auswertbaren Konzentrationen werden durch die Messzellen bzw. Detektoren bestimmt. Bei der verwendeten pH-Elektrode liegt der Einsatzbereich zwischen pH 2 und 12. Daraus ergibt sich eine maximale Konzentration der Probe von $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Da der Wendepunkt jedoch von diesem Wert abweicht, können durchaus höher konzentrierte Proben gemessen werden. Elektroden mit größerem Messbereich sind problemlos in das System integrierbar. Bei der konduktometrischen Detektion ist die Obergrenze ebenfalls ca. $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bedingt durch die Bereiche der Detektoren. Einige Detektoren sind jedoch auch bis $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ einsetzbar. Diese Werte gelten für starke Protolyte wie Mineralsäuren. Bei organischen Proben kann die Konzentration durchaus höher gewählt werden, da es sich hier in der Regel um schwächere Protolyte handelt. Konzentrationen von bis zu $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sind in einigen Fällen möglich.

3.1.7.3. Ermittlung der maximalen Messfrequenz

Jede Titration dauert inklusive Totzeit etwa 6,5 min. Die Basislinie wird jedoch nicht unmittelbar nach Beendigung der Titration wieder erreicht. Während das potentiometrische System nur etwa 1,5 min braucht, um eine stabile Basislinie zu zeigen, ist das konduktometrische System etwas träger. Nach etwa 4 Minuten ist in beiden Systemen eine stabile Basislinie erreicht. Zusammen mit der Analysendauer ergibt sich ein Wert von 10,5 Minuten. Ein kleiner Sicherheitszuschlag von 1,5 Minuten erhöht die Gesamtzeit auf 12 Minuten. Damit ergibt sich eine Anzahl von mindestens 5 Titrations pro Stunde. Eine automatische Steuerung der Messfrequenz ist über das Steuerprogramm ohne weiteres möglich. In der Routineüberwachung bei annähernd bekanntem Äquivalenzpunkt sind deutlich mehr Bestimmungen möglich, da durch das neuartige Prinzip bei einem beliebigen Titrationsgrad gestartet werden kann.

3.1.7.4. Bestimmung der Totzeit

Die Totzeit des Systems ist die Zeitverzögerung von der Erzeugung eines bestimmten Volumenverhältnis im Ventil bis zum entsprechenden Signal am Detektor. Die Totzeit ist vorwiegend durch das Reaktions- und Totvolumen von Ventil, Mischkammer, Durchflusszelle und der Kapillaren begründet. Die Fließgeschwindigkeit hat demnach den größten Einfluss auf die Totzeit. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass weitere Phänomene, wie z.B. auch das Ansprechverhalten des Detektors (Kap. 3.1.2.2.) zur Totzeit beitragen. Die Bestimmung der Totzeit stellt einen kritischen Punkt der Bestimmungsmethode dar, da sie unmittelbar in die Auswertung mit eingeht.

Zur Ermittlung der Totzeit des Systems sind eine Reihe von Methoden verwendbar. Z.B. bieten sich eine Stoß- bzw. Verdrängungsmarkierung mit einem Tracer an. Eine Verdrängungsmarkierung von Probe nach Titrant bzw. Titrant nach Probe und anschließender Mittelwertbildung aus beiden Messungen hat sich dabei als geeignet erwiesen. Die Möglichkeit zur Totzeitbestimmung bei jeder Messung ergibt sich, wenn die Datenaufzeichnung nach Programmende ausreichend lange fortgesetzt wird. Nach Ablauf der Schaltsequenz wird auf kontinuierliche Förderung von Probe zurückgeschaltet. Da es aufgrund dessen zu einer charakteristischen Änderung des Detektorsignals kommt und die Gesamtlaufzeit des Programms leicht anhand der eingegebenen Parameter bestimmt werden kann, lässt sich aus der Differenz die Totzeit entnehmen. Insbesondere bei der photometrischen Titration hat sich diese Verfahrensweise als praktikabel herausgestellt. Ferner ergibt sich die Totzeit aus einer Titration von Kalibrierlösungen mit exakt bekannter Konzentration. Die Sollzeit des Umschlagpunktes ist hierbei durch das Steuerprogramm bekannt. Die Differenz aus tatsächlicher Zeit minus der Sollzeit ergibt die Totzeit. Diese Methode hat sich als die genaueste herausgestellt. Bei Veränderungen der Systemparameter, wie etwa der Fließgeschwindigkeit, ändert sich die Totzeit in entsprechender Weise. Es ist dann erforderlich die Totzeit neu zu bestimmen.

3.1.7.5. Titration von Salzsäure mit Natronlauge

Salzsäure bekannter Konzentration ($c(\text{HCl}): 0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) wird mit Natronlauge ($c(\text{NaOH}): 0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) titriert (Abb. 41) und potentiometrisch detektiert. Die Ergebnisse des neuen Titrationssystems werden in Tabelle 7 mit denen des Autotitrators DL 25, Firma Mettler-Toledo GmbH, Giessen, verglichen.

Das neuartige Titrationssystem erzeugt bei einer Titration von HCl mit NaOH typische Kurven mit sehr gut auswertbarer erster Ableitung. Die Qualität der Titrationskurven wird von kommerziellen Autotitratoren nicht übertroffen. Der Fehler des Ergebnisses von ca. 0,1 % mit einem Variationskoeffizienten von 0,4 % erfüllt die an eine Titration gestellten Anforderungen vollkommen [31].

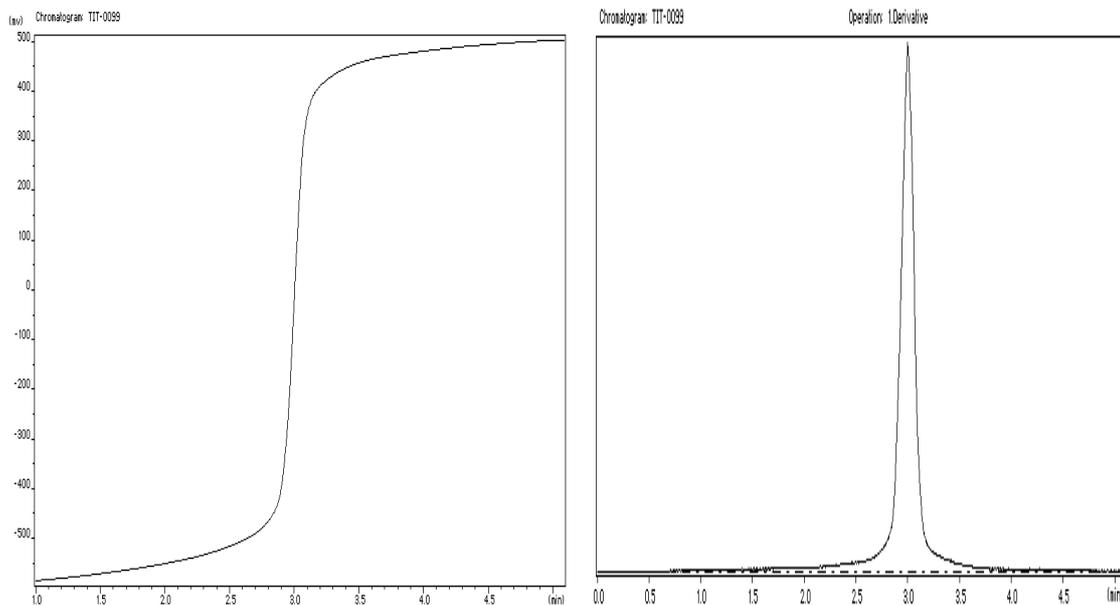


Abb. 41: potentiometrische Titration von Salzsäure mit Natronlauge und erste Ableitung der Titrationskurve.

$c(\text{NaOH})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{HCl})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Tab. 7: Vergleich der Ergebnisse des neuen Titrationssystems mit einem kommerziellen Autotitrator.

	neues Titrationssystem	Autotitrator
Mittelwert $c(\text{HCl})$ [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,1001	0,1000
Fehler	0,13 %	0,010 %
σ [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,43	0,030
Variationskoeffizient	0,4 %	0,03 %

Exp. Bedingungen wie Abbildung 41, 10 Messungen.

Alle Messwerte zur Ermittlung der Streuung befinden sich innerhalb eines Intervalls von 2σ . Unter der Voraussetzung, dass die gemessenen Werte normalverteilt sind, liegen innerhalb der Streubreite von $\pm 2\sigma$ 95,5 %, innerhalb der Streubreite von $\pm 3\sigma$ 99,7 % der Messwerte. Diese Streubereiche dienen in der Qualitätssicherung als Warn- bzw. Kontrollgrenze [138].

In Abbildung 42 ist eine konduktometrische Titration von Natronlauge mit Salzsäure dargestellt. Der Variationskoeffizient liegt bei 0,45 % ($n = 10$), der Fehler bei 0,04 %. Alle Messwerte liegen innerhalb von 2σ . Trotz des nicht ganz linearen Verlaufs v.a. der Reaktionsgeraden erweist sich die konduktometrische Detektion demnach als geeignet.

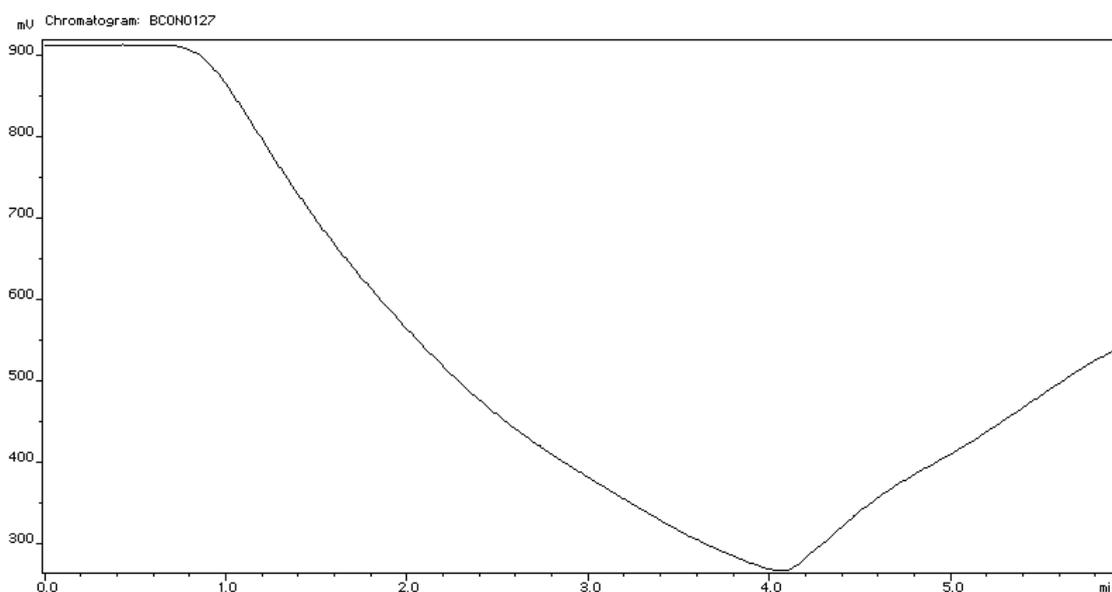


Abb. 42: konduktometrische Titration von Natronlauge mit Salzsäure.

$c(\text{NaOH})$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{HCl})$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

3.1.7.6. Titration von Hydrogencarbonat mit Salzsäure

Natriumhydrogencarbonat bekannter Konzentration ($c(\text{NaHCO}_3)$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) wird mit Salzsäure ($c(\text{HCl})$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) titriert (Abb. 43). Von einer konduktometrischen Titration wird aufgrund des schwachen Umschlagpunktes dieses Systems abgesehen. Die Ergebnisse des neuen Titrationssystems werden in Tabelle 8 mit denen des Autotitrators DL 25, Firma Mettler-Toledo GmbH, Giessen, verglichen.

Alle 10 Messwerte liegen innerhalb einer Streubreite von 2σ .

Sogar das komplizierte Kohlendioxid/Wasser-System kann mit Hilfe des Titrationssystems sehr gut erfasst werden. Die aufgrund des scharfen Umschlags am Wendepunkt

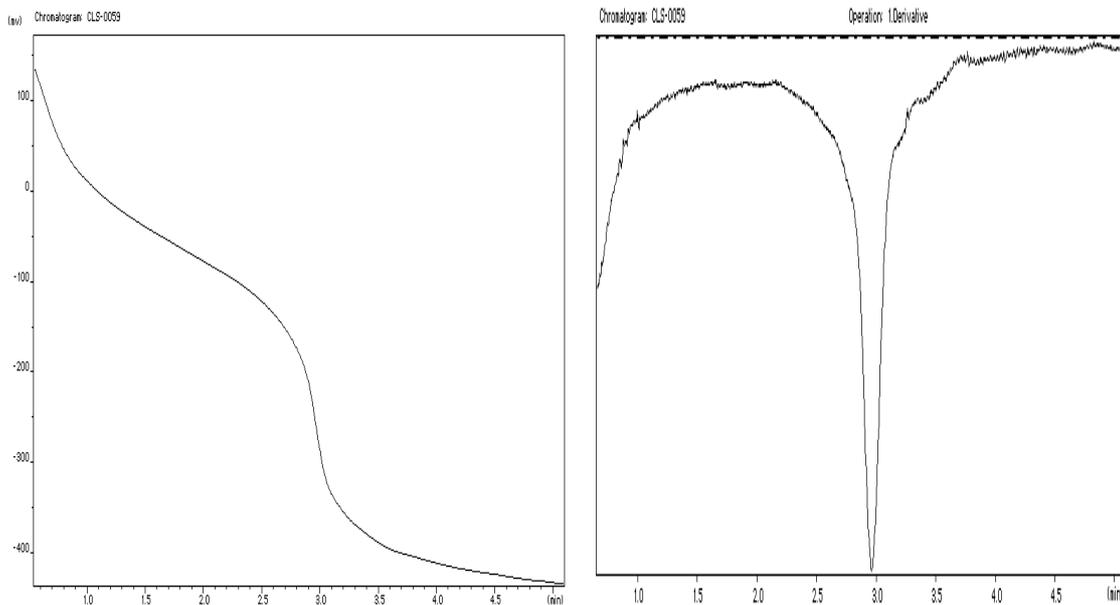


Abb. 43: potentiometrische Titration von Natriumhydrogencarbonat mit Salzsäure und erste Ableitung der Titrationskurve.

$c(\text{NaHCO}_3)$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{HCl})$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Tab. 8: Vergleich der Ergebnisse des neuen Titrationssystems mit einem kommerziellen Autotitrator.

	neues Titrationssystem	Autotitrator
Mittelwert $c(\text{NaHCO}_3)$ [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,0100	0,0100
Fehler	-0,2 %	-0,02 %
σ [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,04	0,03
Variationskoeffizient	0,4 %	0,3 %

Exp. Bedingungen wie Abbildung 43, 10 Messungen.

leicht auswertbare erste Ableitung ermöglicht eine genaue Bestimmung des Hydrogencarbonatgehalts selbst bei der niedrigen Konzentration von $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Der Fehler von nur 0,2 % bei einem Variationskoeffizienten von 0,4 % liegt im Bereich eines kommerziellen Autotitrators.

Entstehende Gasblasen (CO_2) werden bei Bedarf über eine Blasenfalle (BF in Abb. 20, S. 63) abgezogen.

3.1.7.7. Titration von Phosphorsäure mit Natronlauge

Phosphorsäure wird mit Natronlauge titriert (Abb. 44). Die Ergebnisse des neuen Titrationssystems werden in Tabelle 9 mit denen des Autotitrators DL 25, Firma Mettler-Toledo GmbH, Giessen, verglichen.

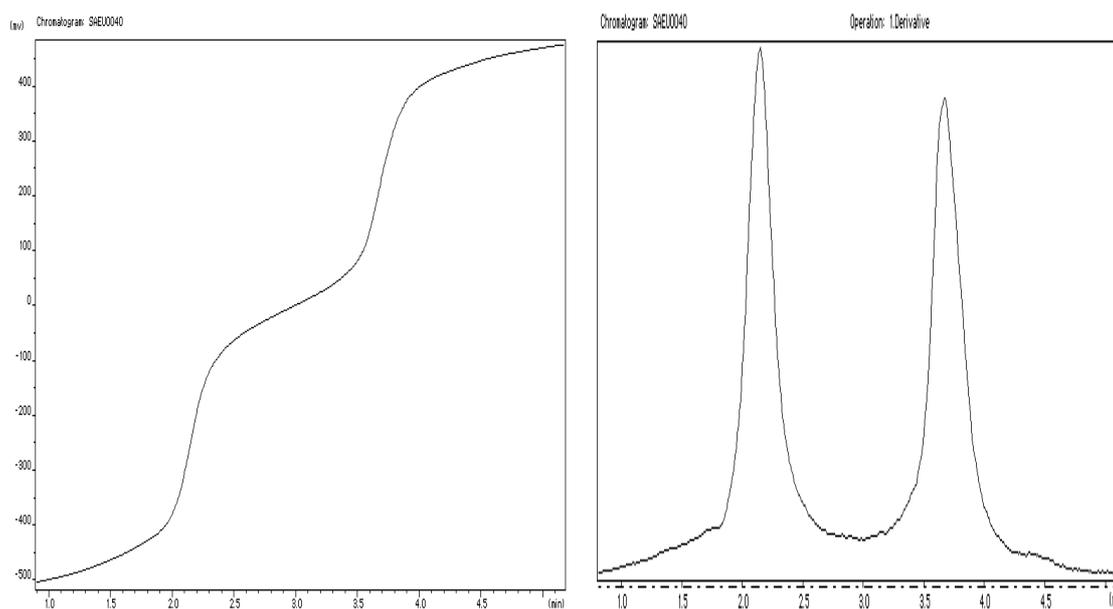


Abb. 44: potentiometrische Titration von Phosphorsäure mit Natronlauge und erste Ableitung der Titrationskurve.

$c(\text{H}_3\text{PO}_4)$: $0,06 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{NaOH})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Alle 10 Messwerte liegen innerhalb einer Streubreite von 2σ .

Die Leistungsfähigkeit des entwickelten Titrationssystems wird am Beispiel der Titration von Phosphorsäure als mehrwertigem Protolyten deutlich. Das aus drei Gleichgewichten bestehende System besitzt einen Pufferpunkt und drei Äquivalenzpunkte, von denen jedoch nur die ersten beiden analytisch verwertbar sind. Die Titrationsgenauigkeit ist im Mittel geringer als bei einer einwertigen Säure (theoretisch 0,3 %, praktisch höchstens 1 %) [31].

Tab. 9: Vergleich der Ergebnisse des neuen Titrationssystems mit einem kommerziellen Autotitrator.

	neues Titrationssystem	Autotitrator
Mittelwert $c(\text{NaHCO}_3)$ [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,0623	0,0621
σ [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,5	0,2
Variationskoeffizient	0,8 %	0,3 %

Exp. Bedingungen wie Abbildung 44, 10 Messungen.

Die Titration von Phosphorsäure liefert das gleiche Ergebnis wie der kommerzielle Autotitrator. Der Variationskoeffizient der Titration beträgt 0,8 %.

Die Phosphorsäure ($c(\text{H}_3\text{PO}_4)$: $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) wird ferner einer konduktometrischen Titration mit Natronlauge der Konzentration $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ unterworfen. Der erste Umschlagspunkt ($\text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{PO}_4^-$) ist gut auswertbar. Obwohl der zweite Umschlagspunkt noch sicher erkennbar ist, kann er nicht mit einer ausreichenden Sicherheit zur Auswertung herangezogen werden.

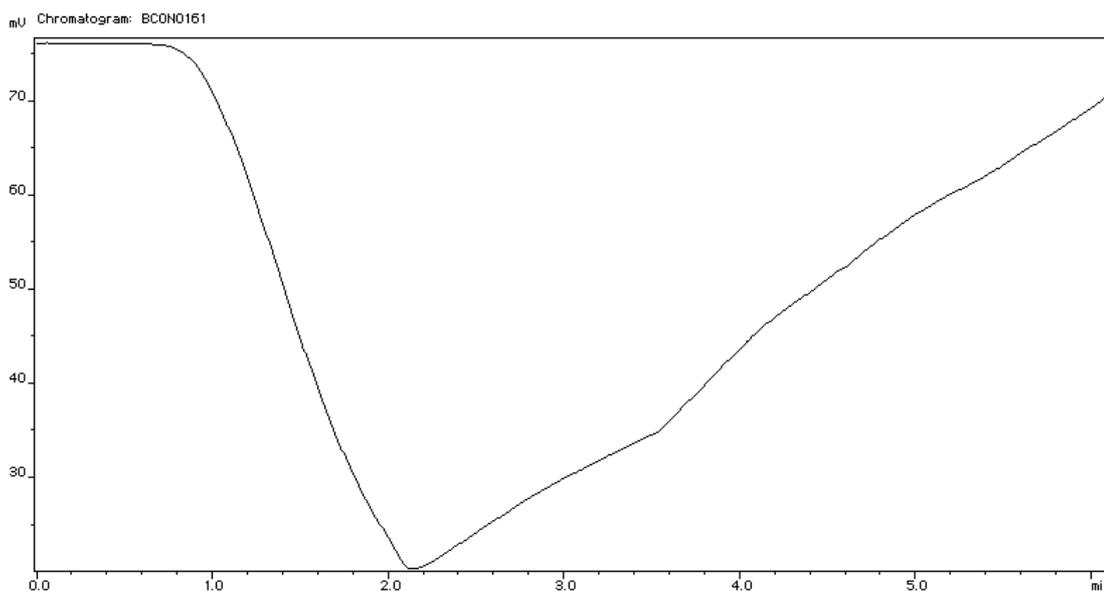


Abb. 45: konduktometrische Titration von Phosphorsäure mit Natronlauge.

$c(\text{H}_3\text{PO}_4)$: $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{NaOH})$: $0,1000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

3.1.7.8. Komplexbildungstiteration und Wasserhärtebestimmung

Die komplexometrische Titration der Erdalkaliumionen wird analog den entsprechenden DIN-Methoden [49, 50] durchgeführt. Hierzu werden die Lösungen auf einen geeig-

neten pH-Wert gepuffert, ein Indikator zugegeben und mit einer Lösung des Komplex-Reagenzes EDTA titriert. Dieses chelatometrische Titrationsmittel wird den entsprechenden Anforderungen gerecht: gute Löslichkeit, genügend große Reaktionsgeschwindigkeit mit dem zu bestimmenden Ion und Bildung eines leicht löslichen stabilen Chelatkomplexes unter Bildung mehrerer Koordinationsbindungen (mehrzähliger Ligand) [35]. EDTA verfügt über sechs koordinativ wirkende Atome (zwei Stickstoff- und vier einbindige Sauerstoffatome der Carboxylgruppe). Wegen der besseren Löslichkeit wird das Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure in Form des Dihydrats verwendet. Unter dem Handelsnamen Titriplex, Firma Merck, Darmstadt, ist eine bereits vorgefertigte Lösung erhältlich. Die Titrationsreaktion von EDTA mit einer Calcium- und/oder Magnesiumlösung verläuft stöchiometrisch und quantitativ. Dieser Komplex-Ligand bildet mit den Calcium- und Magnesiumionen einen starken 1:1-Komplex, so dass die Komplexbildung in einem Schritt verläuft und sich die Metallionenkonzentration am Äquivalenzpunkt schlagartig ändert. Der Sprung am Äquivalenzpunkt ist umso deutlicher, je größer die Bildungskonstante, d.h. die Stabilität des Komplexes ist [35].

Die Stabilitätskonstanten der Metall-EDTA-Komplexe, bei einer Temperatur von 20°C und der Ionenstärke 0,1, zeigen folgende Werte [139]:

$$Ca^{2+} : pK_{B,EDTA} = 10,7 \quad (62)$$

$$Mg^{2+} : pK_{B,EDTA} = 8,69 \quad (63)$$

Da bei der Bestimmung der Wasserhärte die Summe an gelösten Calcium- und Magnesiumsalzen von Interesse ist, wird zur Indikation des Endpunktes Eriochromschwarz T als Indikator verwendet [50]. Der Indikator bildet mit den Metallionen ebenfalls einen Chelatkomplex, der eine andere Farbe aufweist als der freie Indikator. Der Farbumschlag am Äquivalenzpunkt erfolgt durch den Zerfall des Metall-Indikator-Komplexes und das Auftreten der Farbe des freien Indikators. Die Stabilität des Mg^{2+} -Indikator-Komplexes ist dabei geringer als die des Mg^{2+} -EDTA-Komplexes aber groß genug, um einen scharfen Farbumschlag zu gewährleisten. Calcium kann im Gegensatz dazu nicht direkt mit Erio T als Indikator titriert werden, da die Stabilitätskonstante des Ca^{2+} -Indikator-Komplexes zu klein ist. Die Bestimmung ist aber durch Substitutionstitration möglich. Der Pufferlösung wird dazu gemäß DIN 38 406-E 3-3.6.3 [50] EDTA-Dinatrium-Magnesiumsalz zugesetzt. Die Stabilitätskonstanten der Metall-Indikator-Komplexe nehmen folgende Werte an [35]:

$$Ca^{2+} : pK_{B,ErioT} = 5,4 \quad (64)$$

$$Mg^{2+} : pK_{B,ErioT} = 7,0 \quad (65)$$

Der Farbumschlag erfolgt von rotviolett nach blau. Die Titration wird bei einem pH-Wert von 10 durchgeführt [50]. Die Aufzeichnung von Spektren des freien Indikators und des Metall-Indikator-Komplexes ergibt eine optimale Wellenlänge von 640 nm. Der Indikator und der Puffer werden gemeinsam über die optionale Reagenziumischung (Abb. 20, S. 63) dem Titrant/Probe-Gemisch zugeführt. Dadurch wird erreicht, dass der Gehalt an Indikator konstant bleibt, so dass ein gleichbleibender Absorptionshintergrund gewährleistet wird.

In Abbildung 46 ist exemplarisch eine photometrische Titration eines Calciumstandards mit EDTA dargestellt. Der Variationskoeffizient bezüglich der Zeiten bis zum Äquivalenzpunkt liegt bei 1,4 % ($n = 15$), der Fehler bei 0,86 %. Alle Messwerte liegen innerhalb von 2σ .

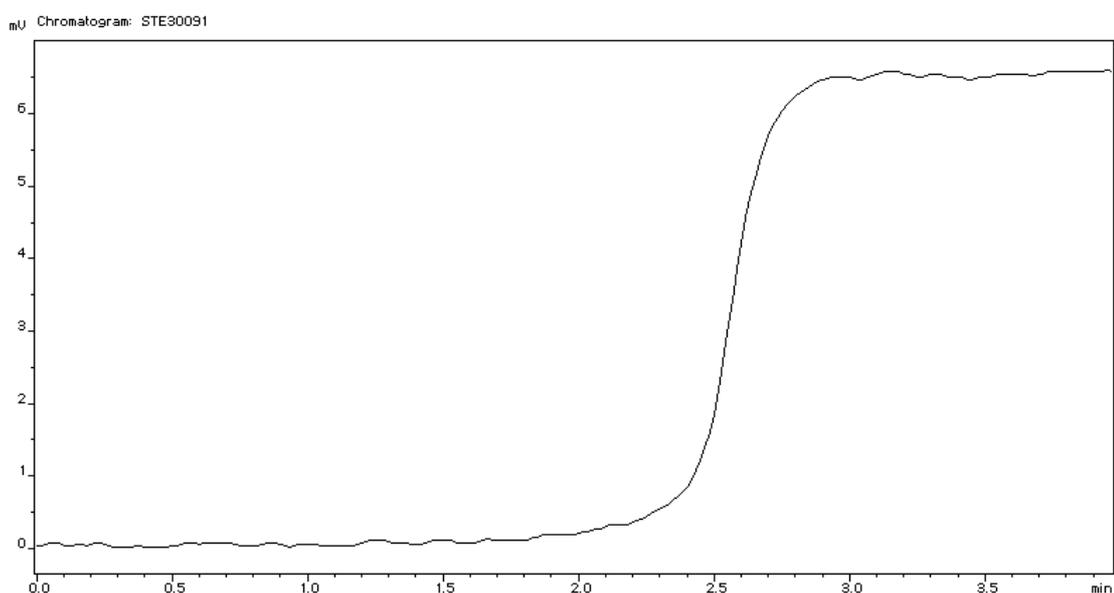


Abb. 46: photometrische Titration von Calcium mit EDTA.

$c(\text{Ca}^{2+})$: $1,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{EDTA})$: $1,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH = 10; Indikator: Eriochromschwarz T; $\dot{V} = 0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 2 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Als Realprobe wird ein Mineralwasser, Fortuna Quelle, Eichenzell analysiert. Das Ergebnis wird mit den auf dem Etikett angegebenen Daten verglichen. Dieses Mineralwasser scheint für die komplexometrische Titration der Wasserhärte mit Eriochromschwarz T und EDTA gut geeignet, da es stark enteist ist. Eine Störung durch Eisen wird daher nicht vermutet und daher auf die Zugabe von Natriumcyanid verzichtet.

Zur Abschätzung der einzusetzenden Konzentration an EDTA-Lösung werden die auf dem Etikett angegebenen Werte herangezogen: Calcium: $380 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Magnesium: $48 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Dies entspricht als Summe einer Konzentration von $11,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Die Pro-

be wird im Ultraschallbad entgast, 10fach verdünnt und mit einer EDTA-Lösung, $1,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, in einer Versuchsreihe von 10 hintereinander durchgeführten Einzelmessungen titriert. In Abbildung 47 ist einer Overlaygrafik der Titrationskurven dargestellt.

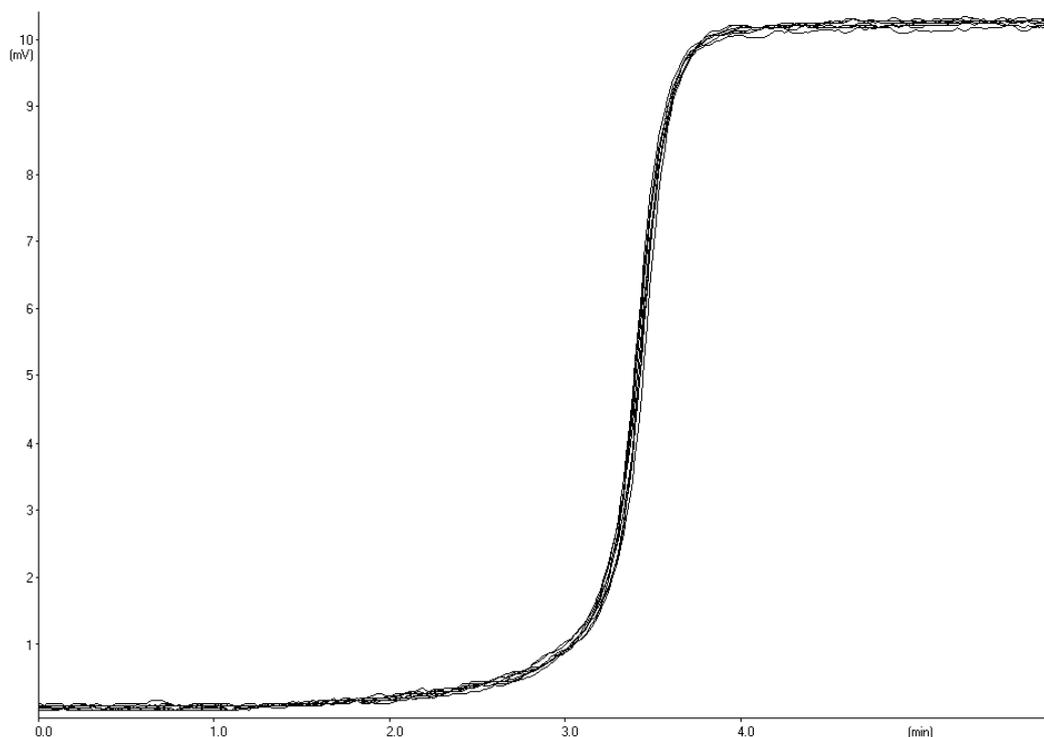


Abb. 47: Overlaygrafik von 9 komplexometrischen Titrationen eines Mineralwassers mit EDTA.

Verdünnung des Mineralwasser: 1:10, $c(\text{EDTA})$: $1,00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{pH} = 10$; Indikator: Eriochromschwarz T; \dot{V} : $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Alle ermittelten Messwerte liegen innerhalb einer Streubreite von 2σ , der Variationskoeffizient beträgt 0,7 % und liegt damit deutlich unterhalb der DIN-Forderung. Die Summe an Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen wird zu $11,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ermittelt, die Abweichung zur Etikett-Angabe beläuft sich damit auf 1,9 %. Da hierbei noch etwaige Verdünnungsfehler und Schwankungen der Mineralwasserzusammensetzung zu berücksichtigen sind, kann dieser Wert als sehr gut angesehen werden. Die Methode stellt damit ihre Eignung zur Untersuchung der Wasserhärte unter Beweis.

3.1.7.9. Bestimmung der Säurekapazität ($K_{S4,3}$)

Zur Bestimmung der Säurekapazität $K_{S4,3}$ wird nach DIN 38409 Teil 7 [52] eine Endpunkttitration bis zum pH-Wert 4,3 vorgeschrieben. Da das Steuer- und Auswertpro-

gramm der neu entwickelten Methode diesen pH-Wert mit einschließt, entfällt eine Endpunkttitration. Das dem pH-Wert 4,3 entsprechende Elektrodenpotential wird mit Hilfe einer Kalibrierkurve der Messkette experimentell bestimmt.

Bestimmung der Säurekapazität einer Hydrogencarbonat-Lösung

Es wird untersucht, ob die Säurekapazität einer Probe mit Hilfe des neuen on-line-Titrationssystems zufriedenstellend experimentell bestimmt werden kann. Hierfür wird eine Natriumhydrogencarbonatlösung der Konzentration $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mit Salzsäure der Konzentration $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ titriert (Abb. 48). Die Ergebnisse des neuen Titrationssystems werden in Tabelle 10 mit denen des Autotitrators Mettler DL 25 verglichen.

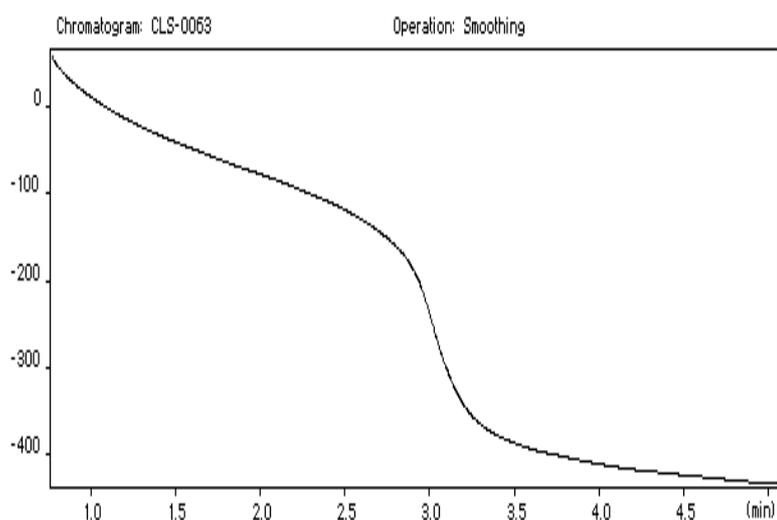


Abb. 48: Titrationskurve einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung zur Bestimmung der Säurekapazität $K_{S4,3}$.

$c(\text{NaHCO}_3)$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Titrant: HCl, $c(\text{HCl})$: $0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Tab. 10: Vergleich des neuen Titrationssystems mit einem kommerziellen Autotitrator anhand einer Säurekapazitätsbestimmung.

	neues Titrationssystem	Autotitrator
Mittelwert $K_{S4,3}$ [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	10	10
Standardabweichung [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,045	0,006
Variationskoeffizient	0,5 %	0,1 %

Exp. Bedingungen wie Abbildung 48; 10 Messungen.

Alle 10 Messwerte liegen innerhalb einer Streubreite von 2σ .

Das entwickelte Titrationssystem ermöglicht eine einfache und schnelle Bestimmung der Säurekapazität einer NaHCO_3 -Lösung mit einem Variationskoeffizienten von lediglich 0,5 % und erzielt das gleiche Ergebnis wie die aufwendigere Messung nach der DIN-Vorschrift [52].

Bestimmung der Säurekapazität einer Flusswasserprobe

Die Anwendbarkeit des entwickelten Systems auf das vorgesehene Einsatzgebiet in der Gewässerüberwachung wird überprüft. Zu diesem Zweck werden die Säurekapazität $K_{S4,3}$ einer Flusswasserprobe bestimmt und die Ergebnisse mit denen des Autotitrators Mettler DL 25 verglichen (Tab. 11).

Tab. 11: Vergleich des neuen Titrationssystems mit einem kommerziellen Autotitrator anhand einer Säurekapazitätsbestimmung.

	neues Titrationssystem	Autotitrator
Mittelwert $K_{S4,3}$ [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	4,7	4,6
Standardabweichung [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,028	0,003
Variationskoeffizient	0,6 %	0,1 %

Probe: Flusswasser, Pegnitz, Nürnberg 05.09.2000; 10 Messungen.

Alle 10 Messwerte liegen innerhalb einer Streubreite von 2σ .

Mit Hilfe des neu entwickelten Titrationssystems kann die Säurekapazität einer sog. „Realprobe“ (Pegnitzwasser, Nürnberg 05.09.2000) einfach und schnell bestimmt werden. Der Variationskoeffizient der Messung beträgt nur 0,6 % und es werden im Vergleich zur Bestimmung nach DIN [52] identische Werte erhalten. Das neuartige on-line-Titrationssystem eignet sich somit für den Einsatz im Bereich der Gewässerüberwachung.

3.1.7.10. Titrationsen von biochemischen Proben

Um die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Autotitrators zu belegen, sollen organische Säuren titriert werden. Im Bereich der Biochemie bieten sich Aminosäuren als Bausteine von Proteinen an, die in der belebten Natur überall anzutreffen sind. Aufgrund der Zwitterionenstruktur ergeben sich für neutrale Aminosäuren zwei, für saure und basische Aminosäuren drei pK-Werte. In Tabelle 12 sind drei Aminosäuren mit ihren pK-Werten zusammengestellt [140].

Die Titrationskurven der Aminosäuren hängen von deren Struktur bzw. der Struktur des Restes (R) ab. Eine in Wasser gelöste, neutrale Aminosäure liegt praktisch nur in der Zwit-

Tab. 12: pK-Werte einer neutralen, sauren und basischen Aminosäure im Vergleich [140].

	Glycin	L-Glutaminsäure	L-Arginin
Typ	neutral	sauer	basisch
pK ₁ , α-COOH	2,34	2,19	2,17
pK ₂ , α-NH ₃ ⁺	9,6	9,67	9,04
pK _R , R	—	4,25	12,48

terionenstruktur vor. Die Carboxylgruppe ist vollständig dissoziiert, während die Amino-
gruppe protoniert ist. Die Gesamtladung des Systems ist demnach null. In der Lösung
stellt sich der pH-Wert des isoelektrischen Punktes ein. Er lässt sich aus den pK-Werten
berechnen. Analog lassen sich die Werte für saure und basische Aminosäuren berech-
nen [141].

$$pH = \frac{pK_1 + pK_2}{2}, \quad (\text{neutrale Aminosäuren}) \quad (66)$$

$$pH = \frac{pK_1 + pK_R}{2}, \quad (\text{saure Aminosäuren}) \quad (67)$$

$$pH = \frac{pK_2 + pK_R}{2}, \quad (\text{basische Aminosäuren}) \quad (68)$$

Daraus ergeben sich für die in Tabelle 12 aufgeführten Aminosäuren folgende pH-Werte:
Für Glycin ist der resultierende pH-Wert etwa 6 also im neutralen Bereich. Bei Arginin
ist er etwa 11. Glutaminsäure ist in reinem Wasser schlecht löslich, löst sich aber gut
in Salzsäure. Für eine 0,2 mol·L⁻¹ Lösung ist daher der resultierende pH-Wert unter 1.
Um bei der Titration alle Wendepunkte erfassen zu können müssen die neutrale und die
basische Aminosäure vor der Titration mit Säure bzw. Lauge auf die entsprechenden pH-
Werte eingestellt werden.

Nachfolgend wird die potentiometrische Detektion der konduktometrischen vorgezogen,
da sich erstere als deutlich überlegen gezeigt hat. Die Konduktometrie ist zwar prinzipiell
einsetzbar, weist jedoch aufgrund der schwachen Umschlagspunkte eine gewisse Unsi-
cherheit auf. Im Gegensatz zu den oben gezeigten Titrationskurven ist bei allen nachfol-
genden die pH-Skala durch eine Umpolung der Messkabel umgedreht, d.h. der pH-Wert
nimmt von unten nach oben ab.

Titration einer neutralen Aminosäure

Glycin wird mit Natronlauge der Konzentration 0,2000 mol·L⁻¹ titriert. Um alle Wende-
punkte zu erfassen, d.h. die vollständige Titrationskurve zu erhalten, wird die Probelösung

mit Salzsäure auf pH 1,5 eingestellt. Die Ergebnisse einer Messreihe von 10 Messungen sind mit einem Variationskoeffizienten von 0,96 % hinreichend genau. Abbildung 49 zeigt die Titrationskurve des Glycins und deren erste Ableitung bei potentiometrischer Detektion. Mit konduktometrischer Detektion ergeben sich keine gut auswertbaren Titrationskurven.

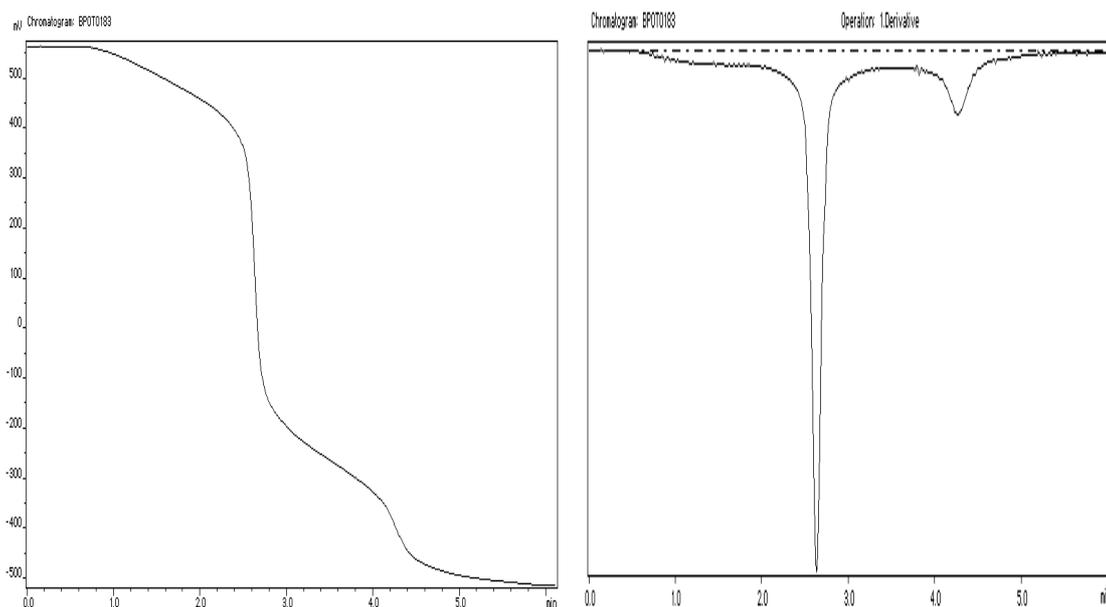


Abb. 49: Titration von Glycin mit Natronlauge und erste Ableitung der Titrationskurve. $c(\text{Glycin}): 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{NaOH}): 0,2000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $\dot{V}: 1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

In Abbildung 49 sind die Pufferbereiche des Glycins gut zu erkennen. Die den pH-Werten entsprechenden mV-Werte stimmen gut mit den in Tabelle 12 aufgeführten Literaturwerten überein.

Titration einer basischen Aminosäure

L-Arginin löst sich in Wasser gut, der resultierende pH-Wert beträgt etwa 11. Um alle Wendepunkte zu erfassen wird der pH-Wert der Lösung mit Natronlauge auf 12,5 eingestellt. In Abbildung 50 ist die Titrationskurve des L-Arginins sowie die erste Ableitung mit potentiometrischer Detektion dargestellt. In einer durchgeführten Messreihe von 10 Messungen liegt der Variationskoeffizient bei 0,77 %. Auch beim Arginin stimmen die Pufferbereiche mit den Literaturwerten gut überein.

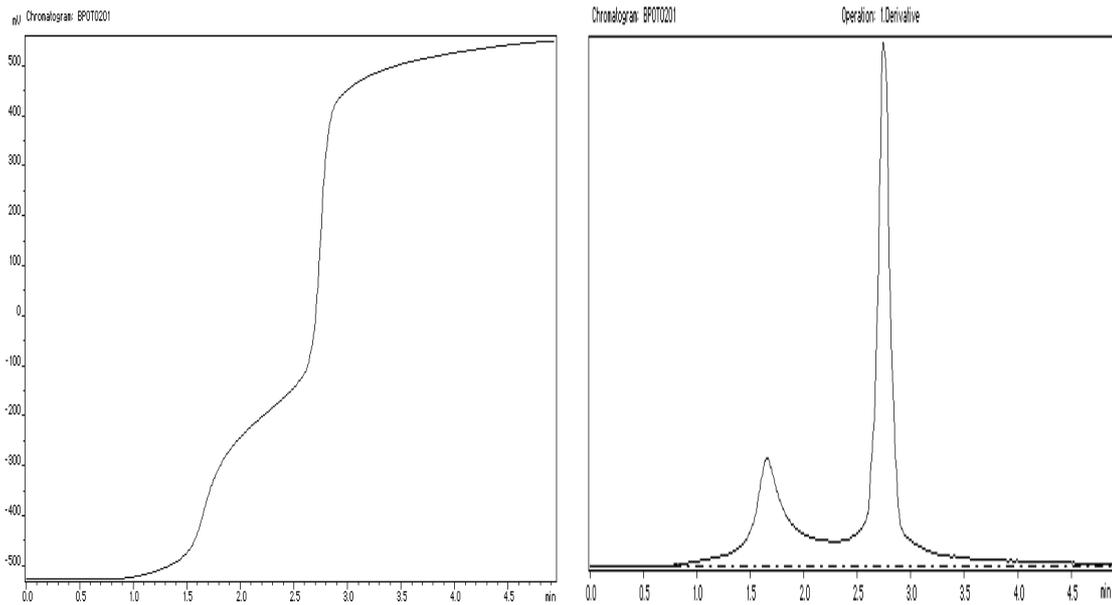


Abb. 50: Titration von L-Arginin mit Salzsäure und erste Ableitung der Titrationskurve. $c(\text{L-Arginin})$: $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{HCl})$: $0,2000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Titration einer sauren Aminosäure

Als Vertreter der sauren Aminosäuren wird L-Glutaminsäure gewählt. Da sich Glutaminsäure nicht gut in Wasser löst, dient Salzsäure, $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, als Lösungsmittel. Als Titrant wird Natronlauge, $0,5000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, verwendet. Abbildung 51 zeigt die Titrationskurve der L-Glutaminsäure und die erste Ableitung der potentiometrischen Detektion. Der Variationskoeffizient einer durchgeführten Messreihe von 10 Messungen liegt bei 0,12 %.

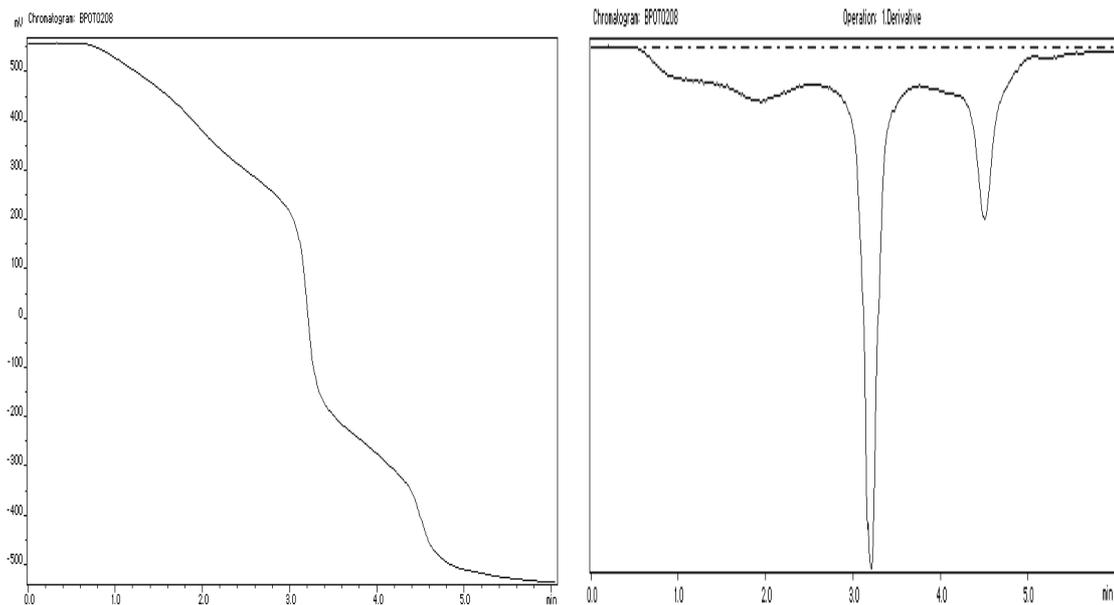


Abb. 51: Titration von L-Glutaminsäure mit Natronlauge und erste Ableitung der Titrationskurve.

$c(\text{L-Glutaminsäure})$: $0,2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{NaOH})$: $0,5000 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Titration eines Proteins

Der Autotitrator ist in der Lage auch biochemische Substanzen nachzuweisen, für deren Analytik normalerweise keine Titrationsverfahren verwendet werden. Dazu gehören zweifellos Proteine. Im Fall des Ovalbumins (Albumin aus Hühnereiweiß) konnte in der Literatur eine Vergleichskurve gefunden werden [142]. Albumin aus Hühnereiweiß hat eine mittlere molare Masse von $46000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Bedingt durch die Vielzahl an funktionellen Gruppen in diesem Molekül ist es nicht möglich mit einer Titration direkt auf die einzelnen Gruppen zu schließen. Im Ovalbumin sind Carboxyl-, Imidazol-, und Aminogruppen enthalten. Eine quantitative Auswertung ist somit an dieser Stelle nicht möglich. Dennoch kann überprüft werden, ob zumindest der Kurvenverlauf der in der Literatur gezeigten Kurve entspricht [142]. Für die Versuchsreihe werden $1,04 \text{ g}$ Ovalbumin in 200 mL Wasser gelöst und mit Salzsäure auf $\text{pH} = 2,3$ eingestellt. Ovalbumin löst sich in einer gelblich trüben Lösung, auf der Oberfläche bildet sich eine Schaumschicht. Titriert wird mit einer NatronlaugeLösung, $0,0200 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Abbildung 52 zeigt die Titrationskurve von Ovalbumin und deren erste Ableitung.

Die in Abbildung 52 dargestellte Kurve entspricht der in der Literatur dargestellten Titrationskurve. Auch die Lage des Äquivalenzpunktes und die Pufferbereiche stimmen

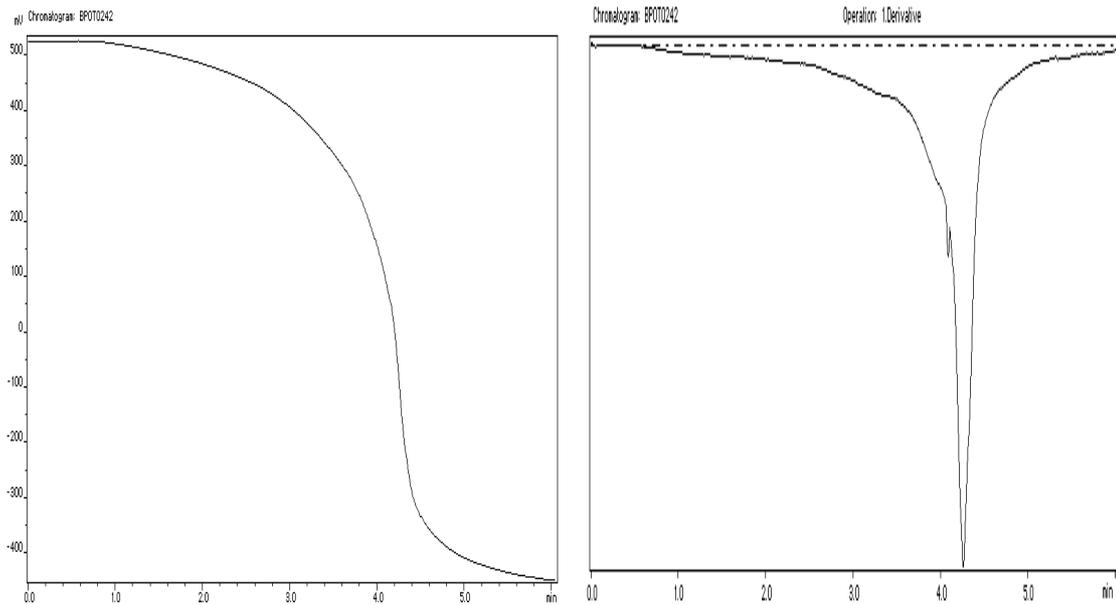


Abb. 52: Titration von Ovalbumin mit Natronlauge und erste Ableitung der Titrationskurve.

β (Ovalbumin): $5,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $c(\text{NaOH})$: $0,0200 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenanzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

überein [142]. Die erste Ableitung ist gut auswertbar und die Reproduzierbarkeit ist gegeben. Der Variationskoeffizient der durchgeführten Messreihe von 10 Messungen liegt bei 0,59 %. Mit einem nach Gran durchgeführten Verfahren, welches auf der Linearisierung der Kurve beruht ist auch eine Zuordnung der funktionellen Gruppen möglich. In Abbildung 53 ist die Titrationskurve von Ovalbumin dargestellt, wie sie O.E.S. Godinho und L.M. Aleixo 1980 bei einer herkömmlichen Titration erhielten. Durch eine abschnittsweise Linearisierung der Kurve lassen sich die funktionellen Gruppen des Albumins ermitteln [142]. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten pH-Messgerät entsprechen positive Millivoltwerte pH-Werten kleiner 7, daher der gespiegelte Kurvenverlauf.

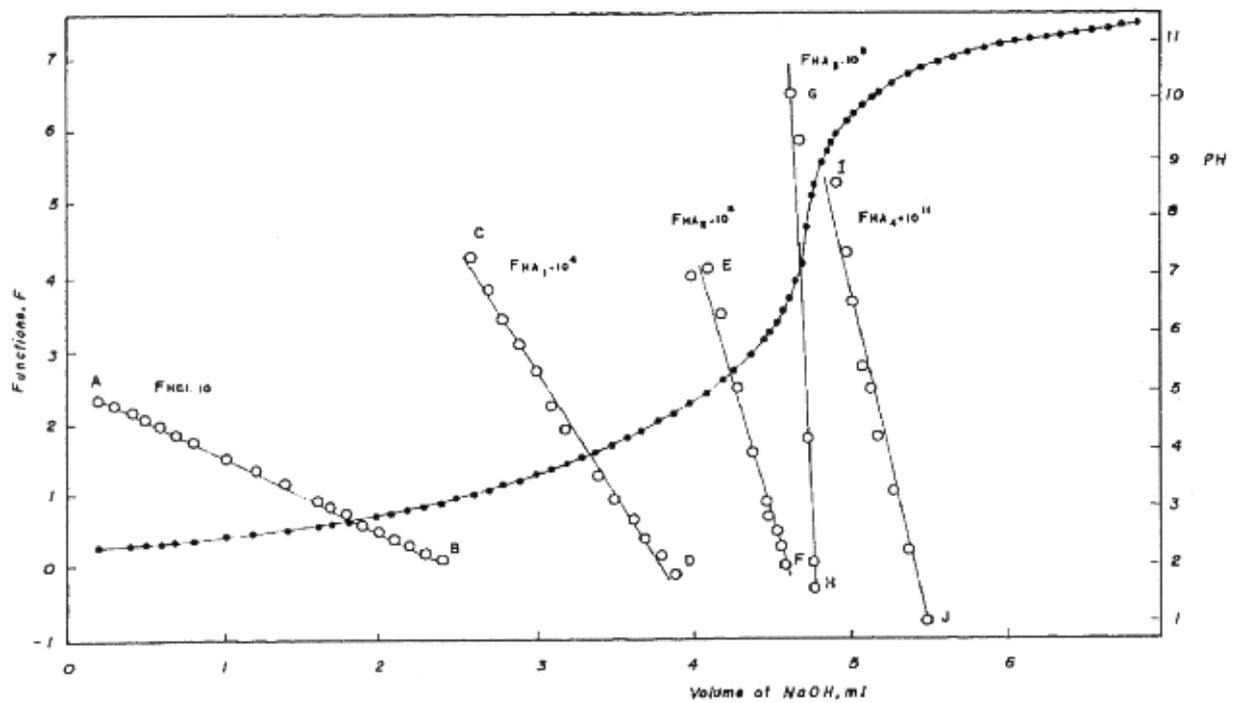


Abb. 53: Vergleichstitrationskurve von Ovalbumin [142].

β (Ovalbumin): $5,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ mit Zusatz von Salzsäure, Titrant: Natronlauge, $c(\text{NaOH})$: $0,1050 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; potentiometrische Detektion.

3.2. Kapillarelektrophorese-System mit Flusststeuerung

3.2.1. Apparatur und Chemikalien

Es wird eine Apparatur auf Mikromanipulator-Basis entwickelt, mit der es möglich ist Probenvolumina in eine Kapillare im nL-Bereich zu injizieren, die aufgegebene Probenmenge bei Bedarf an jede beliebige Stelle der Trennkapillare zu bewegen und nach dem Anlegen einer Spannung die getrennten Kationen und Anionen durch den Detektor zu ziehen.

Nachdem einige Vorversuche bewiesen, dass es mittels Nanopositioniersystem und gasdichter Spritze möglich ist, Flüssigkeit in Kapillaren zu bewegen, wird der in Abbildung 54 schematisch dargestellte Aufbau gewählt. Das Kapillarvolumen, der Innenquerschnitt der Spritze, der Hub des Translators und seine durch die Steuerung bedingte Auflösung werden aufeinander abgestimmt, so dass eine Probeninjektion im Subnanoliterbereich, wie in Kapitel 2.4.2. gefordert, möglich ist. Der Mikromanipulator, die Spritze und die Ventile sind an einem Stativ befestigt, so dass der Aufbau unkompliziert und schnell veränderbar ist.

3.2.1.1. Piezoelektrische Translatoren

Die Aktoren, P-290.00 und P-286.40, Firma Physik Instrumente (PI), Karlsruhe, sind piezoelektrisch angetriebene Stellglieder für die Nanopositionierung. Sie sind für hochauflösende Stellenwendungen mit geringer Dynamik ideal geeignet.

Der Kern des piezoelektrischen Makro-Translators P-290.00 ist ein speziell geformtes Stahlgehäuse, das ein mechanisches Ausdehnungsverstärkungssystem enthält, welches den Bewegungsraum eines mehrschichtigen Keramikblocks erhöht. Er verfügt über einen Stellweg von $1000\ \mu\text{m} \pm 20\%$ bei 0 - (-1000 V). Der Makro-Translator P-290.00 wird im spannungsgesteuerten Betrieb ohne Positionssensor eingesetzt, weshalb die Auslenkung ungefähr proportional zur Steuerspannung ist. Kriechen, Nichtlinearität und Hysterese werden allerdings nicht kompensiert. Durch eine immer gleiche Ansteuerung mit gleicher Vergangenheit der Auslenkung wird diesen Effekten entgegengewirkt. Der Translator kann einer Druckbelastung von 50 N und einer Zugbelastung von 10 N in Richtung der aktiven z-Achse ausgesetzt werden, während seine Auflösung kleiner oder gleich 10 nm beträgt. Die Abmessungen des Mikromanipulators P-290.00 sind in Abbildung 55 dargestellt.

Beim Scheibentranslator P-286.40 zieht sich eine dünne Keramikscheibe, die auf einer geeigneten Metallplatte der gleichen Größe befestigt ist, radial zusammen. Ein Biegeeffekt, der von Bimetallen her bekannt ist, hebt das Zentrum der Scheibe an, wenn die Spannung erhöht wird. Eine Ausdehnung von bis zu $100\ \mu\text{m}$ ist dabei möglich. Der Translator kann einer Druckbelastung von 20 N und einer Zugbelastung von 10 N in Richtung der aktiven

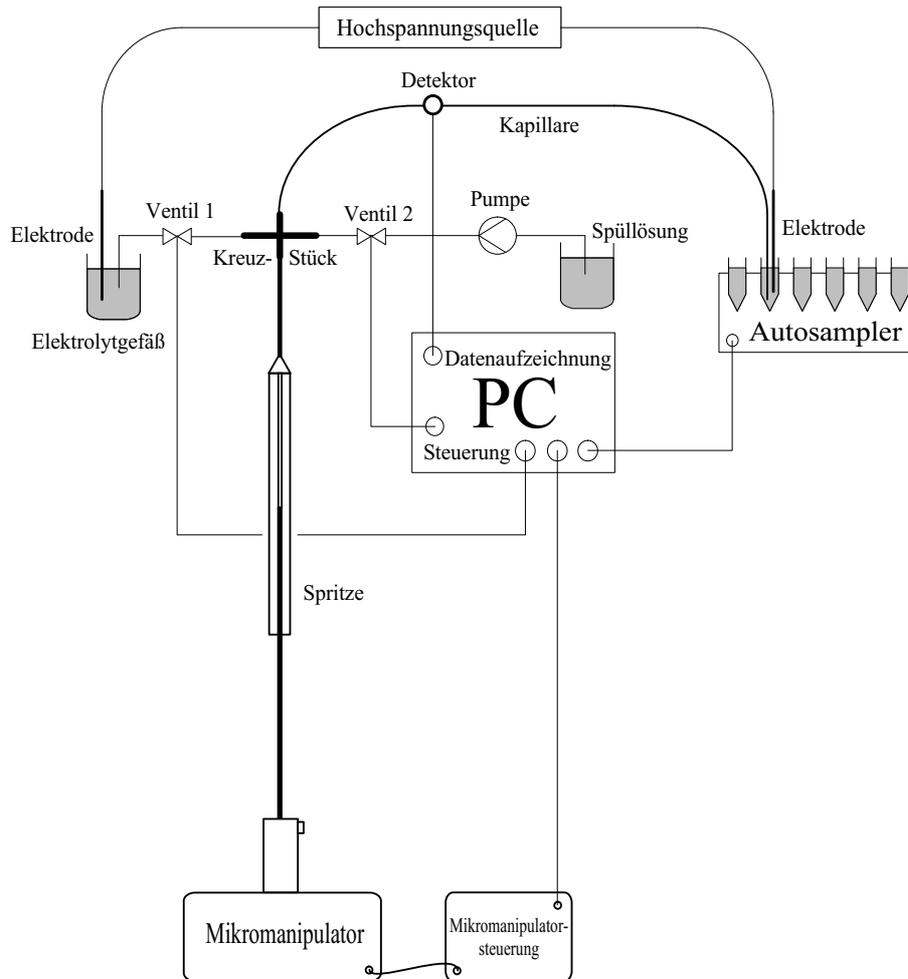


Abb. 54: schematische Darstellung des Kapillarelektrophoresesystems.

z-Achse ausgesetzt werden, seine Auflösung beträgt 1 nm. Die Abmessungen des Mikro-manipulators P-286.40 sind in Abbildung 56 dargestellt. Der P-286.40 wird ebenso wie der piezoelektrische Makro-Translator (P-290.00) im spannungsgesteuerten Betrieb ohne Positionssensor eingesetzt, weshalb die Auslenkung ungefähr proportional zur Steuerungsspannung ist. Kriechen, Nichtlinearität und Hysterese werden ebenfalls nicht kompensiert und durch reproduzierbare Ansteuerung umgangen.

3.2.1.2. Steuerung der piezoelektrischen Translatoren

Die von den Piezo-Translatoren benötigte Spannung wird von einem Hochspannungsverstärker erzeugt und mittels Digital/Analog-Wandler gesteuert. Der Hochspannungsverstärker, E-461.00, Firma Physik Instrumente, Karlsruhe, ist für statische und niederfrequente Anwendungen geeignet. Mit einer Eingangsspannung von 0 bis 10 V kann eine Ausgangsspannung von 0 bis -1000 V erzeugt werden. Die Stabilität der Ausgangsspan-

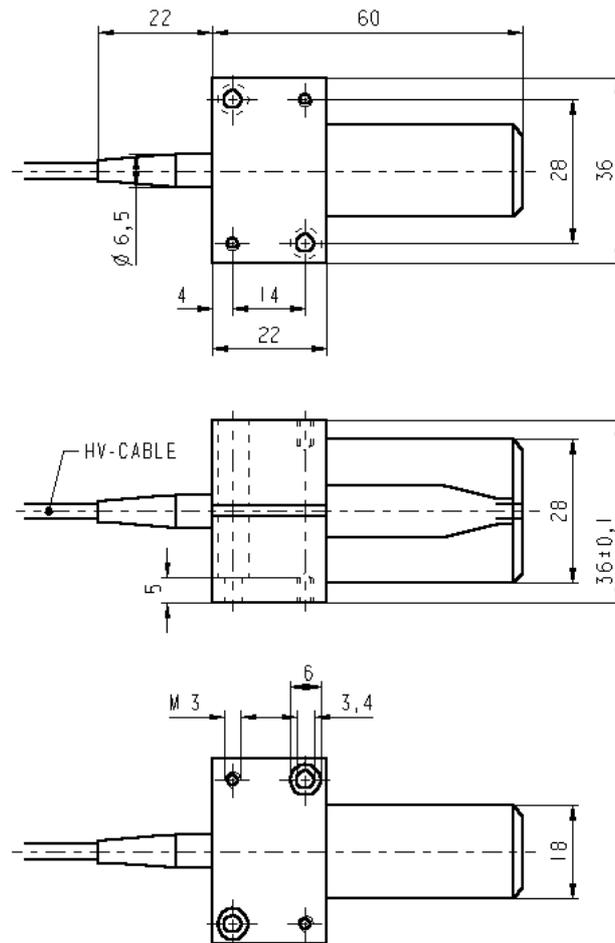


Abb. 55: Mikromanipulator P-290.00 für die piezoelektrisch gesteuerte Nanodosierung, Firma Physik Instrumente (PI), Karlsruhe.

nung ist besser als 0,1 % und die Abweichung vom linearen Verhalten beträgt weniger als 0,02 %.

Für die Eingangsspannung von 0 bis 10 V des Verstärkers wird eine D/A-Wandler-Karte, Super-14, Firma Decision Computer International Co., Ltd., Lienen, eingesetzt. Sie verfügt über eine Auflösung von 14 Bit, zwei Ausgangskanälen und einer Umwandlungszeit von weniger als 2 μ s. Die maximale Ausgangsspannung von 10 V kann somit in 16384 (2^{14}) Stufen erzeugt werden. Die Auflösung der D/A-Karte beträgt dabei 0,61 mV im unipolaren 10 V-Bereich und bedingt eine minimale Spannungsveränderung des Verstärkers um 0,061 V. Für die Steuerung des Translators wird nur ein Kanal des D/A-Wandlers benötigt, der zweite Kanal wird für die Hochspannungssteuerung der elektrophoretischen Trennung verwendet.

Die Karte wird in einen handelsüblichen PC integriert, der unter Windows 95, Firma Microsoft, Redmond, betrieben wird. Der digitale Eingang des D/A-Wandlers wird mit

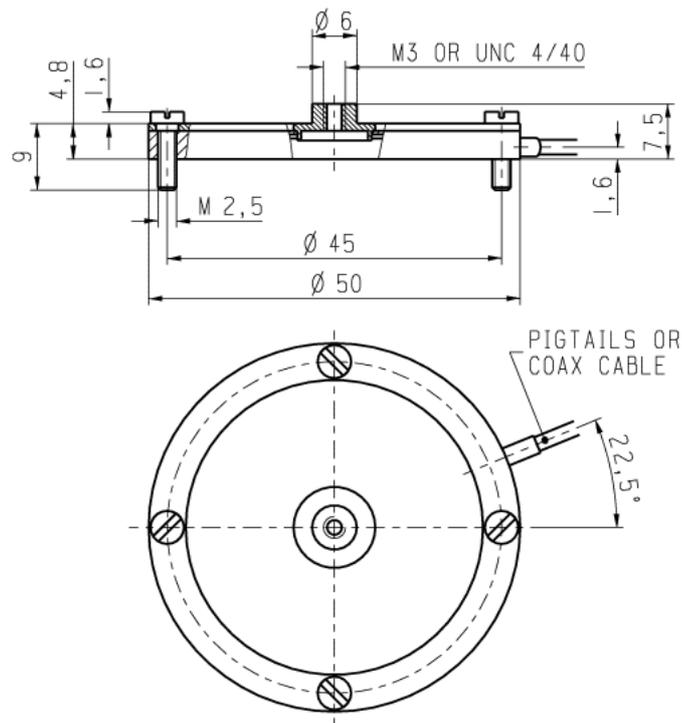


Abb. 56: Disk-Translator P-286.40 für die piezoelektrisch gesteuerte Nanodosierung, Firma Physik Instrumente (PI), Karlsruhe.

einem Programm gesteuert, welches im Rahmen der vorliegenden Dissertation mit der Entwicklungsumgebung Visual Basic, Firma Microsoft, Redmond, erstellt wird. Dieses wird so entwickelt, dass es wahlweise die manuelle oder automatische Bedienung aller angeschlossenen Komponenten ermöglicht (Kap. 3.2.1.8.).

3.2.1.3. Aktoren mit Motorantrieb

Zum Einsatz kommt ein motorgetriebenes Stellelement M-227.50, Firma Physik Instrumente (PI), Karlsruhe. Es ist ein ultra-hochauflösender linearer Aktor mit einem Stellweg von 50 mm mit Submikrometerauflösung in kompakter Bauweise. Er besteht aus einem Mikrometer mit nichtrotierender Spitze, der Antrieb erfolgt mittels einer Gleichstrommotor – Getriebe-Kombination, deren Motorschaft an einem hochauflösenden Encoder (2048 counts/rev.) befestigt ist. Der Betrieb erfolgt im geschlossenen Regelkreis. Der M-227.50 erreicht eine minimale inkrementelle Auslenkung von 50 nm bei Geschwindigkeiten von bis zu $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Die Abmessungen des Mikromanipulators M-227.50 sind in Abbildung 57 dargestellt.

Die Steuerung des motorgetriebenen Linearaktors (M-227.50) erfolgt mit Hilfe des Gleichstrommotor-Controllers Mercury C-860.10, Firma Physik Instrumente (PI), Karls-

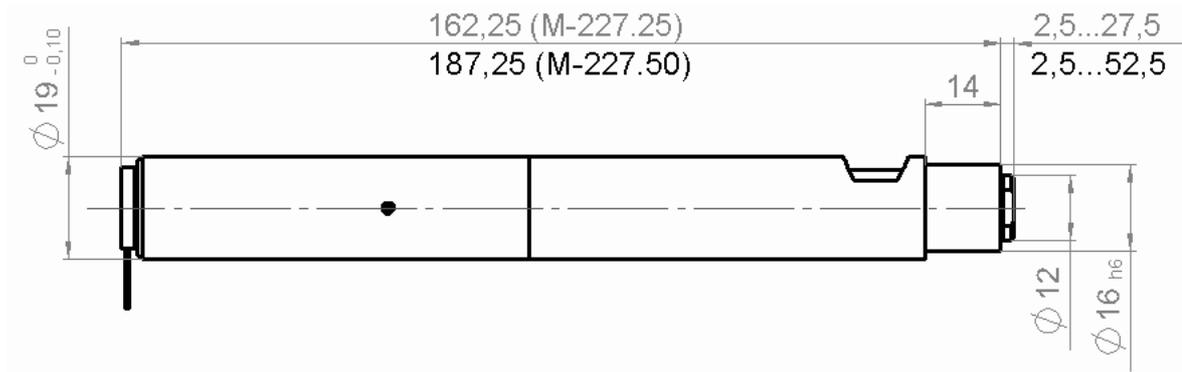


Abb. 57: Mikromanipulator M-227 für die motorgesteuerte Nanodosierung, Firma Physik Instrumente (PI), Karlsruhe.

ruhe. Es handelt sich dabei um einen miniaturisierten Servocontroller, der mittels Makrobefehle über die serielle Schnittstelle des PCs angesprochen wird.

Eine speziell von der Firma Sykam, Eresing, angefertigte Spritzenpumpenmechanik wird als kostengünstige Alternative zu den o.a. Stellelementen untersucht. Die Kontrolleinheit SMC 42 OSA-2A-1, Firma Nanotec, München erlaubt eine Ansteuerung von 0 – 10 V, die über einen Gleichstrommotor und eine Spindel in Vortriebsgeschwindigkeiten von bis zu $4,66 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ des Spritzenstempels umgesetzt werden.

3.2.1.4. Mikroliterspritze

Es kommen gasdichte μL -Spritzen der GASTIGHT[®]-Reihe 1700, Firma Hamilton, Bonaduz mit Volumina von 50, 100 und 250 μL und eine gasdichte 100 μL -Spritze, Firma Unimetrics Corp., Shorewood, zum Einsatz. In die Spritzenpumpeneinheit ist die Spritze über einen standardisierten C-Gewindeanschluss ($\frac{1}{4}''$ -28 UNF) einschraubbar. Für die restlichen Stellglieder werden auswechselbare Standardspitzen verwendet. Die Stempel aller eingesetzten Spritzen besitzen eine inerte Teflondichtung. Für die piezoelektrischen Aktoren und das motorgetriebene Stellglied werden Vorrichtungen konstruiert, die es ermöglichen den Kolben der Spritze zu fixieren. Die Spritze ist somit bei Bedarf fest mit dem Nanopositioniersystem verbunden. Die Abmessungen der Spritzen und die sich daraus ergebenden Volumina sind in Kapitel 3.2.2. aufgeführt.

3.2.1.5. Elektrophoretische Trennkapillare

Die Kapillaren sind über eine Ventilvorrichtung mit der Spritze verbunden. Ihre Abmessungen werden in Verbindung mit dem Dosiersystem so gewählt, dass es möglich ist Proben zu injizieren, diese in die Mitte der Kapillare zu ziehen und nach der elektro-

phoretischen Trennung die gesamte Trennstrecke (Puffergefäß bis Detektor) durch den Detektor zu bewegen. Die gebräuchlichen Kapillaren in der Kapillarelektrophorese besitzen einen Innendurchmesser von 25 bis 100 µm und sind alle mit dem zu konstruierenden System kompatibel. Zu beachten ist, dass eine 25 µm-Kapillare den größten Widerstand beim Drücken bzw. Ziehen von Flüssigkeit durch die Kapillare erzeugt und bei größeren Innendurchmessern die Joulesche Wärme zunehmend schlechter abgeführt wird.

Die photometrische Detektion der Analyten findet direkt in der Kapillare statt, weshalb sie für UV-Strahlung transparent sein muss. Die Trennkapillaren, CElect™-UVT, Firma Supelco, Taufkirchen, bestehen aus fused-silica und sind mit einem UV-transparenten Material beschichtet, welches die ansonsten brüchige Quarzkapillare flexibel macht. Der Außendurchmesser beträgt 363 µm. Sie sind bis zu einer Wellenlänge von 190 nm für UV-Strahlung durchlässig. Für alle Versuche mit indirekter UV-Detektion werden CElect™-UVT-Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50 und 75 µm verwendet.

3.2.1.6. Detektoren

Ein für die durchgeführten Untersuchungen modifizierter HPLC-Lichtabsorptions-Detektor (UVIDEC-100-II) mit variabler UV-Wellenlänge der Firma Jasco, Tokyo, dient zur Erfassung der Messwerte bei den Versuchen mit UV-Detektion. Die Detektion erfolgt in einer on-line Mikro-Zelle. Hierbei wird die Kapillare in einem Metallblock so geführt, dass sie im Strahlengang des Geräts liegt. Mit Rasierklingsstücken als Blende wird der Falschlichtanteil weitgehend reduziert.

Als Leitfähigkeitsdetektor wird der bisher einzige kommerziell erhältliche Leitfähigkeitsdetektor speziell für die Kapillarelektrophorese eingesetzt. Es handelt sich dabei um das Modell Crystal 1000, ThermoQuest, Egelsbach, einem end-capillary-Detektor mit einem Detektionsvolumen von 3 Nanolitern.

3.2.1.7. Sonstige Komponenten der Anlage

Die Messdaten werden in einem PC anhand der Auswertesoftware WinPeak, Version 3.26, Eppendorf Netheler Hinz GmbH & SCPA, Hamburg, samt zugehöriger AD-Wandlerkarte verarbeitet.

Als Hochspannungsquelle dienen HCN 7E-35000-Kassetten, Firma FuG, Rosenheim mit wahlweise negativer oder positiver Polarität. Sie erzeugen bis zu 35 kV bei einer Leistung von 7 W, womit sich Ströme von bis zu 200 µA ergeben. Ferner verfügen die Kassetten über Ausgänge, an denen sich die aktuelle Spannung und der aktuelle Strom abgreifen lässt und einen Eingang (0 - 10 V) zur externen Steuerung des Gerätes.

Mittels einer Peristaltikpumpe, S 1410, Firma Sykam, Eresing, kann das gesamte System über 3/2-Wege-Ventile, Typ 127, Firma Bürkert, Ingelfingen, gespült werden.

Als Pumpenschläuche dienen Ismaprene SC0305, Firma Ismatec, Wertheim-Mondfeld. Die Schlauchverbindungen bestehen aus Teflon, alle weiteren Verbindungselemente aus PEEK.

Um elektrisch leitfähige Bauteile zu vermeiden, wird ein aus Kunststoff hergestellter Autosampler verwendet. Zu dessen Steuerung und dem Schalten der Ventile werden Standard-Relaiskarten für die parallele PC-Schnittstelle, Firma Conrad, Hirschau, verwendet.

3.2.1.8. Steuerprogramm

Die gesamte Anlage ist über ein im Rahmen dieser Dissertation entwickeltes Steuerprogramm vollautomatisiert. In Abbildung 58 ist ein Bildschirmfenster dargestellt.

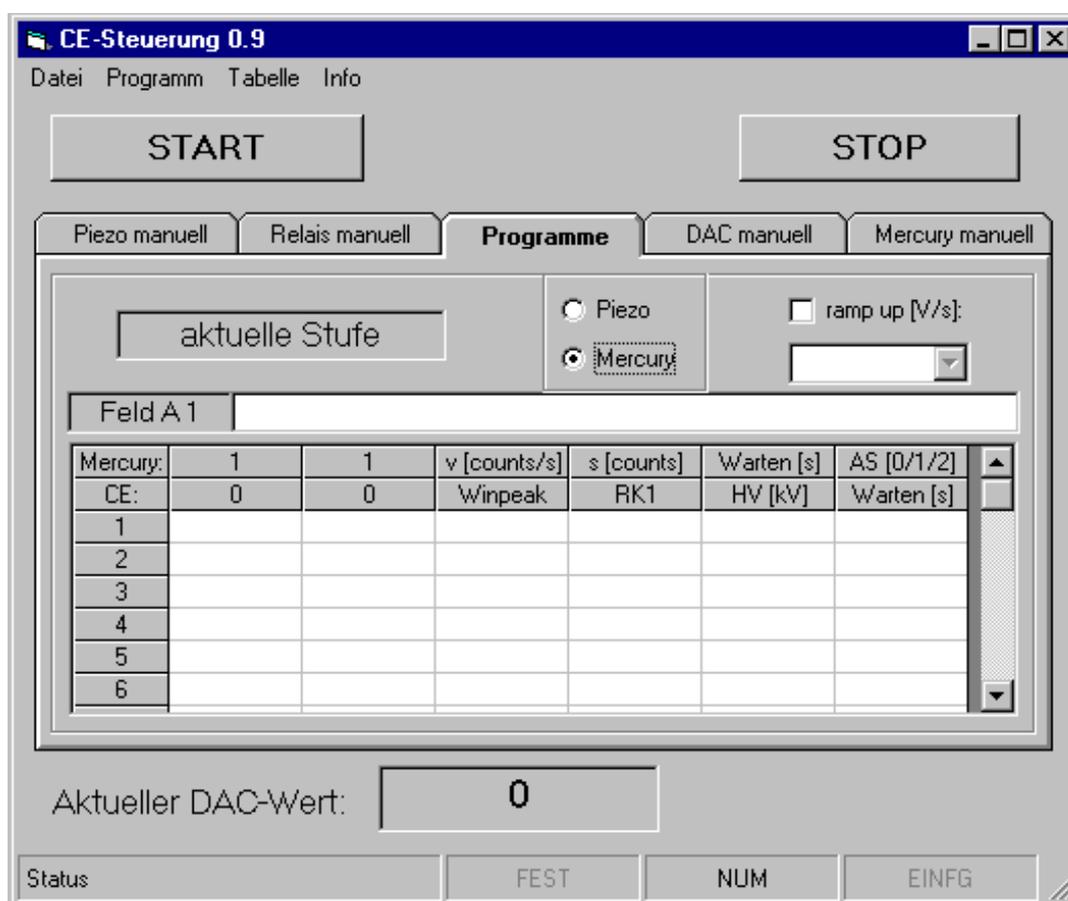


Abb. 58: Bildschirmfenster des Steuerprogramms des Kapillarelektrophoresesystems.

Die „Karteikasten“-Oberfläche ermöglicht die übersichtliche und gut zugängliche Integration zahlreicher Funktionen auf engem Raum. Der in Abbildung 58 vordringende TabStrip „Programme“ dient dabei zur vollautomatischen (Serien-)Bestimmung beliebig vieler Proben. Sämtliche Komponenten der Anlage sind flexibel ansprechbar. Die Tabel-

lenstruktur bietet hierfür pro Zeile die benötigten Funktionen an und wird sequentiell von oben nach unten ausgeführt. Über die ersten beiden Spalten kann mit entsprechenden „Schaltern“ in verschiedene Modi (u.a. Piezo-, Mercury- und CE-Modus) gewechselt werden. Beispielsweise wird mit der Ziffer 1 in den ersten beiden Spalten in den Mercury-Modus (motorgesteuerter Linearaktor) geschaltet, wo in Spalte 3 die Stellgeschwindigkeit in $\text{counts}\cdot\text{s}^{-1}$, in Spalte 4 der Stellweg in counts (positiv und negativ), in Spalte 5 eine Wartezeit nach der Bewegung und in Spalte 6 eine Autosampler-Aktion bestimmt werden können. Der CE-Modus mit 0 als Schalter ermöglicht das Starten und Stoppen der Datenaufzeichnung mit Winpeak, über „RK1“ den Zugang zu den Ventilen und der Pumpe und in den Spalten 5 und 6 die Einstellung der Hochspannung sowie der Analysendauer. Mit der Check-Box „ramp up“ kann die Hochspannung mit einer wählbaren Rate zu Beginn der Analyse linear hochgefahren werden. Als Sicherheits- und Kontrollmechanismus erfolgt vor dem Analysenstart eine Plausibilitätsprüfung der eingegebenen Werte.

Auf den übrigen TabStrips sind Steuerelemente zur manuellen Bedienung der jeweiligen Geräte realisiert, die teilweise zusätzliche, nicht ständig benötigte Funktionen anbieten. Mehrere Ausgabefelder sind zur Information und Orientierung des Benutzers zugänglich. Zur Steuerung der Relaiskarten werden Funktionen des Betriebssystems, zur Kontrolle des DA-Wandlers mitgelieferte Treiber für Visual Basic verwendet.

3.2.1.9. Chemikalien und Probenvorbereitung

Für sämtliche Lösungen wird Reinstwasser aus einer Milli-Q Plus-Anlage, Millipore, Eschborn, verwendet. Die eingesetzten Chemikalien besitzen p.A.-Qualität und einen Reinheitsgehalt von mindestens 98 %. Um zu vermeiden, dass Partikel die CE-Kapillare verstopfen, werden alle verwendeten Lösungen vor dem Gebrauch mit Membranfiltern aus Zellulosenitrat und einer Porenweite von $0,45\ \mu\text{m}$ filtriert. Zusätzlich werden sie unter Vakuum bei kontinuierlichem Rühren oder ersatzweise im Ultraschallbad entgast. Durch diesen Vorgang wird eine Gasbildung innerhalb der Apparatur verhindert und somit die Reproduzierbarkeit des Systems erhöht.

3.2.2. Vorbetrachtungen zum CE-System

3.2.2.1. Auflösungen der Stellantriebe

Es können drei Stellantriebe mit der entsprechenden Steuerung verwendet werden:

- DC-Mike Actuator M-227.50 mit Single Axis DC-Motor Controller Mercury C-860.10, Firma Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe;
- HVPZT-Disk-Translator P-286.40, Firma Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe;

- piezoelektrischer Makro-Translator P-290.00, Firma Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe.

Die Steuerung der piezoelektrischen Translatoren erfolgt jeweils mit dem HV Amplifier E-461.00, Firma Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe, und einem Digital-Analog-Wandler (DAC) 14 Bit, Firma Decision Computer GmbH, Lienen.

Diese Stellantriebe sollen wie nachfolgend erläutert in Verbindung mit Mikroliterspritzen oder mit einer HPLC-Pumpenmechanik betrieben werden. Das verdrängte Volumen wird durch die Fläche des jeweiligen Kolbens und den Stellweg charakterisiert.

Der **motorgetriebene Linearaktor (M-227.50)** besitzt in Verbindung mit dem Motor-Controller C-860.10 gemäß des Handbuchs eine „design resolution“ von ca. 3,5 nm ($0,0035382 \mu\text{m}\cdot\text{count}^{-1}$) und eine „min. incremental motion“ von 50 nm. Für die u.a. Berechnungen wird die design resolution verwendet. Bei einer Berechnung des minimal möglichen Injektionsvolumens müsste jedoch die min. inkrementelle Bewegung angesetzt werden.

Die **piezoelektrischen Stellantriebe** haben im Prinzip unbegrenzte Auflösung und werden nur durch die Auflösung der Steuerung begrenzt. Im Rahmen der Dissertation ist dies ein 14 Bit DAC, der die maximale Ausgangsspannung in $2^{14} = 16384$ Stufen unterteilen kann. Um den gesamten Stellweg der Piezokristalle auszunutzen, beträgt die Ausgangsspannung 0 – 10 V, die durch den Hochspannungsverstärker E-461.00 auf 0 bis -1000 V umgesetzt wird. Das minimale Inkrement ist in diesem Fall 0,61 mV. Der Ausgabebereich kann auf 0 – 5 V und 0 – 2,5 V verringert werden, wobei das minimale Inkrement sowie der maximale Stellweg sinken. Tabelle 13 verdeutlicht dies.

Tab. 13: Auslenkung und Auflösung der verwendeten Piezo-Aktoren in Verbindung mit unterschiedlichen Einstellungen des Digital-Analog-Wandlers.

Ausgabebereich:	0 - 10 V	0 - 5 V	0 - 2,5 V
min. Inkrement:	0,61 mV	0,31 mV	0,15 mV
Auflösung P-290.00 ⁽¹⁾ :	61 nm	31 nm	15 nm
max. Stellweg P-290.00 ⁽¹⁾ :	1 mm	0,5 mm	0,25 mm
Auflösung P-286.40 ⁽²⁾ :	6,1 nm	3,2 nm	1,5 nm
max. Stellweg P-286.40 ⁽²⁾ :	0,1 mm	0,05 mm	0,025 mm

⁽¹⁾ 1 mm Auslenkung bei -1000 V; HV-Amplifier E-461.00: -1000 V bei 10 V Eingang $\rightarrow 100 \mu\text{m}\cdot\text{V}^{-1}$.

⁽²⁾ 100 μm Auslenkung bei -1000 V; HV-Amplifier E-461.00: -1000 V bei 10 V Eingang $\rightarrow 10 \mu\text{m}\cdot\text{V}^{-1}$.

3.2.2.2. Umsetzung des Stellwegs in ein Volumen

Um den Stellweg der Aktoren in ein Volumen umzusetzen, wird ein Dosierelement mit entsprechend dimensionierter Verdrängungsfläche benötigt. Abbildung 59 stellt die erzeugte Volumenverdrängung pro Stellweg in Abhängigkeit des Verdrängerdurchmessers (0,1 bis 50 mm) logarithmisch skaliert dar.

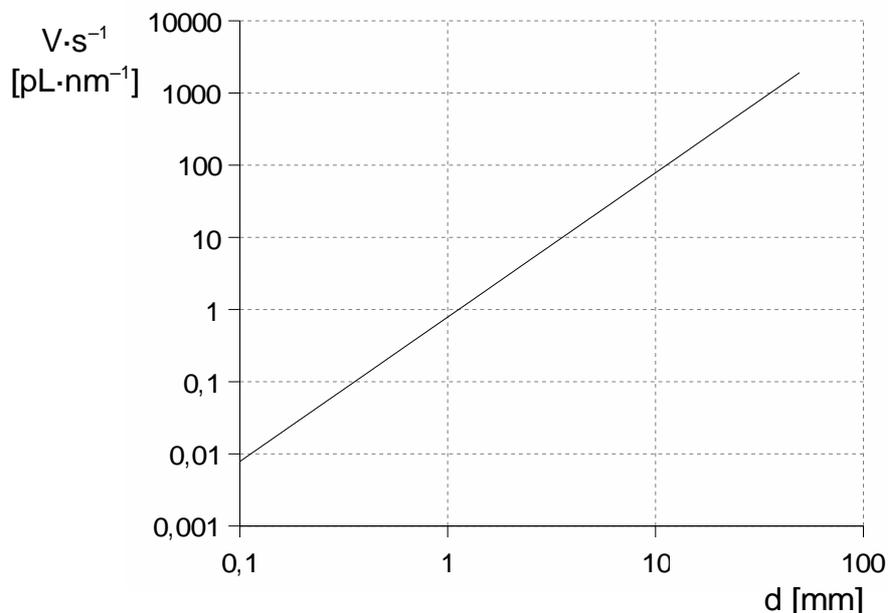


Abb. 59: erzeugte Volumenverdrängung pro Stellweg in Abhängigkeit des Verdrängerdurchmessers.

Tabelle 13 zeigt, dass die piezomechanischen Stellglieder Auflösungen im Bereich von 1,5 bis 61 nm liefern. Um mit letzterem Wert die Vorgaben (Kap. 2.5.) erfüllen zu können, wäre ein Kolbendurchmesser von weniger als 0,65 mm erforderlich. Der erstgenannte Wert lässt immerhin noch einen Durchmesser von ca. 4,1 mm zu. Die Dosierelemente müssen ferner ein ausreichend großes Volumen zur Verfügung stellen, um die beabsichtigte Flusssteuerung zu ermöglichen. Es bieten sich somit zum einen Mikroliterspritzen an, zum anderen wären u.U. Kolbenpumpenmechaniken geeignet.

3.2.2.3. Erreichbare minimale Auflösungen mit den entsprechenden Dosierelementen

Tabelle 14 stellt die Stellglieder und die Dosierelemente gegenüber und gibt Aufschluss über die damit minimal dosierbaren Volumina.

Durch Verwendung eines DAC mit 16 Bit Auflösung kann das minimal dosierbare Volumen der piezoelektrischen Stellglieder noch jeweils um den Faktor 4 bei gleichem max. Stellweg verkleinert werden.

Tab. 14: erreichbare minimale Auflösungen mit den entsprechenden Dosierelementen.

Typ	min. Stellweg	HPLC- Pumpe	250 µL- Spritze	100 µL- Spritze	50 µL- Spritze
Kolbendurchmesser [mm]		3,1	2,30	1,46	1,03
Verdrängung [$\mu\text{L}\cdot\text{mm}^{-1}$]		7,55	4,17	1,67	0,83
M-227.50	3,5 nm	0,027 nL	0,015 nL	0,0059 nL	0,0029 nL
P-290.00 (0 - 10 V)	61 nm	0,46 nL	0,25 nL	0,10 nL	0,051 nL
P-290.00 (0 - 5 V)	31 nm	0,23 nL	0,13 nL	0,051 nL	0,025 nL
P-290.00 (0 - 2,5 V)	15 nm	0,12 nL	0,064 nL	0,015 nL	0,013 nL
P-286.40 (0 - 10 V)	6,1 nm	0,046 nL	0,025 nL	0,010 nL	0,0051 nL
P-286.40 (0 - 5 V)	3,2 nm	0,023 nL	0,013 nL	0,0051 nL	0,0025 nL
P-286.40 (0 - 2,5 V)	1,5 nm	0,012 nL	0,0064 nL	0,0025 nL	0,0013 nL

3.2.2.4. Erreichbare maximale Volumenverdrängung mit den entsprechenden Dosierelementen.

Da die Volumenelemente in der Kapillare positioniert werden müssen, ist nicht nur die Auflösung von Interesse, sondern auch das Volumen, das mit einer Totalauslenkung verdrängt werden kann. Tabelle 15 stellt die Stellglieder und die Dosierelemente gegenüber und gibt Aufschluss über die damit maximal dosierbaren Volumina.

Tab. 15: erreichbare maximale Volumenverdrängung mit den entsprechenden Dosierelementen.

Typ	max. Stellweg	HPLC- Pumpe	250 µL- Spritze	100 µL- Spritze	50 µL- Spritze
Kolbendurchmesser [mm]		3,1	2,30	1,46	1,03
Verdrängung [$\mu\text{L}\cdot\text{mm}^{-1}$]		7,55	4,17	1,67	0,83
M-227.50	50 mm	(377 µL) ⁽¹⁾	208 µL	83 µL	42 µL
P-290.00 (0 - 10 V)	1 mm	7,6 µL	4,2 µL	1,7 µL	0,83 µL
P-290.00 (0 - 5 V)	0,5 mm	3,8 µL	2,1 µL	0,83 µL	0,42 µL
P-290.00 (0 - 2,5 V)	0,25 mm	1,9 µL	1,0 µL	0,42 µL	0,21 µL
P-286.40 (0 - 10 V)	0,1 mm	0,75 µL	0,42 µL	0,17 µL	0,083 µL
P-286.40 (0 - 5 V)	0,05 mm	0,38 µL	0,21 µL	0,083 µL	0,042 µL
P-286.40 (0 - 2,5 V)	0,025 mm	0,19 µL	0,10 µL	0,042 µL	0,021 µL

⁽¹⁾ theoretischer Wert, da der Kolbenhub in der Pumpenmechanik auf ca. 10 mm begrenzt ist, beträgt das maximal verdrängbare Volumen nur ca. 75 µL.

3.2.3. Entscheidungsgrundlagen für die verwendeten Translatoren

Von dem Aktor wird erwartet, dass er sowohl eine hohe Auflösung besitzt, als auch in der Lage ist einen ausreichenden Stellweg für die Bewegung mindestens eines Kapillarvolumens bereitzustellen. Daneben soll er robust und preisgünstig sein. Herkömmliche Stellglieder liefern meist einen großen Stellweg, jedoch mangelt es ihnen am Auflösungsvermögen. Für hochpräzise Bewegungen im Nano- und Picometerbereich haben sich Piezo-Aktoren als geeignet erwiesen und breite Anwendung gefunden (Kap. 2.6.). Selbst bei sog. Stapeltranslatoren ist der maximale Stellbereich allerdings meist auf 100 μm begrenzt. Größere Stellwege sind durch mechanische Verstärkungssysteme möglich. Es wird entschieden sowohl ein Piezostellglied mit als auch eines ohne mechanische Verstärkung zu testen. Als ersteres kommt das Modell P-290.00, Firma Physik Instrumente, Karlsruhe, zum Einsatz. Als Modell ohne mechanische Verstärkung fällt die Wahl auf den Scheibentranslator 286.40, Firma Physik Instrumente, Karlsruhe, da dieser einen relativ großen Stellbereich bei kleiner Bauform bietet. Neben den Piezoelementen sind seit kurzem motorgetriebene Mikrometertranslatoren erhältlich, die Auflösungen bis in den unteren nm-Bereich liefern. Als Vertreter dieser Kategorie wird das Modell M-227.50, Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe, verwendet.

Gemäß dem erstellten Anforderungsprofil (Kap. 2.5.) werden Auflösungen von 20 pL für 50 μm -Kapillaren bzw. 44 pL für 75 μm -Kapillaren benötigt. Tabelle 14 verdeutlicht, dass sich somit der motorgetriebene Linearaktor (M-227.50) sowie der Disk-Translator (P-286.40) für die Integration in das Positioniersystem anbieten. Gegen den P-286.40 spricht allerdings der limitierte Stellweg, der mit Mikroliterspritzen alleine keine Flusssteuerung ermöglicht.

Tabelle 16 stellt die Preise der verwendeten Aktoren gegenüber. Zum Betrieb der Aktoren benötigte Geräte werden mit aufgeführt. Der ebenfalls notwendige PC und die Kleinteile sind nicht mit eingerechnet.

Erwartungsgemäß stellt die Spritzenpumpe die preisgünstigste Lösung dar. Da es sich um eine Sonderanfertigung handelt, kann sich der Preis bei der Anschaffung größerer Stückzahlen deutlich nach unten bewegen. Der Scheibentranslator P-286.40 und der hochauflösende Linearaktor M227.50 sind in etwa gleich teuer. Der piezoelektrische Makro-Translator P-290.00 stellt die weitaus teuerste Lösung dar.

3.2.4. Charakterisierung der verwendeten Translatoren

3.2.4.1. Piezotranslator P-290.00

Zu Beginn der Untersuchungen standen nur die beiden Piezotranslatoren zur Verfügung, da der motorgetriebene Linearaktor (M-227.50) erst später auf dem Markt erschien. Aufgrund des größeren maximalen Stellwegs des piezoelektrischen Makro-Translatoren (P-

Tab. 16: Preise der verwendeten Aktoren samt Steuerung (Stand 12/2001).

Aktor	P-290.00 2.074,- €	P-286.40 287,- €	M-227.50 614,- €	Spritzenpumpe * ca. 300 €
Steuerung	E-461.00 525,- €	E-461.00 525,- €	C-860.10 445,- €	
	DAC DCI14-S2 131,79 €	DAC DCI14-S2 131,79 €		DAC DCI14-S2 131,79 €
				Relaiskarte 40,88 €
Gesamt:	2.730,79 €	943,79 €	1.059,00 €	472,67 €

* Sonderanfertigung.

290.00) wird dieser als erster charakterisiert. Um genügend Volumen verdrängen zu können, kommt zunächst nur die Kopplung mit einer 250 µL-Spritze in Frage. Der UV-Detektor wird vorerst bevorzugt eingesetzt, da hierbei die Kopplung des Injektionssystems an die Kapillare einfach zu bewerkstelligen ist. Um eine größere Schichtdicke und damit größere Detektionsempfindlichkeit zu erreichen, kommen 75 µm-Kapillaren zum Einsatz.

Quantität und Qualität der eingezogenen Probenmenge

Theoretisch werden 4,15 µL bei einer Verkürzung des Positioniersystems um 1 mm ($\hat{=}$ 4,15 nL·µm⁻¹) in die Kapillare gesaugt. Durch den Laboraufbau der Apparatur ist jedoch nicht immer gewährleistet, dass die z-Achse des piezoelektrischen Positioniersystems in einer Linie mit der Spritze und deren Stempel liegt. Aus diesem Grund sind die gemessenen Werte von Aufbau zu Aufbau u.U. nicht absolut vergleichbar und weichen etwas von den theoretisch berechneten ab. Bei einer Neigung des Spritzenstempels gegenüber der z-Achse reduziert sich der Hub im Spritzenkörper auf den Cosinus des Winkels multipliziert mit dem Translatorhub. Auch die Kompressibilität der Flüssigkeit in der Spritze und der Kapillare und eventuell eingeschlossene Luftblasen beeinträchtigen das tatsächlich injizierte Volumen. Außerdem werden Kriechen, Nichtlinearität und Hysterese nicht kompensiert, da der verwendete Mikromanipulator bauartbedingt ohne Positionssensor betrieben wird (Kap. 2.6.3.). Letzteres kann durch die Automatisierung, d.h. der immer gleichen Prozessführung, weitgehend umgangen werden. Es wird sorgfältig darauf geachtet, dass keine Luftblasen in das System gelangen. Neben einer gründlichen Spülung

werden daher nur entgaste Flüssigkeiten eingesetzt. Ferner sollte bei den auftretenden Drücken die Kompressibilität der Flüssigkeiten vernachlässigbar sein.

Durchbruchsmessung

Die praktische Bestimmung des injizierten Volumens erfolgt am einfachsten mit einer Durchbruchsmessung. Dabei wird so lange eine UV-aktive Lösung in die Kapillare gesaugt, bis sie im Detektionsfenster erscheint. Anhand der Länge und des Innenvolumens der Kapillare vom Probengefäß bis zum Detektor sowie der benötigten Bewegung des Piezo-Translators wird das injizierte Volumen in Abhängigkeit der Stellwegänderung des Positioniersystems berechnet. Ein konstanter Innendurchmesser der Kapillare wird vorausgesetzt. Durchbruchsmessungen finden, wie bereits diskutiert (Kap. 2.4.1.1.), auch bei der Druckinjektion Anwendung.

Aus Vorversuchen ist bekannt, dass sowohl beim Einziehen als auch beim Verdrängen von Flüssigkeit ein mechanisches Spiel zu überbrücken ist. Vor der Injektion muss daher der Stellweg erst um etwa 300 μm reduziert werden, bevor tatsächlich Flüssigkeit eingesaugt wird. Zusätzlich besitzt der piezoelektrische Makro-Translator P-290.00 eine gewisse Trägheit, welche ein Nachfließen der Flüssigkeit in der Kapillare nach schnellen Stellwegänderungen bewirkt. Deshalb wird jede Injektion erst im Anschluss an den folgenden Ablauf (Grundprogramm) durchgeführt:

- Der maximale Stellweg von 1000 μm ist die Ausgangsposition.
- Von 1000 μm bis 600 μm wird mit einer Geschwindigkeit von 10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ Wasser eingesaugt, um das mechanische Umkehrspiel zu überwinden.
- Bei konstantem Hub (600 μm) wird 60 Sekunden lang gewartet, um einen Druckausgleich zu gewährleisten.

Die Kapillare und die Spritze sind mit entgastem Wasser gefüllt. Als Tracer dient zunächst eine Imidazolösung, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, da Imidazol im UV-Bereich einen großen Extinktionskoeffizienten besitzt, in der Kapillarelektrophorese ohnehin Anwendung als Hintergrundelektrolyt findet sowie billig und ungiftig ist. Die Messwellenlänge beträgt 207 nm. Die Länge der Kapillare vom Wasser- bzw. Probengefäß bis zur Mitte des Detektorfensters beträgt 365 mm, die Gesamtlänge 509 mm.

Nach der einminütigen Wartezeit bei 600 μm wird der Stellweg im Anschluss an den Wechsel in das Probengefäß mit einer Geschwindigkeit von 10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ so lange reduziert, bis die absorbierende Substanz im Detektorfenster erscheint. Die Absorption nimmt S-förmig bis zu einem konstanten Wert zu. Die Stellwegänderung bis zum Wendepunkt des Anstiegs ist ausschlaggebend für die Quantifizierung. Bei einer Einzugsgeschwindigkeit

von $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird ein negativer Hub von $385 \mu\text{m}$ (Variationskoeffizient $0,21 \%$, $n = 4$) für das Füllen der 365 mm langen Kapillare benötigt. Weitere Versuche zeigen, dass bei einer langsameren Einzugsgeschwindigkeit weniger Hub benötigt wird. Dies deutet darauf hin, dass die Apparatur für eine Einzugsgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ zu träge ist und die Geschwindigkeit ermittelt werden muss, bei der sich die Flüssigkeit in der Kapillare synchron mit dem Spritzenstempel bewegt. Dazu wird mit einer Auslenkung von $600 \mu\text{m}$ auf $300 \mu\text{m}$ mit $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ vorpositioniert und anschließend mit einer kleinen Geschwindigkeit bis zum Detektionsfenster fortgefahren. Es zeigt sich, dass unterhalb einer Geschwindigkeit von $0,28 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ der ermittelte Stellweg bei ca. $370 \mu\text{m}$ konstant bleibt. Der Variationskoeffizient für 6 Geschwindigkeiten im Bereich von $0,11$ bis $0,28 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ beträgt nur $0,62 \%$ ($n = 15$). Der geringe Wert bestätigt die Gleichwertigkeit der Geschwindigkeiten von $0,11$ bis $0,28 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Da unterhalb einer Geschwindigkeit von $0,28 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ die Trägheit des Systems anscheinend keine Rolle mehr spielt, wird mit $0,20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ untersucht, ob es ausreicht die Geschwindigkeit erst ab einem Stellweg von $250 \mu\text{m}$ zu reduzieren. Die Versuche zeigen, dass es keine Auswirkung auf das Ergebnis hat, ob die Geschwindigkeit ab $250 \mu\text{m}$ oder ab $300 \mu\text{m}$ erniedrigt wird. Aufgrund der bisher dargestellten Versuche werden alle folgenden Durchbruchmessungen identisch durchgeführt:

- Grundprogramm (S. 125).
- Die Probenlösung wird von 600 bis $250 \mu\text{m}$ mit $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ und von $250 \mu\text{m}$ bis zum Erscheinen im Detektorfenster mit $0,20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ injiziert.
- Das Positioniersystem wird wieder in die Ausgangsposition gebracht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Tab. 17: Ermittlung des Verdrängungsvolumens anhand von Durchbruchmessungen.

Kapillarlänge [mm]	benötigter Hub \bar{x} [μm] VK [%]		n	injiziertes Volumen / Stellweg [nL· μm^{-1}]
365	367,4	0,5	9	4,4
144	164,6	1,4	10	3,9
Über Apparaturabmessungen berechnet:				4,2

Tracer: Imidazolösung ($5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); Positioniergeschwindigkeiten: 10 und $0,20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.
 \bar{x} : Mittelwert; VK: Variationskoeffizient; n: Anzahl der Messungen.

Die Messwerte zeigen, dass das tatsächlich verdrängte Volumen mit dem theoretischen Wert gut übereinstimmt. Bei 365 mm Kapillarlänge werden $4,4 \text{ nL}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ Stellweg inji-

ziert; bei 144 mm allerdings nur $3,9 \text{ nL}\cdot\mu\text{m}^{-1}$. Die Abweichung der beiden Wertepaare ist mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Nichtlinearität des Piezokristalls bedingt (Kap. 2.6.3.). Die erzeugte Auslenkung des Piezo-Aktors ist der angelegten Spannung nur ungefähr proportional. Die gewählte Startposition hat einen direkten Einfluss auf das Injektionsvolumen. Dies wird durch weitere Versuche, bei denen die Kapillarlänge ebenfalls 144 mm beträgt jedoch erst ab $375 \mu\text{m}$ absolutem Hub Probenlösung eingesaugt wird, verdeutlicht. Als Mittelwert aus fünf Messungen ergeben sich dabei $4,7 \text{ nL}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ (VK = 1,2 %) im Gegensatz zu $3,9 \text{ nL}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ bei einem Startwert von $600 \mu\text{m}$. Eine Quantifizierung des injizierten Volumens über eine Durchbruchmessung ist somit nur eine Näherung und keine genaue Aussage über die tatsächliche aufgegebene Probenmenge.

Reproduzierbarkeit der Messwerte

Die Reproduzierbarkeit des Systems wird untersucht. Um dem eigentlichen Ziel, d.h. der Injektion im nL-Bereich, näher zu kommen, werden Volumina von ca. 200 nL aufgegeben. Über die Apparateabmessungen (maximaler Stellweg verdrängt $4,15 \mu\text{L}$ Flüssigkeit) werden alle Volumenangaben berechnet.

Zunächst wird die optimale Einzugsgeschwindigkeit ermittelt. Durch $50 \mu\text{m}$ Stellwegverringerung werden dazu ca. $200 \mu\text{L}$ einer Imidazolösung ($c = 5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten aufgegeben. Jeder Messwert wird durch die automatische Abarbeitung der folgenden Punkte erhalten:

- Grundprogramm (S. 125).
- Das Kapillarenende befindet sich im Probengefäß. Bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten ($0,06 - 0,28 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) wird die Länge des Positioniersystems um $50 \mu\text{m}$ verkürzt. Der Autosampler bewegt anschließend die Kapillare in ein Wassergefäß.
- Mit $2,8 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird der Hub auf $150 \mu\text{m}$ reduziert, die Probe dabei durch den Detektor gezogen und im kurzen Kapillarstück „geparkt“.
- Der Imidazolpfropfen wird mit $10 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ aus der Kapillare gedrückt.

Die erhaltenen Peaks werden mit der Chromatographiesoftware WinPeak aufgezeichnet und ausgewertet. Der Graph in Abbildung 60 zeigt die Mittelwerte der erhaltenen Flächen in Abhängigkeit der Einzugsgeschwindigkeit.

Die Flächen der Peaks sind direkt proportional zur Imidazol-Stoffmenge und damit zum injizierten Volumen. Die Kurve besitzt ein Maximum bei $0,15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, weshalb alle folgenden Versuche mit dieser Einzugsgeschwindigkeit durchgeführt werden.

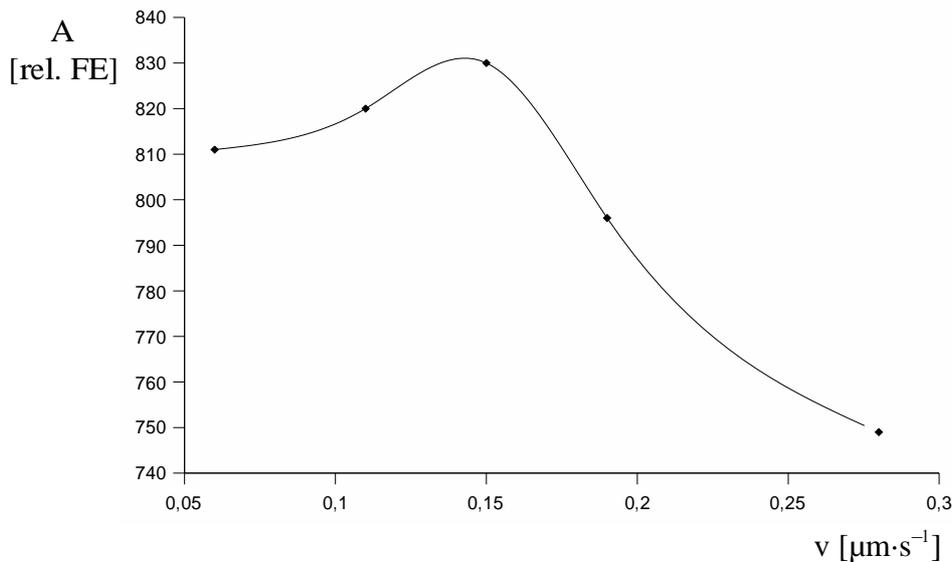


Abb. 60: Abhängigkeit des injizierten Volumens von der Einzugs geschwindigkeit.

Tracer: Imidazol, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $V_{\text{inj, theor.}}$: 200 nL; Positioniergeschwindigkeit: $2,8 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Um die Streuung der Messwerte zu überprüfen, wird eine Serienbestimmung mit o.a. Bedingungen bei unterschiedlichen Einzugsstellwegen, d.h. verschiedenen Injektionsvolumina, durchgeführt. Aufgrund der Länge der Messreihen wird für jedes Injektionsvolumen das Reinstwasser in der Spritze erneuert. In Tabelle 18 sind die Variationskoeffizienten der erhaltenen Peakflächen für die aufgegebenen Probenmengen zusammengestellt.

Tab. 18: Streuung der Messwerte für das jeweils injizierte Volumen.

V_{inj} [nL]	n	VK [%]
208	16	2,6
42	18	5,5
21	19	5,3
4	20	11

Exp. Bedingungen wie Abbildung 61.

n: Anzahl der Messungen, VK: Variationskoeffizient.

Die ursprünglich gewählte Konzentration der Imidazolösung von $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ lässt sich im Grenzbereich von 4,2 nL nicht mehr eindeutig auswerten. Der Fehler von 11 % könnte darauf basieren. Eine Verbesserung der Empfindlichkeit sollte deshalb durch Erhöhung der Probenkonzentration und eine veränderte Geschwindigkeit, mit der das injizierte Volumen durch den Detektor gezogen wird, erreicht werden.

Die Werte der einzelnen Messreihen weisen eine offensichtlich zufällige Verteilung ohne Trend auf. Die erhaltenen Werte für die 21 nL-Injektion sind exemplarisch in Abbildung 61 dargestellt.

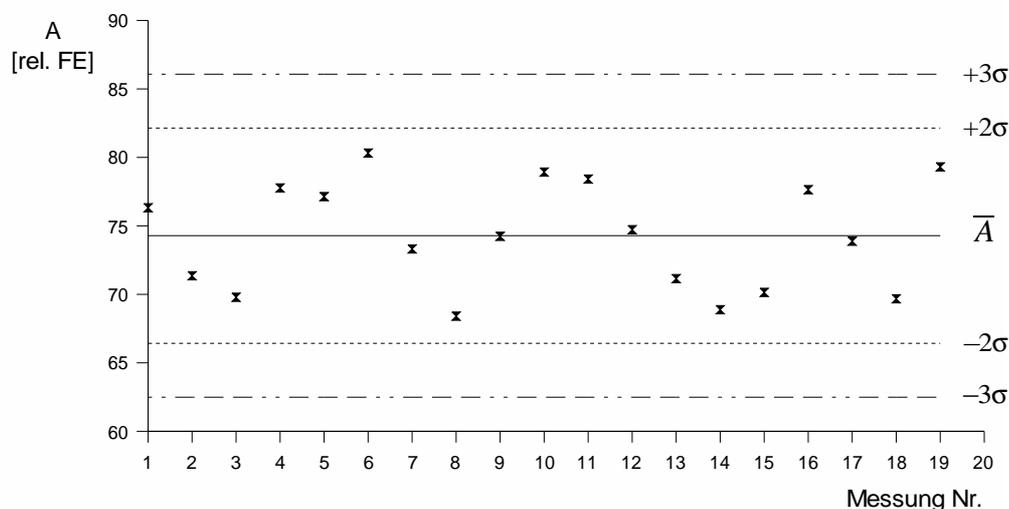


Abb. 61: Streuung der Messwerte bei einer Injektion und Positionierung von 21 nL. Tracer: Imidazol, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; $V_{\text{inj, theor.}}$: 21 nL; Injektionsgeschwindigkeit: $0,15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, Positioniergeschwindigkeit: $2,8 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Linearitätsverhalten des Injektionsvolumens

In der Kapillarelektrophorese ist das absolute Injektionsvolumen zweitrangig, solange das Trennsystem nicht überlastet wird. Die Reproduzierbarkeit der Werte besitzt größere Bedeutung. Die Abhängigkeit der Peakfläche vom Einzugsstellweg ist allerdings für die Optimierung einer Trennung von Bedeutung, weshalb eine Kalibrierkurve erstellt wird. Die Absorption der Imidazolösung wird durch eine Erhöhung der Konzentration von 5 auf $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ angehoben. Daneben wird die Geschwindigkeit, mit der die Probe durch den Detektor gezogen wird, um das 3fache erniedrigt, was zusätzlich eine Vergrößerung der Peakfläche bewirkt.

Vorversuche bei diesen Bedingungen zeigen, dass der vom Positioniersystem erzeugte Stellweg stark von der Wartezeit nach der Überbrückung des Spiels, d.h. vor der eigentlichen Injektion abhängig ist. Dies macht sich sowohl bei dem aufgegebenen Probenvolumen als auch beim Blindwert bemerkbar. Bei Blindversuchen wird die Kapillare mit dem Autosampler in das Probengefäß getaucht und ohne zu warten oder den Stellweg zu verändern wieder entfernt. Durch Diffusion und andere Effekte (Kap. 2.4.3.) gelangen schon beim Eintauchen ins Probengefäß geringe Mengen Imidazol in die Kapillare. Diese werden durch den Detektor gezogen und als Blindwerte bezeichnet. Die injizierte

Probenmenge bei den Einzugsstellwegen 2,5 μm (ca. 10 nL) und 0 μm (Blindwert) werden in Abhängigkeit von der Wartezeit nach dem Erreichen eines Stellwegs von 600 μm untersucht. Alle Messwerte werden automatisch durch den Ablauf der folgenden Schritte erhalten:

- Grundprogramm (S. 125) mit unterschiedlicher Wartezeit bei konstantem Hub.
- Das Kapillarenende befindet sich im Probengefäß. Mit konstanter Geschwindigkeit von 0,15 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird die Länge des Positioniersystems um 2,5 μm verkürzt. Der Autosampler befördert die Kapillare in ein Wassergefäß. Bei den Blindversuchen wird die Kapillare nur ca. 5 s in die Probenlösung eingetaucht.
- Mit 1,0 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird der Hub auf 150 μm reduziert und dabei die Probe durch den Detektor gezogen.
- Der Imidazolpfropfen wird mit 10 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ aus der Kapillare gedrückt.

Das Balkendiagramm in Abbildung 62 zeigt die Mittelwerte der erhaltenen Messwerte. Die schwarzen Balken stellen die Peakflächen der Blindwerte, die grauen Balken die experimentell ermittelten Flächen für eine 10 nL-Probe jeweils in Abhängigkeit der Wartezeit dar.

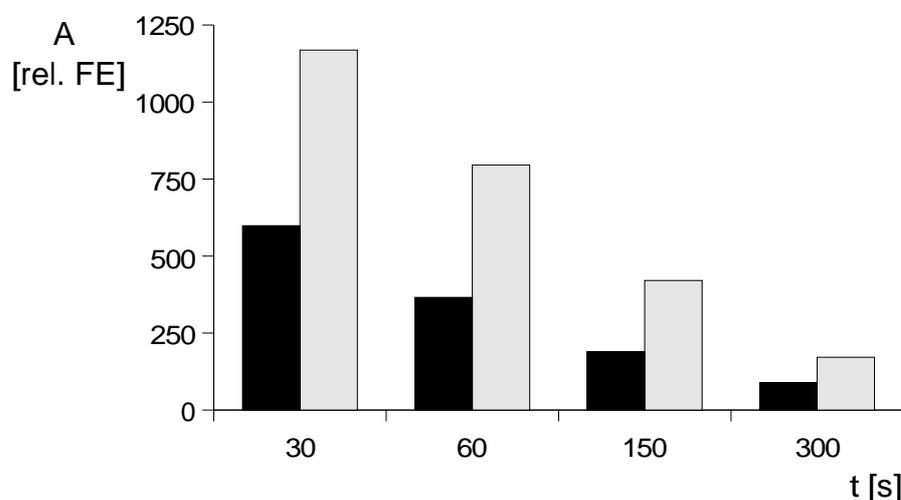


Abb. 62: Abhängigkeit des Injektionsvolumen von der Wartezeit vor der Injektion.

$V_{\text{inj, theor}}$: 10 nL (grau), Blindwert (schwarz); Tracer: Imidazol, 60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Injektionsgeschwindigkeit: 0,15 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, Positioniergeschwindigkeit: 1,0 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Diese Abhängigkeit erfordert in jedem Fall eine Automatisierung der Probeninjektion und ist größtenteils mit dem Kriechen des Piezo-Aktors zu begründen (Kap. 2.6.3.). Wird die

Auslenkung der Piezokeramik verkürzt, so beträgt das Positionskriechen ungefähr 1 % der letzten gesteuerten Positionsänderung pro Zeitdekade. Je länger die Wartezeit nach dem Überbrücken des mechanischen Spiels ist, desto weiter sinkt der absolute Stellweg und desto geringer ist die Differenz zu einem bestimmten Hub, bis zu welchem Probe injiziert wird. Daneben wird der erzeugte Unterdruck anscheinend längere Zeit aufrecht erhalten. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich in flexiblen Bauteilen, wie z.B. den Ventilen und Kunststoffkapillaren begründet. Ein Ersatz dieser Komponenten ist jedoch konstruktionsbedingt und aus finanziellen Gründen nicht möglich. Für das Auftreten der Blindwerte sind ferner die in Kapitel 2.4.3. beschriebenen Effekte der ubiquitären Injektion mitverantwortlich. Wegen der Abhängigkeit der aufgegebenen Volumina von der vorangegangenen Wartezeit entsprechen die berechneten Injektionsmengen nicht den Absolutwerten, liefern jedoch brauchbare Näherungen. Der Einfluss der Wartezeit nach dem Überbrücken des Spiels bzw. vor der eigentlichen Injektion wird durch eine konstante, d.h. für alle Versuche gleiche, Wartezeit umgangen.

Es wird eine Kalibrierkurve erstellt, um die Abhängigkeit der erzeugten Peakflächen vom Einzugsvolumen im Bereich von 0 – 20 nL und das Linearitätsverhalten aufzuklären (Abb. 63).

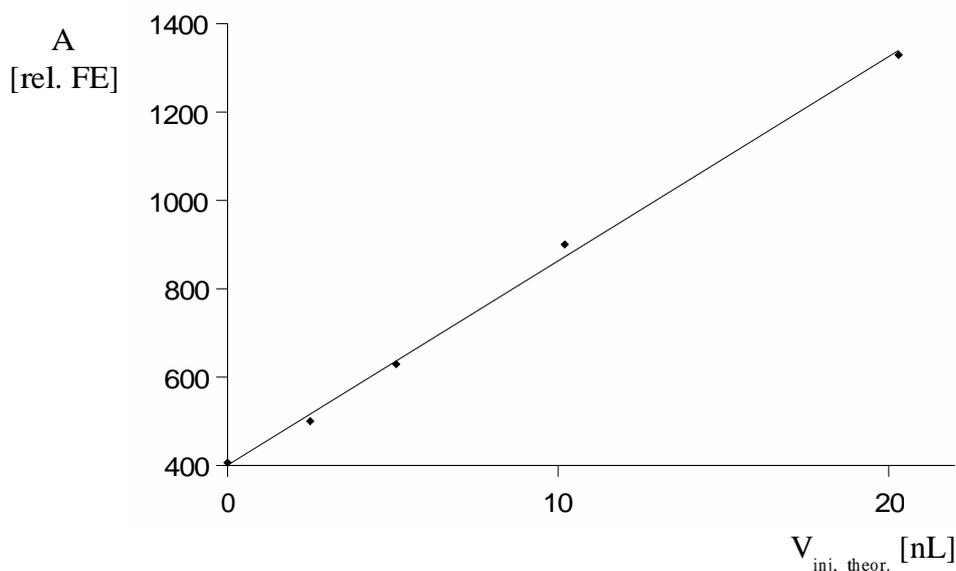


Abb. 63: Linearitätsverhalten des Injektionsvolumens.

Tracer: Imidazol, $60 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Injektionsgeschwindigkeit: $0,15 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, Positioniergeschwindigkeit: $1,0 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Die Regressionsgerade verdeutlicht die direkte Proportionalität zwischen Peakfläche und Einzugsstellweg ($R^2 = 0,9975$). Wie zu erwarten ist, besitzt die Kalibriergerade einen positiven y-Achsenabschnitt, der einem Volumen von etwa 9 nL im Verhältnis zu den

theoretisch berechneten entspricht. Tabelle 19 liefert die zum Graphen 63 gehörenden Daten. Die Injektionsvolumina werden mit der Annahme, dass durch 1000 μm maximalen Hub 4,15 μL verdrängt werden und diese Beziehung auch im nL-Bereich gilt, berechnet.

Tab. 19: Abhängigkeit der Peakflächen vom Injektionsvolumen.

Hub [μm]	V_{inj} [nL]	n	A [rel. FE]	VK [%]
0	Blindwert	7	407	9,1
0,61	2,5	6	500	8,8
1,22	5,1	6	629	4,8
2,44	10,2	6	900	4,0
4,88	20,3	7	1329	3,9

Exp. Bedingungen wie Abbildung 63.

n: Anzahl der Messungen, A: Peakfläche, rel. FE: relative Flächeneinheiten, VK: Variationskoeffizient.

Auch hier kann der Anstieg des Variationskoeffizienten bei abnehmenden Injektionsvolumina beobachtet werden. Die absolut injizierte Probenmenge ist, wie bereits erwähnt, zweitrangig, solange das elektrophoretische Trennsystem nicht überlastet wird und die Breite der Banden akzeptabel ist. Durch einen Stellweg von 0,61 μm wird durch den Piezo-Aktor nur ungefähr ein Viertel des Blindwertes zusätzlich in die Kapillare gesaugt. Bei der Streuung der Messwerte machen sich deshalb neben dem Fehler durch den Mikromanipulator auch die zufällige Diffusion und andere Kapillareffekte (Kap. 2.4.3.) bemerkbar. Die Diffusion könnte durch eine geringere Probenkonzentration reduziert werden, allerdings würde dann auch die Bestimmungsgrenze sinken.

3.2.4.2. Piezotranslator P-286.40

Da der Scheibentranslator P-286.40 nur einen maximalen Stellweg von 100 μm besitzt, liefert er in Verbindung mit μL -Spritzen Werte für das maximal verdrängbare Volumen, die weit unterhalb der Volumina der einzusetzenden Kapillaren liegen (Tab. 15, S. 122). Daraus folgt, dass diese Kombination zur Flusssteuerung innerhalb der Kapillare praktisch nicht geeignet ist.

Es werden daher Überlegungen angestellt, ob die Scheibenfläche direkt als Verdränger fungieren kann. Dazu wird vereinfachend angenommen, dass sich die Scheibe kegelförmig ausdehnt. Das verdrängte Volumen beträgt in diesem Fall $\frac{1}{3} \cdot r^2 \cdot \pi \cdot h$ mit einem Scheibenradius (r) von 20 mm. Mit den minimalen Stellwegen aus Tabelle 14 ergibt sich eine kleinste Auflösung von 0,64 nL bei Verwendung einer maximalen Ausgangsspannung von 2,5 V des DA-Wandlers. Die maximale Verdrängung berechnet sich in diesem Fall zu

10,5 μL . Obwohl ersterer Wert gemäß der Vorgabe aus Kapitel 2.5. zu hoch liegt, erscheint ein Versuch lohnend.

Zur Begrenzung des Flüssigkeitsraumes dienen ein O-Ring als Außendichtung und eine PMMA-Platte mit Anschlüssen für die Kapillare und ein Spülsystem. Es zeigt sich jedoch, dass durch den O-Ring eine zu große Spannung auf den Piezokristall wirkt, die letztendlich zu dessen Zerschlagen führt. Daneben sollten Piezoaktoren wegen der zum Betrieb nötigen Hochspannung generell nicht mit Flüssigkeiten in Kontakt kommen. Die Verwendung von Membranen zur kompletten Trennung von Piezo und Flüssigkeit scheidet allerdings aus, da diese in jedem Fall zu flexibel wären. Dazu kommt, dass der O-Ring selbst dieses Problem mit sich bringt. Die Konstruktion erscheint aus diesen Gründen ungeeignet, weshalb sie verworfen wird.

Kopplung des Disk-Translators (P-286.40) mit dem DC-Mike Actuator M-227.50

Aus Tabelle 14 (Seite 122) wird deutlich, dass bei geeigneter Steuerung der Scheibentranslator die beste Auflösung der vorhandenen Aktoren liefert und damit die Vorgaben aus Kapitel 2.5. leicht realisierbar wären. Um diesen Vorteil zumindest bei der Injektion nutzen zu können, wäre die Kopplung mit einem weiteren Aktor denkbar, der zur Überwindung der langen Stellwege dient. Hierfür bietet sich der motorgetriebene Linearaktor (M-227.50) an. Durch dessen großen Stellbereich von 50 mm kann die Spritzengröße vermindert werden, weshalb eine 50 μL -Spritze zum Einsatz kommt. Der Piezotranslator (P-286.40) wird auf eine PMMA-Platte montiert und über ein selbst gefertigtes Verbindungsstück mit dem Linearaktor M-227.50 verbunden. Dieser ist dazu mit einem Feingewinde (M10 \times 0,5) ausgestattet.

Der Kolben der 50 μL -Spritze hinterlässt mit seinem Durchmesser von lediglich 1,0 mm einen sehr flexiblen und labilen Eindruck. Bei unsachgemäßer Handhabung lässt er sich leicht verbiegen. Eine Messreihe, bei der o.a. Vorrichtung als Injektionssystem für eine Trennung von Kationen (K^+ , 20 ppm; Na^+ , 10 ppm; Li^+ , 3,0 ppm) dient, bestätigt diese Annahme. In einer Serie von 12 Bestimmungen werden bei einem Injektionsvolumen von 40 nL Variationskoeffizienten von 14 bis 16 % für die Peakflächen und 9,1 bis 13 % für die Peakhöhen erhalten (weitere Trennbedingungen: Elektrolyt: 4-Aminopyridin, 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Chromsäure, 2,7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8,8; Kapillare 75 $\mu\text{m} \times 340/490$ mm; V: 25 kV; Detektion: photometrisch, 262 nm). Von einer weiteren Verwendung der 50 μL -Spritze wird daher vorerst abgesehen und auf eine 100 μL -Spritze (Stempeldurchmesser: 1,5 mm) umgestellt.

Reproduzierbarkeit und ubiquitäre Injektion

Es werden Versuche zur Reproduzierbarkeit der Injektion und Probenpositionierung durchgeführt. Die Abmessungen der Kapillare betragen 75 $\mu\text{m} \times 500/750$ mm. Als Tra-

cer kommt wie o.a. eine Imidazolllösung, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, zum Einsatz. Die Prozessführung erfolgt folgendermaßen:

- Die Kapillare befindet sich in einem Reinstwassergefäß. Der Piezotranslator (P-286.40) wird auf den dem einzuziehenden Volumen entsprechenden Hub vorpositioniert.
- Zur Überbrückung des mechanischen Umkehrspiels wird der motorgetriebene Aktor (M-227.50) ca. 1 mm mit $21 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (entspricht $8,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ in der Kapillare) in Einzugsrichtung bewegt.
- 30 Sekunden lang wird bei konstantem Hub gewartet, anschließend die Kapillare in ein Probengefäß gebracht.
- Die Probenlösung wird mit dem Piezotranslator mit $0,10 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ injiziert, 30 s lang gewartet und in ein frisches Wassergefäß gewechselt.
- Durch eine Hubverringerng um 500.000 counts (ca. 1,77 mm) bei einer Geschwindigkeit von $21 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird der Tracer durch den Detektor gezogen und im kurzen Kapillarstück „geparkt“.
- Der Imidazolpfropfen wird mit $21 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ aus der Kapillare gedrückt und das Positioniersystem wieder in die Ausgangsposition gebracht.

Die Injektionsgeschwindigkeit wird an den für den piezoelektrischen Makro-Translator (P-290.00) ermittelten optimalen Wert angelehnt. Die Positioniergeschwindigkeit wird erhöht, um die Analysendauer zu verkürzen. Eine unsynchrone Bewegung von Spritzenstempel und Flüssigkeit in der Kapillare wird dabei in Kauf genommen und durch entsprechende Wartezeiten wieder kompensiert. In Tabelle 20 sind die Variationskoeffizienten der erhaltenen Peakflächen für die aufgegebenen Probenmengen zusammengestellt.

Tab. 20: Streuung der Messwerte für das jeweils injizierte Volumen.

V_{inj} [nL]	n	VK [%]
17	8	4,0
8,4	7	4,4
4,2	8	10,3

Tracer: Imidazol, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Injektionsgeschwindigkeit: $0,10 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, Positioniergeschwindigkeit: $21 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

n: Anzahl der Messungen, VK: Variationskoeffizient.

Die lineare Abhängigkeit der Peakfläche vom Injektionsvolumen ist mit einem Bestimmtheitsmaß von 1,000 gegeben. Wie schon beim piezoelektrischen Makro-Translator (P-290.00) in Verbindung mit einer 250 μL -Spritze ist die Reproduzierbarkeit besonders bei kleinen Volumina unbefriedigend. Ein Hauptgrund hierfür dürfte von den kleinen Peakflächen und der damit verbundenen Unsicherheit bei der Integration herrühren. Daneben soll aber untersucht werden, inwieweit Diffusions- und ubiquitäre Injektionseffekte eine Rolle spielen. Es wird dazu folgendermaßen verfahren:

- Um eine Entstehung von Unterdruck zu vermeiden, wird ohne Vorpositionierung von Reinstwasser in ein Probengefäß gewechselt.
- In diesem wird eine definierte Zeit ohne Stellwegänderung gewartet und die Kapillare anschließend in ein frisches Wassergefäß gebracht.
- Durch eine Hubverringerng um 500.000 counts (ca. 1,77 mm) bei einer Geschwindigkeit von $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird ein evtl. injizierter Tracer durch den Detektor gezogen und im kurzen Kapillarstück „geparkt“.
- Mit $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird er anschließend wieder aus der Kapillare gedrückt und das Positioniersystem in die Ausgangsposition gebracht.

Mit Wartezeiten von 30 bis 300 s ergibt sich dabei der in Abbildung 64 dargestellte Verlauf.

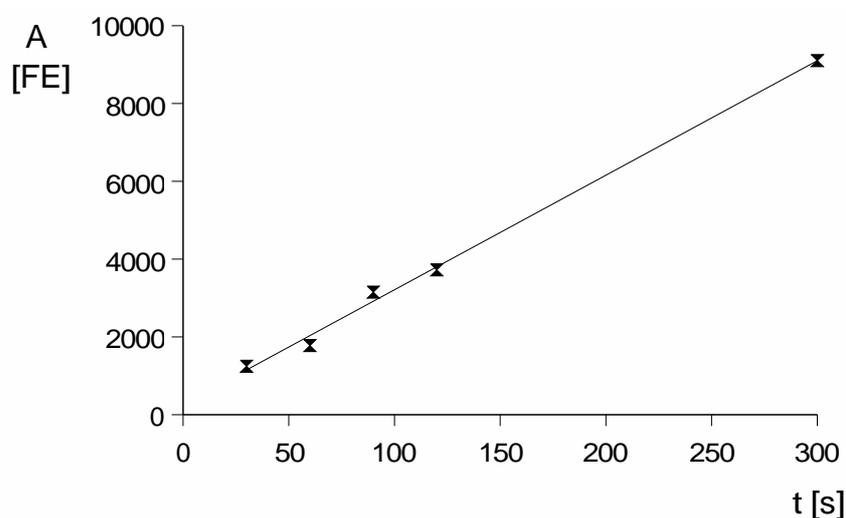


Abb. 64: Ubiquitäre Injektion in die Kapillare in Abhängigkeit der Zeit.
Tracer: Imidazol, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Positioniergeschwindigkeit: $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Ein deutlicher Anstieg der Peakflächen mit steigender Wartezeit ist erwartungsgemäß sichtbar. Die Reproduzierbarkeit der Peakflächen ist durchwegs mit Variationskoeffizien-

ten von bis zu 44 % sehr gering, was besonders bei der Injektion kleiner Volumina eine gewisse Unsicherheit mit sich bringt. Bei einer Ruhezeit in der Probe von 2 Minuten resultiert eine Peakfläche, die in etwa durch eine Injektion von berechneten 4 nL entstehen würde. Trotz dieses relativ geringen Werts sollte die Verweilzeit in der Probe so kurz wie möglich sein. Das scheinbar lineare Verhalten in Abbildung 64 kommt vermutlich aufgrund des gewählten, relativ engen Zeitbereichs zustande, in der die Krümmung der Wurzelfunktion (Kap. 2.4.3.4., S. 51) nicht mehr so offensichtlich ist.

Die Verweilzeit in der Probe wird verkürzt, indem diese zum einen mit einer um den Faktor 10 höheren Geschwindigkeit ($1,0 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) injiziert und andererseits die Wartezeit nach der Injektion auf 10 s vermindert wird. Um den Integrationsfehler im unteren Volumenbereich zu vermindern, wird für das Injektionsvolumen von 4,2 nL eine Imidazolösung, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, verwendet. Die Resultate sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tab. 21: Streuung der Messwerte für das jeweils injizierte Volumen bei verminderter Injektionsdauer.

V_{inj} [nL]	n	VK [%]
17	10	1,6
8,4	10	2,4
4,2	8	1,5*

* Erhöhung der Konzentration des Tracers auf $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tracer: Imidazol, 5 bzw. $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Injektionsgeschwindigkeit: $1,0 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, Positioniergeschwindigkeit: $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

n: Anzahl der Messungen, VK: Variationskoeffizient.

Durch die kürzere Verweilzeit und schnellere Injektion tritt eine merkliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit auf. Für eine Injektion von 4,2 nL wird bereits eine Reproduzierbarkeit von nur noch 1,5 % erhalten, nachdem Integrationsfehler, hervorgerufen durch sehr kleine Peakflächen, vermindert werden. Es ist zu beachten, dass der Fehler nicht nur durch die Injektion, sondern auch durch das Positionieren innerhalb der Kapillare zustande kommt. Die Reproduzierbarkeit der Injektion alleine dürfte folglich erheblich höher sein. Versuche die Konzentration des Tracers auf $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ zu erhöhen verschlechtern jedoch wieder die Reproduzierbarkeit, vermutlich weil die Effekte der Diffusion deutlich verstärkt werden. Diffusionsversuche bei dieser Konzentration bestätigen die in Abbildung 64 gezeigten Ergebnisse. Es tritt wiederum ein scheinbar linear verlaufender Anstieg der Peakfläche mit der Ruhezeit (10 bis 120 s) in der Probe auf. Die erhaltenen Peakflächen sind erwartungsgemäß bei gleicher Wartezeit um den Faktor 9 bis 16 größer.

Die Kombination aus dem Piezotranslator P-286.40 und dem motorgetriebenen Aktor M-227.50 ist offensichtlich für das geplante Aufgabengebiet geeignet. Allerdings ist sie noch mit einigen Nachteilen behaftet. So muss beispielsweise der erste Wert einer Messreihe i.d.R. verworfen werden, da die Vorgeschichte der Bewegung des Piezoaktors mit den nachfolgenden Messungen nicht identisch ist und somit die Probleme des Betriebs von Piezotranslatoren im unregelmäßigen Betrieb (Kap. 2.6.3., S. 60) zum Tragen kommen. Daneben weist der Scheibentranslator wie alle Piezokristalle eine Empfindlichkeit gegen Scher- und Zugspannungen auf. Die Betriebsparameter ermöglichen zwar wie o.a. einen problemlosen Betrieb. Unsachgemäße Behandlung und Störfälle wie z.B. ein Verkanten des Spritzenstempels würden jedoch schnell zur Zerstörung des Aktors führen. Aus diesen Gründen soll überprüft werden, ob der motorgetriebene Linearaktor alleine den Anforderungen an das zu entwickelnde Positioniersystem genügt.

3.2.4.3. DC-Mike Actuator M-227.50

Neben der Kostenreduzierung spricht auch die Verminderung der Anzahl von mechanischen Verbindungselementen und Halterungen für die direkte Kopplung des Motoraktors an den Spritzenstempel. Der Stempel wird praktisch direkt über eine selbst gefertigte Klemmvorrichtung, welche aktorseitig über das oben erwähnte Feingewinde fest verbunden ist, an den Translator befestigt. Das mechanische Umkehrspiel wird somit minimiert und die Aktorbewegung unmittelbar auf den Stempel übertragen. Die Vorgaben gemäß Kapitel 2.5. sind sicher erfüllbar (Tab. 14, Seite 122).

Die Abmessungen der Kapillare betragen $75 \mu\text{m} \times 500/750 \text{ mm}$. Als Tracer kommt eine Imidazolösung, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, zum Einsatz. Wie o.a. wird eine $100 \mu\text{L}$ -Spritze verwendet. Die Prozessführung erfolgt folgendermaßen:

- Die Kapillare befindet sich in einem Reinstwassergefäß. Zur Überbrückung des mechanischen Umkehrspiels wird der motorgetriebene Linearaktor ca. 1 mm mit $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (entspricht $8,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ in der Kapillare) in Einzugsrichtung bewegt.
- 10 Sekunden lang wird bei konstantem Hub gewartet, anschließend die Kapillare in ein Probengefäß gebracht.
- Die Probenlösung wird mit $1,7 \text{ nL}\cdot\text{s}^{-1}$ injiziert, 3 s lang gewartet und in ein frisches Wassergefäß gewechselt.
- Durch eine Hubverringerung um 500.000 counts (ca. $1,77 \text{ mm}$) bei einer Geschwindigkeit von $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird der Tracer durch den Detektor gezogen und im kurzen Kapillarstück 10 s „geparkt“.

- Der Imidazolpfropfen wird mit $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ aus der Kapillare gedrückt und das Positioniersystem wieder in die Ausgangsposition gebracht.

In Tabelle 22 sind die Variationskoeffizienten der erhaltenen Peakflächen für die angegebenen Probenmengen zusammengestellt.

Tab. 22: Streuung der Messwerte für das jeweils injizierte Volumen.

V_{inj} [nL]	n	VK [%]
25	9	0,83
20	10	1,5
15	10	1,3
10	10	0,60
5,0	8	1,9

Tracer: Imidazol, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Injektionsgeschwindigkeit: $1,7 \text{ nL}\cdot\text{s}^{-1}$, Positioniergeschwindigkeit: $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

n: Anzahl der Messungen, VK: Variationskoeffizient.

Abbildung 65 stellt die Peakflächen in Abhängigkeit des Injektionsvolumens dar.

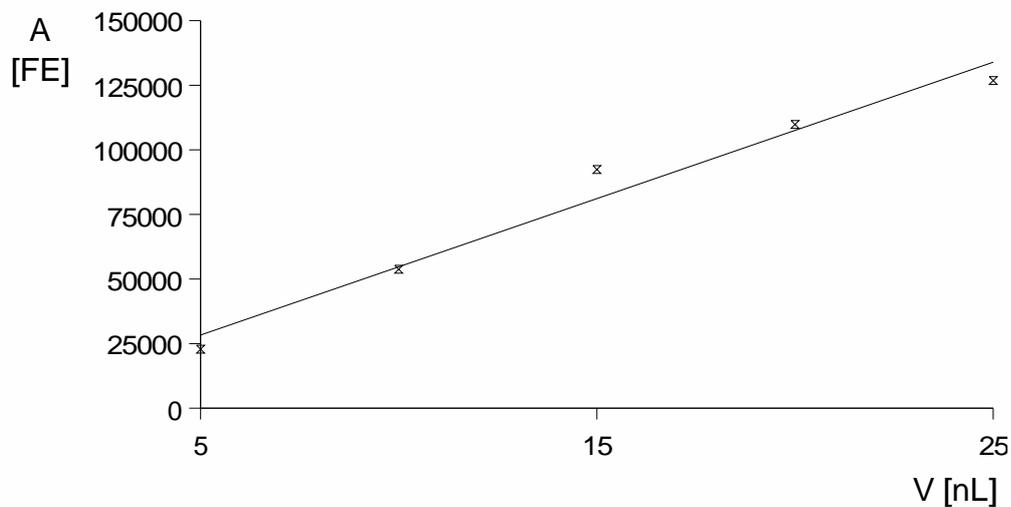


Abb. 65: Linearitätsverhalten des Injektionsvolumen.

Tracer: Imidazol, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Injektionsgeschwindigkeit: $1,7 \text{ nL}\cdot\text{s}^{-1}$, Positioniergeschwindigkeit: $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Die Versuchsreihen liefern überzeugende Reproduzierbarkeiten. Es wird daher beschlossen, den Linearaktor M-227.50 für das Positioniersystem einzusetzen. Bei der Untersuchung des Linearitätsverhaltens fällt ein etwas erhöhter Wert bei einem Injektionsvolumen

von 15 nL auf, wodurch das Bestimmtheitsmaß auf einen Wert von 0,970 fällt. Die Erklärung hierfür liegt vermutlich darin begründet, dass dieses Volumen bei geringer Raumtemperatur mit frisch entgastem Reinstwasser im Positioniersystem vermessen wurde. Es kann generell festgestellt werden, dass die für ein berechnetes Einzugsvolumen erhaltenen Signale innerhalb einer Messreihe sehr reproduzierbar sind, der Absolutwert jedoch vom Entgasungsgrad und der Temperatur der Lösung abhängt. Es wird daher eine Temperierung für das gesamte Positioniersystem vorgeschlagen, kann aber im Rahmen dieser Dissertation aus Kostengründen nicht realisiert werden.

Optimierung der Systemparameter

Im Weiteren werden die Eigenschaften des Injektionssystem näher untersucht und optimiert. Zunächst soll untersucht werden, inwiefern sich eine Veränderung der Positioniergeschwindigkeit auswirkt. Dazu wird nach der Vorpositionierung ein Volumen von theoretisch 10 nL injiziert und mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch den Detektor gezogen. Anschließend wird die Probenzone mit $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wieder ausgestoßen. Anhand des durch das Ausstoßen erzeugten Peaks kann auf die Bandenverbreiterung durch das Positionieren zurückgeschlossen werden. Dabei werden zwei gegenläufige Effekte erwartet. Zum einen sollte die Bandenverbreiterung mit der Durchflussgeschwindigkeit zunehmen, zum anderen die entstehende Zone mit der Zeit durch Diffusion zunehmen, so dass sich in diesem Fall ein niedrige Durchflussgeschwindigkeit negativ auswirkt. Der Untersuchungsbereich erstreckt sich von $0,67$ bis $13,4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ bezogen auf die Geschwindigkeit in der Kapillare (Tab. 23).

Für alle überprüften Geschwindigkeiten liegen die ermittelten Durchflusszeiten deutlich hinter den berechneten zurück. Die Abweichungen nehmen mit steigender Durchflussgeschwindigkeit zu. Eine Ausnahme stellt hierbei lediglich die kleinste Geschwindigkeit dar, bei der die Abweichung im Vergleich zum nächstschnelleren Durchziehen wieder ansteigt. Im gemessenen Bereich nimmt die Bandenverbreiterung mit zunehmender Positioniergeschwindigkeit zu. Im Vergleich zu den bandenverbreiternden Effekten durch den hydrodynamischen Fluss sind die der Diffusion folglich vernachlässigbar. Das Ergebnis spricht für eine niedrige Positioniergeschwindigkeit. Um die Analysendauer der nachfolgenden Versuche gering zu halten, wird dennoch mit einer Geschwindigkeit von $21 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (entspricht $8,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ in der Kapillare) fortgefahren und somit eine zusätzliche Bandenverbreiterung sowie ein Nachfließen der Flüssigkeit in der Kapillare in Kauf genommen. Die Variationskoeffizienten der Zeiten für die ausgestoßenen Peaks der Messreihen aus Abbildung 65 und Tabelle 22 liegen deutlich unter 1 %, so dass bei dieser Geschwindigkeit von einer genauen Positionierung ausgegangen werden kann. Zur Verminderung

Tab. 23: Abweichung der Positioniergeschwindigkeit vom theoretischen Wert.

v_{Kap} [mm·s ⁻¹]	t_{soll} [s]	t_{ist} [s]	Δ [%]	$b_{0,5}$ [LE] *
0,67	746	836	12,1	2388
1,3	373	407	9,02	2550
2,7	186	207	11,2	2766
4,0	124	142	14,3	3048
5,4	93	109	16,6	3173
6,7	75	88	18,3	3435
8,0	62	74	19,5	3813
9,4	53	65	21,3	4063
10,7	47	57	21,7	4070
12,1	41	51	22,7	4262
13,4	37	46	23,6	4447

* bezogen auf den durch das Ausstoßen mit konstanter Geschwindigkeit erzeugten Peak. Die Berechnung erfolgt vereinfachend als Quotient aus Peakfläche und -höhe. Die Peakflächen stimmen mit einem Variationskoeffizienten von 1,4 % gut überein.

Tracer: Imidazol, 20 mmol·L⁻¹; V_{Inj} : 10 nL; Injektionsgeschwindigkeit: 1,7 nL·s⁻¹.

v_{Kap} : Geschwindigkeit in der Kapillare, t: Zeit, Δ : Abweichung, $b_{0,5}$: Halbwertsbreite, LE: Längeneinheiten.

der Bandenverbreiterung kann bei Bedarf jederzeit auf eine niedrigere Geschwindigkeit umgestiegen werden.

Die Einzugs geschwindigkeit wird optimiert. Dazu werden je 10 nL mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten injiziert und wie o.a. durch den Detektor gezogen und wieder ausgestoßen. Für 5 nL·s⁻¹ tritt dabei ein Maximum der Peakfläche auf (Abb. 66).

In weiteren Versuchen zeigt sich jedoch, dass sich die Reproduzierbarkeit bei dieser Geschwindigkeit verschlechtert. Im Vergleich zu 0,60 % bei 1,7 nL·s⁻¹ wird nur noch ein Variationskoeffizient von ca. 2 % erreicht. Da bei 1,7 nL·s⁻¹ ebenfalls ein lokales Maximum auftritt, werden alle weiteren Versuche mit dieser Injektionsgeschwindigkeit durchgeführt.

Bei diesem Wert befindet sich die Kapillare für eine Injektion von 5, 10, 15, 20 und 25 nL entsprechend 6, 9, 12, 15 und 18 s im Probengefäß, wenn eine Wartezeit von 3 s nach der Injektion eingerechnet und die Zeiten der Bewegung des Autosamplers vernachlässigt werden. Mit einer Imidazolösung, 20 mmol·L⁻¹, wird der Einfluss der Effekte der ubiquitären Injektion bei diesen Zeiten untersucht. Es ergeben sich keine auswertbaren Signale, was für eine ausreichende Verkürzung der Injektionszeit spricht.

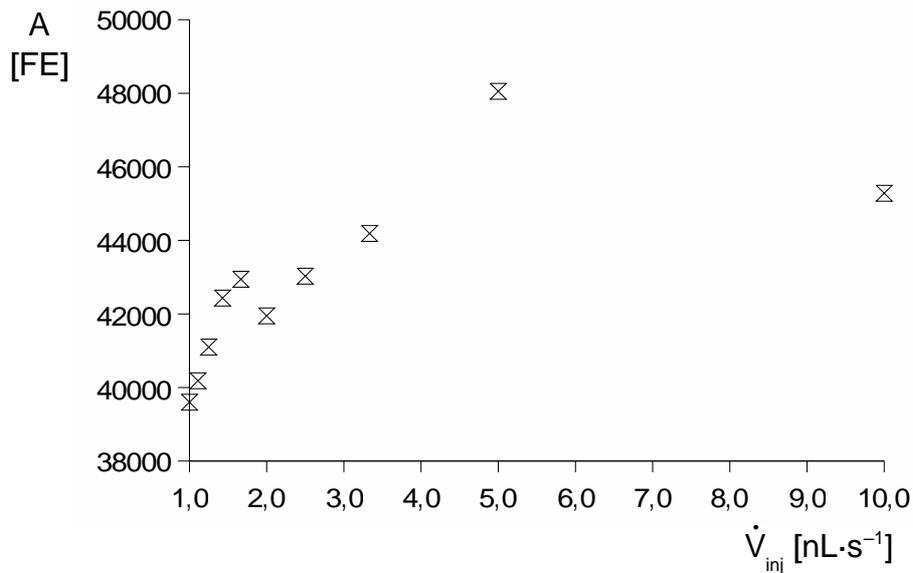


Abb. 66: Abhängigkeit des injizierten Volumens von der Einzugs geschwindigkeit.
Tracer: Imidazol, 20 mmol·L⁻¹; $V_{inj, theor.}$: 10 nL; Positioniergeschwindigkeit: 21 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Bei den Untersuchungen des piezoelektrischen Makro-Translator (P-290.00) ist festzustellen, dass die Wartezeit vor der eigentlichen Injektion einen Einfluss auf das Injektionsvolumen hat. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob das Positioniersystem mit dem motorgetriebenen Stellglied ein vergleichbares Verhalten zeigt. Dazu wird folgendermaßen vorgegangen:

- Die Kapillare befindet sich in einem Reinstwassergefäß. Zur Vorpositionierung wird der Aktor ca. 1 mm mit 21 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (entspricht 8,0 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ in der Kapillare) in Einzugsrichtung bewegt.
- Bei konstantem Hub wird unterschiedlich lange gewartet, anschließend die Kapillare in ein Probengefäß gebracht.
- Ohne Stellwegänderung wird 9 s (entsprechend der Dauer einer 10 nL-Injektion mit 1,7 $\text{nL}\cdot\text{s}^{-1}$) lang gewartet und in ein frisches Wassergefäß gewechselt.
- Durch eine Hubverringerung um 500.000 counts (ca. 1,77 mm) bei einer Geschwindigkeit von 21 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wird eine evtl. injizierte Tracerzone durch den Detektor gezogen und im kurzen Kapillarstück 10 s lang „geparkt“.
- Der Imidazolpfropfen wird mit 21 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ aus der Kapillare gedrückt und das Positioniersystem wieder in die Ausgangsposition gebracht.

In der Tat tritt auch hier ein Blindwert auf (Abb. 67, schwarze Balken).

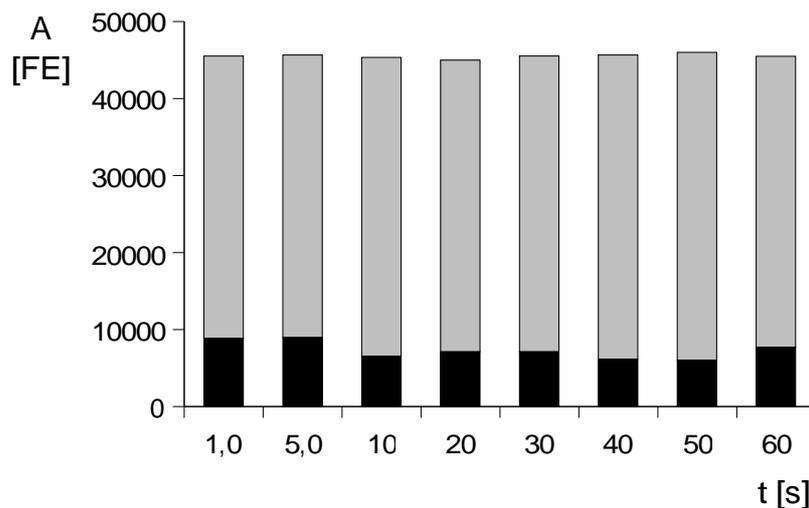


Abb. 67: Abhängigkeit des Injektionsvolumen von der Wartezeit vor der Injektion.

$V_{inj, theor}$: 10 nL (Summe graue + schwarze Balken), Blindwert (schwarze Balken); Tracer: Imidazol, 20 mmol·L⁻¹; Injektionsgeschwindigkeit: 1,7 nL·s⁻¹, Positioniergeschwindigkeit: 21 μm·s⁻¹.

Eine starke Abnahme dieses Blindwertes mit zunehmender Wartezeit vor der Injektion kann jedoch nicht beobachtet werden. Im untersuchten Bereich nimmt der Blindwert nur geringfügig ab. Ein Kriechen wie beim piezoelektrischen Makro-Translator (P-290.00) kann ausgeschlossen werden, da der M-227.50 zum einen als Motor dieses Phänomen nicht aufweist und zum anderen im geschlossenen Regelkreis betrieben wird und solche Effekte damit kompensiert würden. Vermutlich bleibt ein Teil des durch die Vorpositionierung erzeugten Unterdrucks einige Zeit erhalten und führt letztlich zur ungewollten Injektion. Um zu untersuchen, inwieweit die im System befindliche Flüssigkeit dafür verantwortlich ist, wird als weiterer Versuch nach dem Vorpositionieren das Ventil zum detektorseitigen Elektrolytgefäß geöffnet. Ein durch z.B. gelöstes Gas verursachtes Nachziehen würde sich dabei rasch abbauen. Es zeigt sich jedoch, dass selbst bei dieser Verfahrensweise ein vergleichbarer Blindwert auftritt. Das Nachziehen kommt folglich vermutlich durch das Positioniersystem selbst zustande. Um zu klären, ob sich dies negativ auf die Injektion auswirkt, wird wie beim Blindwert verfahren, jedoch durch eine Stellwegverringern von 6,0 μm ein Volumen von theoretisch 10 nL injiziert. Die erhaltenen Peakflächen sind in Abbildung 67 als Summe der schwarzen und grauen Balken zu entnehmen. Wie dort ersichtlich ist und durch einen Variationskoeffizienten von 0,63 % bestätigt wird, wirkt sich der im System aufrechterhaltene Unterdruck nicht negativ auf die Injektionsreproduzierbarkeit aus. Eine längere Wartezeit vor der Injektion ist folglich

unnötig. Es kann praktisch sofort nach der Vorpositionierung in das Probengefäß gewechselt werden.

Schließlich soll ermittelt werden, wie sich ein Verbleiben im Probengefäß nach der Injektion auswirkt. In einer Messreihe mit Wartezeiten von 5, 10, 30 und 60 s nach der Injektion zeigt sich, dass das injizierte Volumen vermutlich durch Diffusionseffekte mit zunehmender Wartedauer steigt. Da diese Effekte mit einer großen Unsicherheit behaftet sind, sollte optimalerweise unmittelbar nach der Injektion das Probengefäß verlassen werden. Ein dadurch hervorgerufenen Einbringen von Luft kann nicht beobachtet werden.

3.2.4.4. Spritzenpumpe

Eine speziell angefertigte Spritzenpumpenmechanik, Firma Sykam, Eresing, mit Kontrolleinheit, SMC 42 OSA-2A-1, Firma Nanotec, München, wird als kostengünstige Alternative zu den o.a. Stellelementen untersucht. Hierbei muss für die Steuerung ein anderes Konzept entwickelt werden, da eine absolute Stellwegänderung, wie dies bei den o.a. Aktoren möglich ist, bei der Spritzenpumpensteuerung nicht programmiert werden kann. Es lässt sich lediglich über ein TTL-Signal die Bewegungsrichtung des Kolbens sowie dessen Geschwindigkeit über eine Eingangsspannung von 0 – 10 V vorgeben. Ein weiteres TTL-Signal kann zur Sperrung der Eingabe dienen, d.h. selbst bei angelegter Spannung erfolgt dann keine Bewegung. Ein bestimmter Stellweg ist nach der Beziehung Weg gleich Geschwindigkeit mal Zeit zu realisieren. Kleine Stellwege erfordern somit eine möglichst niedrige Geschwindigkeit und Zeit.

Die Abhängigkeit der Positioniergeschwindigkeit von der Steuerspannung wird untersucht. Die Ergebnisse im Bereich von 10 bis 100 mV sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tab. 24: Positioniergeschwindigkeit der Spritzenpumpe, Firma Sykam, Eresing, in Abhängigkeit der Steuerspannung.

U [mV]	v [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]	VK [%]	\dot{V} [$\text{nL}\cdot\text{s}^{-1}$] *
10	7,8	1,7	13
25	15	2,0	25
50	26	2,5	44
75	38	2,1	63
100	50	1,7	83

* 100 μL -Spritze.

U: Steuerspannung; je 10 Messungen.

Selbst bei einer Steuerspannung von 10 mV würde theoretisch noch ein Volumenstrom von 13 $\text{nL}\cdot\text{s}^{-1}$ resultieren. Die Linearität ist mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9998 gegeben. Allerdings weist die Regressionsgerade einen positiven Achsenabschnitt auf, der

vermutlich von einem geringen offset-Fehler der DA-Wandler-Karte herrührt. Auch unter der Annahme, dass die Linearität bis zu den minimalen Ausgabewerten des DA-Wandlers (Tab. 13, S. 120) gegeben ist, ist ein Volumenstrom unter $6 \text{ nL}\cdot\text{s}^{-1}$ kaum realisierbar. Wird von einer machbaren Steuerzeit von 100 ms, die bereits im Grenzbereich der verwendeten Steuerung liegt, ausgegangen, würde sich theoretisch ein minimal handhabbares Volumen im unteren nL-Bereich ergeben. Steuertechnisch wird so vorgegangen:

- Die Freigabe der Steuereinheit ist gesperrt.
- Die Richtung sowie die Steuerspannung werden vorgegeben.
- Für die gewünschte Zeit wird die Steuerung freigegeben; der Spritzenstempel bewegt sich entsprechend der Vorgaben.
- Nach dem Ablauf der Zeit wird die Freigabe zurückgenommen und erst anschließend die Steuerspannung auf 0 gesetzt.

Es soll wie bei den anderen Aktoren ermittelt werden, ob eine befriedigende Reproduzierbarkeit für die Injektion und das anschließende Ziehen der Probenzone durch den Detektor erhalten werden kann. Vorversuche ergeben, dass erhebliche Abweichungen zwischen theoretisch berechneten und praktisch ermittelten Werten auftreten. Beispielsweise weicht die Zeit, die die Probenzone zum Erreichen des Detektorfensters bei einer Steuerspannung von 50 mV benötigt, um 87 % vom theoretischen Wert ab (Kapillare $75 \mu\text{m} \times 500/750 \text{ mm}$). Die Reproduzierbarkeit ist jedoch mit 0,89 % ($n = 10$) gegeben. Für das Injektionsvolumen wird ein ähnlicher Sachverhalt gefunden. Das tatsächlich injizierte Volumen liegt weit unterhalb des theoretischen. Für eine Injektionszeit von 10 s bei einer Steuerspannung von 10 mV resultieren beispielsweise Flächen, die unter Verwendung der für den motorgetriebenen Linearaktor (M-227.50) ermittelten Kalibriergeraden (Abb. 65, S. 138), einem Injektionsvolumen von 10 nL entsprechen (Tracer: Imidazol, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Theoretisch sollte sich ein Wert von 130 nL ergeben. Eine zufriedenstellende Erklärung für die enormen Abweichungen kann bisher nicht gegeben werden. Allerdings ist auch hier die Reproduzierbarkeit mit 2,9 % gut. Für kürzere Injektionszeiten ergeben sich weitaus höhere Variationskoeffizienten von über 10 %. Ferner weisen die Peakflächen in Abhängigkeit der berechneten Injektionsvolumina kein lineares Verhalten auf. Die optimalen Parameter sind folglich jeweils im Experiment zu ermitteln. Für ein kostengünstiges System und Anwendungen, bei dem dieses Verhalten in Kauf genommen werden kann, erscheint die Spritzenpumpe bei geeigneter Prozessführung jedoch als tauglich.

3.2.5. Kapillarelektrophorese

Die beschriebenen und erprobten Systeme sollen unter anderem der Probenaufgabe in der Kapillarelektrophorese dienen. Zusätzlich soll überprüft werden, ob es gelingt mittels Mikromanipulator Kationen und Anionen in einem Lauf zu bestimmen. Grundlage für die Simultanbestimmung ist die Möglichkeit, die aufgegebene Probe ungefähr in die Mitte der Kapillare zu bewegen und die Ladungsträger nach der Trennung durch den Detektor zu ziehen.

Da der Schwerpunkt der Arbeit auf der apparatetechnischen Seite liegt, ist das Ziel der folgenden Untersuchungen weniger die Optimierung eines schwierigen Trennproblems mit vielen Analyten sondern das Aufzeigen der Möglichkeiten des neuen Injektionssystems und dessen Charakterisierung in Kapillarelektrophoresesystemen.

Die Kapillare wird vor der ersten Verwendung sowie bei Bedarf 10 Minuten mit Natronlauge, $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, und anschließend 10 Minuten mit Reinstwasser konditioniert. Daran schließt sich eine mindestens 30minütige Spülung mit dem Laufpuffer und ein Anlegen der Trennungsspannung an, bis sich eine gleichmäßige Basislinie ergibt. Werden Puffer mit hohen pH-Werten verwendet, erfolgt zusätzlich eine Spülung mit Salzsäure, $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.2.5.1. Eigenheiten der Apparatur

Das System kann sowohl einseitig geschlossen als auch beidseitig offen betrieben werden [143]. Im einseitig geschlossenen Betrieb, welcher einem Fluss des Leitmediums (EOF) normalerweise entgegensteht, kann unter Verwendung des Mikromanipulators regelnd eingegriffen werden, d.h. eine Überlagerung des EOF mit einem hydrodynamischen Fluss ist möglich. Dieser kann dabei sowohl gegen als auch in Richtung des EOF angelegt werden. Der Betrieb im einseitig geschlossenen System wird anhand einer Anionenbestimmung ohne Umkehr des elektroosmotischen Flusses untersucht. Als Probe dienen Cl^- , SO_4^{2-} und NO_3^- mit je 10 ppm. Die Detektion erfolgt indirekt photometrisch bei 262 nm mit einer $2,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2CrO_4 -Lösung (pH 8,3) als Hintergrundelektrolyten. Die Trennungsspannung beträgt -20 kV; die Kapillardimensionen sind $75 \mu\text{m} \times 340/490 \text{ mm}$. Die Migrationsreihenfolge lautet unter diesen Bedingungen Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- . Chlorid und Sulfat migrieren sehr ähnlich und können im beidseitig offenen Betrieb gerade Basislinien-getreunt werden. Im einseitig geschlossenen System sind die Migrationszeiten erwartungsgemäß erheblich kürzer, da im beidseitig offenen Betrieb die Anionen gegen den EOF migrieren müssen. Die Trennung verschlechtert sich jedoch aufgrund einer starken Bandenverbreiterung deutlich. Eine Trennung von Cl^- und SO_4^{2-} ist nicht mehr möglich. Zudem weisen die Peaks eine deformierte Peakform auf. Das einseitig geschlossene System bietet somit offenbar keine Vorteile und weist zudem schwer vorhersagbare Effekte auf. Der Betrieb im offenen System wird daher bevorzugt, um die

Effekte durch den blockierten EOF zu vermeiden. Für den einseitig geschlossenen Betrieb ist ein Schließen des Ventils zum detektorseitigen Elektrolytgefäß, in der sich die Gegenelektrode befindet, erforderlich. Obwohl dadurch eigentlich der Stromkreis unterbrochen werden müsste, hat sich herausgestellt, dass weiterhin der volle Stromfluss aufrecht erhalten wird. Eine Beschädigung des Ventils tritt nicht auf.

Vorversuche zeigen jedoch, dass es nach dem Anlegen von Spannung zum Erliegen des Stromflusses innerhalb von 30 Minuten kommt, wenn sich Kanäle aus Metall (z.B. 6-Wege-Ventil, T-Stück aus Edelstahl) im Trennsystem befinden. Anscheinend kommt es an den Metalloberflächen zur Elektrolyse und somit Gasentwicklung, welche zur Unterbrechung des Stromkreises führt. Alle Metallteile werden daher durch Bauteile aus Kunststoff ersetzt.

Beide Elektroden bestehen aus einem 0,5 mm dicken Platindraht. Die Elektrode im Autosampler trägt die Hochspannung (negative oder positive Polarität), der Platindraht im detektorseitigen Elektrolytgefäß liegt auf Masse.

3.2.5.2. Evaluierung des Injektionssystems

Die entwickelte Injektionsmethode wird zunächst an elektrophoretischen Kationentrennungen erprobt, welche mit indirekter UV-Detektion durchgeführt werden.

Als Beispiel für ein piezoelektrisches Positioniersystem wird der Makro-Translator (P-290.00) in Verbindung mit einer 250 µL-Spritze herangezogen, da diese Kombination sowohl die Injektion im nL-Bereich als auch die Flusssteuerung ermöglicht. Als Hintergrundelektrolyt kommt eine Imidazolösung, 5 mmol·L⁻¹, mit einem pH-Wert von 4,1 (durch verdünnte Schwefelsäure eingestellt) zum Einsatz. Getrennt wird ein Substanzgemisch, welches aus 20 ppm K⁺, 10 ppm Na⁺, 10 ppm Ca²⁺ und 5 ppm Mg²⁺ besteht. Durch Vorversuche wird ein geeignetes Injektionsvolumen ermittelt, bei dem das Trennsystem noch nicht überladen, die Intensität der erzeugten Peaks maximal und die Substanzen getrennt sind, wobei sich ein Volumen von 30 nL als optimal herausstellt. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 20 kV, die Detektion bei 207 nm. Eine Overlaygraphik aus 10 Elektropherogrammen einer Messreihe ist in Abbildung 68 dargestellt.

Der erzeugte Stromfluss beträgt bei allen Messungen ca. 9 µA. Die Variationskoeffizienten der Peakflächen für elf Messungen sind in Tabelle 25 zusammengestellt.

Es ist ersichtlich, dass die Variationskoeffizienten nur geringfügig voneinander abweichen. Der Fehler liegt im Bereich von 5 %, was noch nicht zufriedenstellend ist. Die Streuung dürfte nicht nur durch die Injektion sondern auch durch die Detektion und Effekte innerhalb der Kapillare verursacht werden. Streuungen aufgrund des Spektrometers und der Integration beeinflussen das Ergebnis wegen der kleinen Peakflächen. Die Entstehung der Joule'schen Wärme während der Trennung führt zur Veränderung der Temperatur

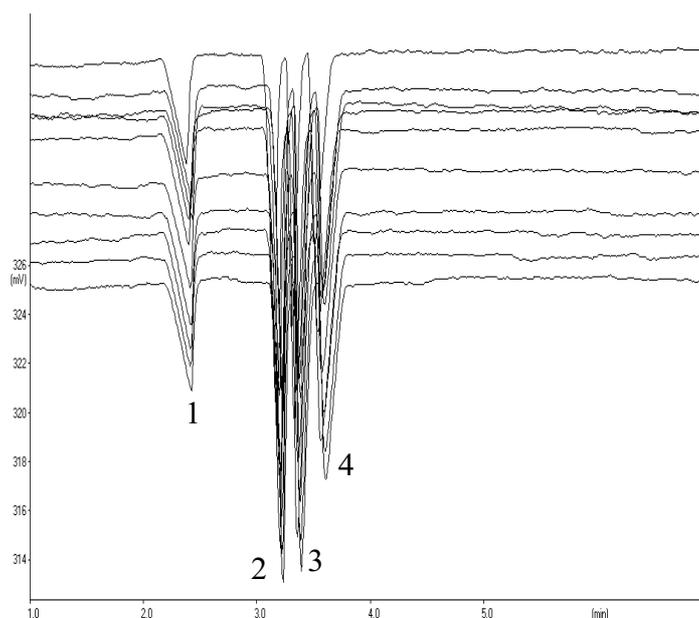


Abb. 68: Overlaygraphik von 10 Elektropherogrammen einer Messreihe zur Kationenbestimmung mit indirekt photometrischer Detektion.

Trennbedingungen: Kapillare: $75 \mu\text{m} \times 340/490 \text{ mm}$; U: 20 kV; Elektrolyt: Imidazol, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4,1; Injektion: piezoelektrisches Positioniersystem P290.00 in Verbindung mit $250 \mu\text{L}$ -Spritze, V_{inj} : 30 nL; Detektion: 207 nm; Probe: 1: 20 ppm K^+ , 2: 10 ppm Na^+ , 3: 10 ppm Ca^{2+} und 4: 5 ppm Mg^{2+} .

und der von ihr abhängigen Parameter. So ist beispielsweise die Viskosität der Elektrolytlösung temperaturabhängig (ca. $2 \text{ \%}\cdot\text{C}^{-1}$). Radiale Temperaturunterschiede bedingen Viskositätsgradienten, die zu Peakverbreiterungen führen [74]. Das Injektionsvolumen ist ebenfalls von der Viskosität der Elektrolytlösung abhängig [117].

Es kann allerdings davon ausgegangen werden, dass diese Fehler in Relation zu dem durch das Injektionssystem verursachten Fehler eine untergeordnete Rolle spielen. Der auftretende Fehler liegt im Bereich der bei den Durchzugsversuchen in Kapitel 3.2.4.1. gefundenen Werte, so dass der piezoelektrische Makro-Translator (P-290.00) für den Einsatz als Injektions- und Flusssteuerungsaktor nur als bedingt geeignet erscheint.

Der für die durchgeführten Untersuchungen modifizierte HPLC-Lichtabsorptions-Detektor (UVIDEC-100-II, Firma Jasco, Tokyo) liefert bei der Detektionswellenlänge von 207 nm nur eine äußerst geringe Empfindlichkeit. Dies kommt vermutlich aufgrund einer geringen Lampenintensität bei dieser Wellenlänge zustande. Die resultierenden Peakflächen sind relativ klein und bedingen daher einen durch die Integration verursachten Fehler. Es wird daher versucht einen Elektrolyten zu finden, der bei höherer Wellenlänge gemessen werden kann. Die Wahl fällt auf 4-Aminopyridin, das bei 262 nm

Tab. 25: Variationskoeffizienten der korrigierten Peakflächen für eine Kationenbestimmung mit piezoelektrischem Injektionssystem.

Kation	β [mg·L ⁻¹]	VK [%]
K ⁺	20	5,1
Na ⁺	10	5,2
Ca ²⁺	10	5,2
Mg ²⁺	5,0	5,2

Exp. Bedingungen wie Abbildung 68.

vermessen wird. Als optimale Konzentration werden 6 mmol·L⁻¹ ermittelt. Als Analyten dienen 100 ppm K⁺, 50 ppm Na⁺ und 10 ppm Li⁺. Bei einer Trennungsspannung von 25 kV ergeben sich Ströme von ca. 10 μ A. Es zeigt sich, dass dadurch die Reproduzierbarkeit des Makro-Translators (P-290.00) nicht entscheidend verbessert werden kann, was o.a. Ausführungen bezüglich der eingeschränkten Eignung als Aktor im Positioniersystem untermauert.

Bei der Charakterisierung der Stellglieder erweist sich der motorgetriebene Linearaktor (M-227.50) in Verbindung mit einer 100 μ L-Spritze als optimal (Kap. 3.2.4.3.). Es soll untersucht werden, inwieweit sich diese Ergebnisse auf die elektrophoretische Trennung von Kationen mit dem genannten System als Injektor übertragen lassen. Bei einem Injektionsvolumen von 30 nL ergeben sich die in Tabelle 26 dargestellten Variationskoeffizienten für die Migrationszeiten, Peakflächen und Peakhöhen (n = 8). Abbildung 69 zeigt exemplarisch ein Elektropherogramm dieser Messreihe.

Tab. 26: Variationskoeffizienten der Migrationszeiten, Peakflächen und Peakhöhen einer Kationenbestimmung mit motorgetriebenem Injektionssystem.

Kation	VK [%]		
	t_M	A	H
K ⁺	0,98	1,67	1,21
Na ⁺	0,54	1,01	0,88
Li ⁺	0,56	1,35	1,23

Exp. Bedingungen wie Abbildung 69, t_M : Migrationszeit, A: Peakfläche, H: Peakhöhe.

Die Ergebnisse sind überzeugend. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten liegt deutlich unter 1 %. Sowohl die Variationskoeffizienten der Peakflächen als auch -höhen sind mit Werten von 1,01 bis 1,67 % (Peakflächen) bzw. 0,88 bis 1,23 % (Peakhöhen) den in kommerziell erhältlichen Kapillarelektrophoresesystemen eingesetzten Injektions-

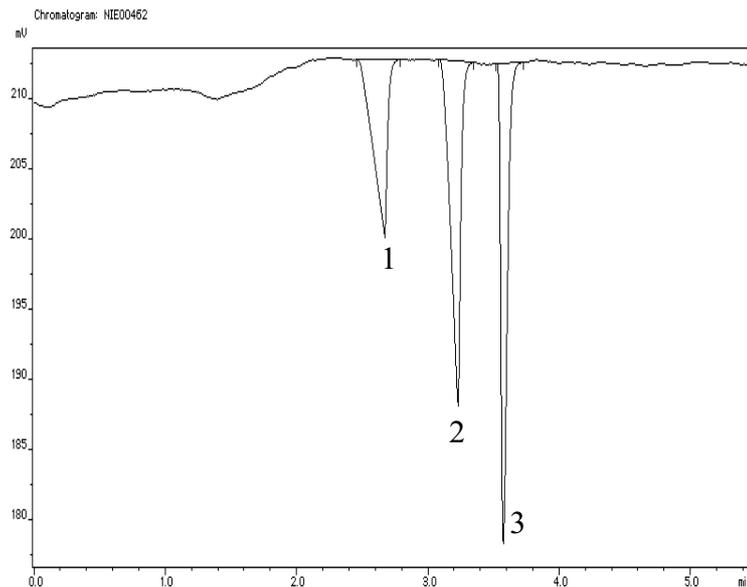


Abb. 69: Elektropherogramm einer Kationenbestimmung mit indirekt photometrischer Detektion.

Trennbedingungen: Kapillare: $75 \mu\text{m} \times 500/750 \text{ mm}$; U: 25 kV; Elektrolyt: 4-Aminopyridin, $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 3,9; Injektion: motorgetriebenes Positioniersystem (M227.50) in Verbindung mit $100 \mu\text{L}$ -Spritze, V_{inj} : 30 nL; Detektion: 262 nm; Probe: 1: 100 ppm K^+ , 2: 50 ppm Na^+ , 3: 10 ppm Li^+ .

varianten ebenbürtig und übertreffen diese sogar teilweise. Das entwickelte System stellt somit seine Leistungsfähigkeit unter Beweis.

Um die Einschränkungen des UV-Detektors hinsichtlich der Empfindlichkeit und aufwendigen Elektrolytfindung zu umgehen, wird ein Leitfähigkeitsdetektor in das System integriert. Da Leitfähigkeitsmessungen im Grunde sehr kostengünstig zu realisieren sind, wird der Detektor in Verbindung mit der Spritzenpumpenmechanik quasi als „low cost“-System betrieben. Die Vorteile werden exemplarisch an einer Anionentrennung verdeutlicht (Abb. 70). Die hohe Nachweisempfindlichkeit wird angesichts der resultierenden Signale bei Massenkonzentrationen kleiner/gleich 4 ppm deutlich.

Mit Variationskoeffizienten von deutlich über 10 % für die Peakflächen erweist sich jedoch die Spritzenpumpenmechanik als zu fehleranfällig. Sinnvolle Einsatzgebiete wären u.U. Analysentechniken mit „wide bore“-Kapillaren, wie beispielsweise die Isotachophorese, bei denen die Injektionsvolumina deutlich höher liegen.

Obwohl der Leitfähigkeits- dem UV-Detektor im Hinblick auf die Empfindlichkeit deutlich überlegen ist, gestaltet sich die Integration des Positioniersystems sehr schwierig. Der verwendete Leitfähigkeitsdetektor Crystal 1000, ThermoQuest, Egelsbach, ist ein sog. end-capillary-Detektor, so dass folglich eine direkte Verbindung der Kapillare mit

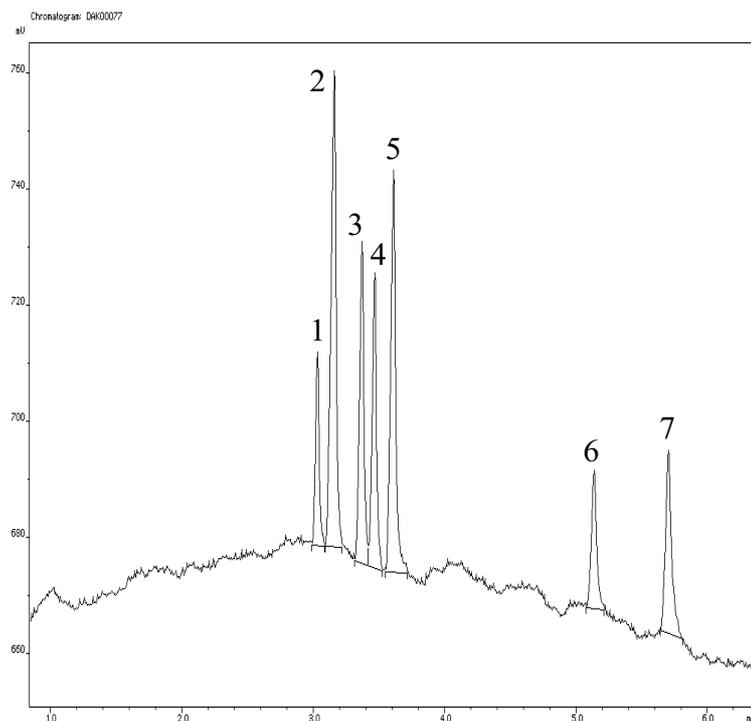


Abb. 70: Elektropherogramm einer Anionenbestimmung mit konduktometrischer Detektion.

Trennbedingungen: Kapillare: $50\ \mu\text{m} \times 500\ \text{mm}$; U: $-30\ \text{kV}$; Elektrolyt: CHES (2-[N-Cyclohexylamino]ethansulfonsäure), $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, LiOH, $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Trion X-100, 0,03 %, pH 9,2; Injektion: Spritzenpumpenmechanik in Verbindung mit $100\ \mu\text{L}$ -Spritze, V_{inj} : ca. $10\ \text{nL}$; Probe: 1: $4\ \text{ppm}\ \text{Br}^-$, 2: $2\ \text{ppm}\ \text{Cl}^-$, 3: $4\ \text{ppm}\ \text{NO}_2^-$, 4: $4\ \text{ppm}\ \text{NO}_3^-$, 5: $4\ \text{ppm}\ \text{SO}_4^{2-}$, 6: $1\ \text{ppm}\ \text{F}^-$, 7: $4\ \text{ppm}\ \text{PO}_4^{3-}$.

dem Positioniersystem nicht möglich ist. Die Leifähigkeitszelle des Crystal 1000 sitzt in einem Detektor-Zellblock, in den über eine Kunststoffkapillare die Kopplung erfolgen muss. Die zweiteilige Detektionszelle wird in dem Block verschraubt und ist über O-Ringe abgedichtet, welche einen Teil der Aktor-Bewegung aufnehmen. Die sich durch die Kunststoffkapillare und O-Ringe ergebende Flexibilität wirkt sich negativ auf die Übertragung des (Unter-)Drucks auf die Kapillare sowie aufgrund der Fehleranfälligkeit auf die Reproduzierbarkeit aus.

3.2.5.3. Simultanbestimmung von Kationen und Anionen

Die Simultanbestimmung von Kationen und Anionen bisheriger Methoden beschränkt sich meist auf eine Kombination von langsamen, negativ geladenen Ionen und schnellen positiven Ladungsträgern oder umgekehrt. Die gleichzeitige Bestimmung schneller Ionen wird mittels zusätzlicher Komponenten wie eine zweite Kapillare oder die Injek-

tion an beiden Enden der Trennsäule erreicht (Kap. 2.3.6., S. 41). Mit der entwickelten Injektionsmethode ist es möglich auch die schnellsten Anionen und Kationen in nur einem Lauf, mit nur einem Detektor sowie nur einer Kapillare zu trennen. Grundlage ist die Möglichkeit, die aufgegebene Probe beliebig innerhalb der Kapillare zu positionieren und die Probenzonen nach der Trennung durch den Detektor zu ziehen.

Die Polarität der Hochspannung kann aufgrund des neuartigen Prinzips beliebig gewählt werden. Da durch das Ziehen durch den Detektor eine im Vergleich zur elektrophoretischen Trennung große Bandenverbreiterung auftritt, bietet sich die Wahl der Polarität anhand der schwieriger zu trennenden Ionenart an, welche in Detektorrichtung migrieren sollte. Durch das Auftreten des elektroosmotischen Flusses erweist sich vielfach eine positive Polarität (d.h. kathodenseitige Detektion) als günstiger, da sich die effektive Trennstrecke der Anionen verlängert und im Falle der kathodenseitigen Probenaufgabe die schnellsten Kationen leicht aus der Kapillare migrieren.

Zunächst kommt wiederum der piezoelektrische Makro-Translator (P-290.00) in Verbindung mit einer 250 μL -Spritze als Beispiel für ein piezoelektrisches Positioniersystem zum Einsatz. Petr Kuban und Bo Karlberg bestimmen schnelle Anionen und Kationen mit einer Kapillare und einem Detektor durch beidseitige Aufgabe der Probe [83]. Ausgehend von ihren Angaben über den Hintergrundelektrolyten findet in diesem Fall eine Lösung aus 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4-Aminopyridin und 2,7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2CrO_4 Anwendung. Der pH-Wert beträgt 8,3; die Detektion wird bei einer Wellenlänge von 262 nm durchgeführt.

30 nL Probenlösung werden 134 mm in die Kapillare bewegt und 2 min bei 20 kV getrennt. Anschließend wird der Inhalt der Trennkapillare durch den Detektor gezogen. Kaliumhydrogencarbonat, Natriumhydrogenphosphat und Lithiumchlorid können somit innerhalb von 6 Minuten getrennt und detektiert werden. In Abbildung 71 ist das entsprechende Elektropherogramm dargestellt.

Die Kationen wandern bereits bei der elektrophoretischen Trennung durch den Detektor. Die neutralen Komponenten und die Anionen werden mittels Positioniersystem durch das Detektorfenster befördert. Das Chlorid weist bei diesem Trennsystem einen Doppelpeak auf, der vermutlich durch eine Verunreinigung hervorgerufen wird. Die Symmetrie der Peaks deutet auf einen geeigneten Hintergrundelektrolyten hin. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass die Anionen im Verhältnis zu den Kationen relativ kleine Signale ergeben.

Der motorgetriebene Linearaktor (M-227.50) in Verbindung mit einer 100 μL -Spritze soll hinsichtlich der Positioniergenauigkeit innerhalb der Kapillare untersucht werden. Als Elektrolyt kommt ein Gemisch aus 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4-Aminopyridin und 8,2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Essigsäure zum Einsatz. Der pH-Wert beträgt 4,75. Als Probe werden K^+ (100 ppm), Na^+ (50 ppm), Li^+ (10 ppm), NO_3^- (89 ppm) und Cl^- (77 ppm) verwendet. Der Elektrolyt weist mit 4-Aminopyridin nur einen positiv geladenen Chromophor auf. Das Verhalten

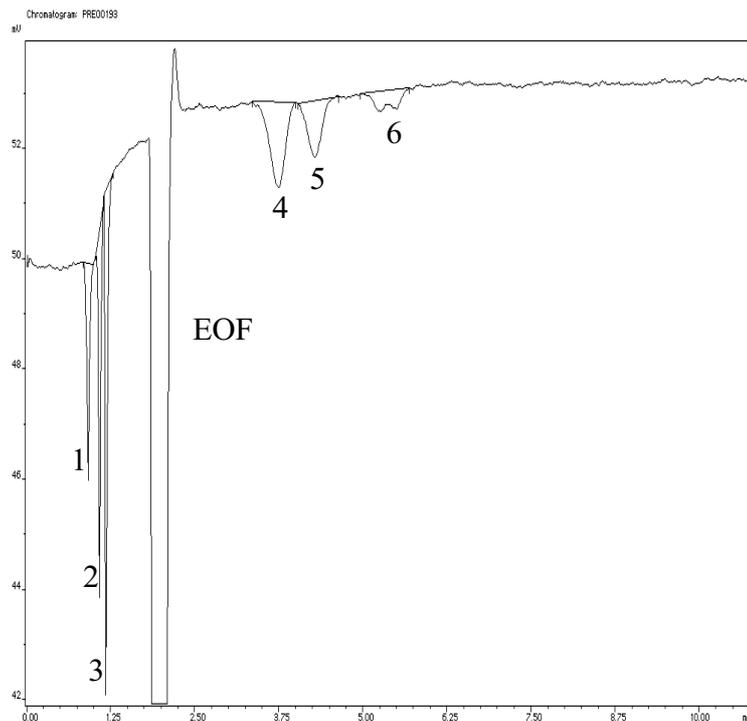


Abb. 71: Simultanbestimmung von Kationen und Anionen mit indirekter UV-Detektion. Trennbedingungen: Kapillare: 75 $\mu\text{m} \times 340/490$ mm; U: 20 kV, t_U : 120 s; Elektrolyt: 4-Aminopyridin, 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ und H_2CrO_4 , 2,7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH: 8,3; Injektion: piezoelektrisches Positioniersystem (P-290.00) in Verbindung mit 250 μL -Spritze, V_{inj} : 30 nL, Probenpositionierung: 134 mm; Detektion: 262 nm; Probe: 1: K^+ (10 ppm), 2: Na^+ (4,8 ppm), 3: Li^+ (10 ppm), 4: HCO_3^- (16 ppm), 5: HPO_4^{2-} (10 ppm) und 6: Cl^- (51 ppm).

der anionischen Probenbestandteile wird in diesem Fall von der Mobilität der anionischen Puffersubstanz bestimmt (Kap. 2.3.5.3., S. 39). Da die Mobilität der Essigsäure geringer ist, als die des Nitrats und Chlorids, weisen diese einen positiven Peak auf (Abb. 72). In Tabelle 27 sind die Variationskoeffizienten der Migrationszeiten, sowie exemplarisch für das Kaliumion der Peakfläche, einer Achtfachbestimmung aufgeführt.

Die Migrationszeiten, auch der durch den Detektor gezogenen Substanzen, sind mit Werten um die 1 % hinreichend reproduzierbar. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass das Positioniersystem den Probenplug positionsgenau an die immer gleiche Stelle innerhalb der Kapillare bewegen kann. Die Anforderungen hinsichtlich der Identifizierbarkeit einer Substanz anhand der Migrationszeit im Vergleich zu einem Standard sind dadurch erfüllbar. Ein interner Standard muss nicht zwingend verwendet werden.

Die Bandenverbreiterung durch den durch das Ziehen verursachten hydrodynamischen Fluss ist an den Peaks des Nitrats und des Chlorids deutlich sichtbar (Abb. 72). Wie in Kapitel 3.2.4.3. gezeigt werden kann, nimmt diese stark mit der Durchzugsgeschwindigkeit

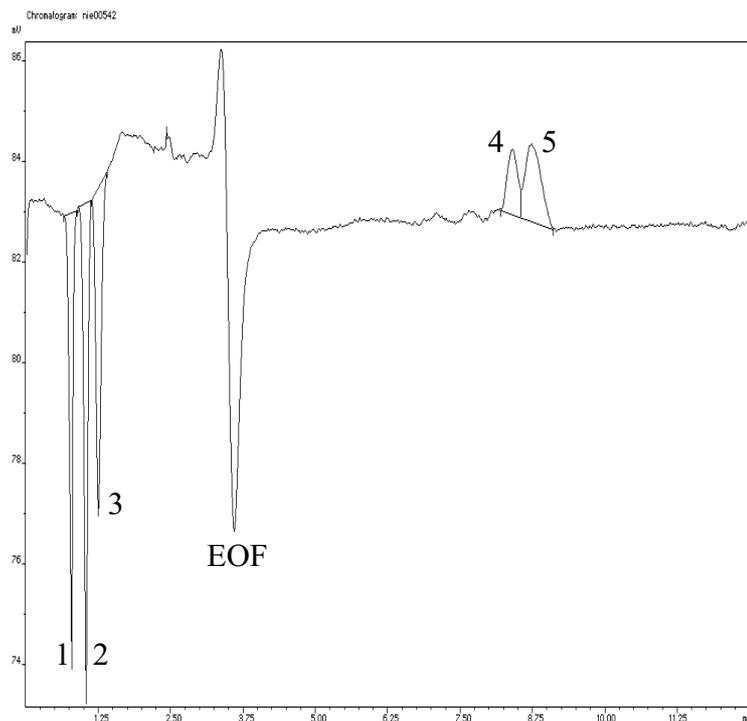


Abb. 72: Simultanbestimmung von Kationen und Anionen mit indirekter UV-Detektion. Trennbedingungen: Kapillare: $75 \mu\text{m} \times 500/750 \text{ mm}$; U : 25 kV, t_U : 140 s; Elektrolyt: 4-Aminopyridin, $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Essigsäure, $8,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH: 4,75; Injektion: motorgetriebenes Positioniersystem (M-227.50) in Verbindung mit $100 \mu\text{L}$ -Spritze, V_{inj} : 10 nL, Probenpositionierung: 375 mm; Detektion: 262 nm; Proben: 1: K^+ (100 ppm), 2: Na^+ (50 ppm), 3: Li^+ (10 ppm), 4: NO_3^- (89 ppm) und 5: Cl^- (77 ppm).

keit zu. Es muss folglich ein Kompromiss zwischen Auflösung und Analysendauer eingegangen werden. Bei einer Durchzugsgeschwindigkeit von $8,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ vermischen sich die getrennten Probenzonen des Nitrats und Chlorids wieder vollständig, so dass nur ein Peak resultiert. Das in Abbildung 72 erhaltene Elektropherogramm wird mit einer Positioniergeschwindigkeit von $1,3 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ erzielt. Die Positionierung muss für das jeweilige Trennproblem optimiert werden.

Das Auffinden eines geeigneten Hintergrundelektrolyten für die Simultanentrennung von Kationen und Anionen mit indirekter UV-Detektion gestaltet sich in der Regel sehr schwierig. Einen Ausweg bietet hier die konduktometrische Detektion.

Da eine Simultanentrennung mit Leitfähigkeitsdetektion in der Literatur nach bester Kenntnis nicht beschrieben ist, werden unterschiedliche Pufferzusammensetzungen für die Leitfähigkeitsdetektion auf ihre Trenneigenschaften bezüglich Kationen und Anionen überprüft. Aus Tabelle 28 wird deutlich, dass sich ein Elektrolyt aus $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES (2-Morpholinoethansulfonsäure) und $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Histidin sowohl für die Anionen- als auch

Tab. 27: Variationskoeffizienten der Migrationszeiten (VK_{t_M}) und Peakflächen (VK_A) einer Simultanbestimmung mit indirekter UV-Detektion und motorgetriebenem Positioniersystem.

VK_A [%]	VK_{t_M} [%]					
	K^+	Na^+	Li^+	EOF	NO_3^-	Cl^-
2,0	1,1	1,1	1,2	1,5	0,60	0,71

Exp. Bedingungen wie Abbildung 72.

Kationentrennung eignet. Seine Eignung für die Simultanrennung wird aus Abbildung 73 deutlich.

Tab. 28: Untersuchung unterschiedlicher Elektrolytzusammensetzungen zur simultanen Trennung von An- und Kationen mit Leitfähigkeitsdetektion.

Elektrolytzusammensetzung	pH-Wert	Kationentrennung	Anionentrennung
30 mmol·L ⁻¹ MES, 30 mmol·L ⁻¹ Histidin	6,1	++	+
25 mmol·L ⁻¹ MOPSO, 15 mmol·L ⁻¹ Arginin	7,0	+	+
25 mmol·L ⁻¹ TAPSO, 16 mmol·L ⁻¹ Arginin	8,0	+ -	++
50 mmol·L ⁻¹ CHES, 30 mmol·L ⁻¹ Arginin	9,0	-	++

++: sehr gut, + gut, + -: mittel, -: schlecht.

MES: 2-Morpholinoethansulfonsäure, MOPSO: 3-Morpholino-2-hydroxypropansulfonsäure, TAPSO: N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-3-amino-2-hydroxypropansulfonsäure, CHES: 2-[N-Cyclohexylamino]ethansulfonsäure.

Es gelingt die Ionen K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , NO_3^- und Cl^- simultan innerhalb von 10 Minuten zu trennen. Die neuartige Methode stellt damit ihre Leistungsfähigkeit unter Beweis und zeigt neue Möglichkeiten in der Ionenanalytik auf.

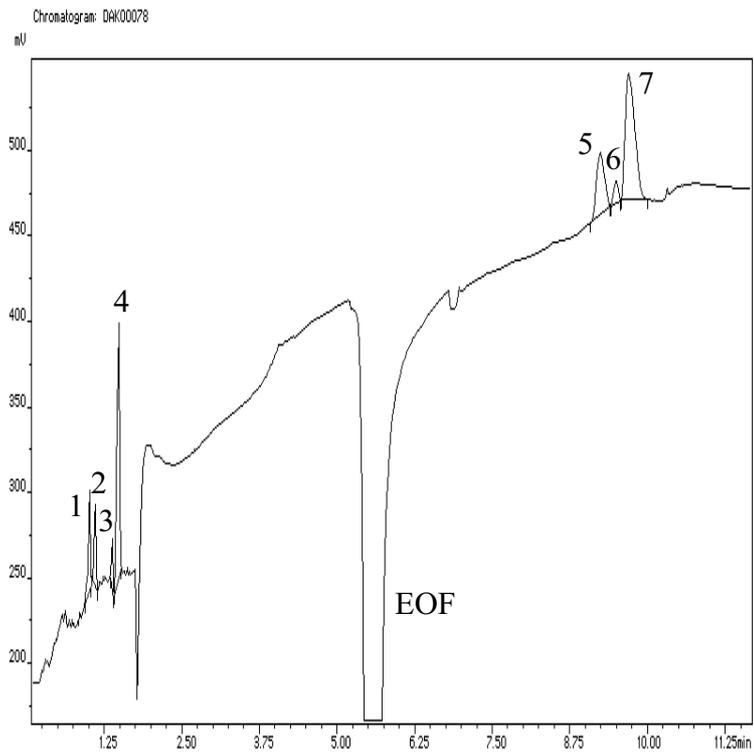


Abb. 73: Simultanbestimmung von Kationen und Anionen mit Leitfähigkeitsdetektion. Trennbedingungen: Kapillare: $50 \mu\text{m} \times 500 \text{ mm}$; U : 30 kV, t_U : 105 s; Elektrolyt: MES (Morpholinoethansulfonsäure), $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Histidin, $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6,1; Injektion: Spritzenpumpenmechanik in Verbindung mit $100 \mu\text{L}$ -Spritze, V_{inj} : ca. 10 nL; Probe: 1: Rb^+ (interner Standard), 2: K^+ (0,6 ppm), 3: Na^+ (3,0 ppm), 4: Mg^{2+} (12 ppm), 5: SO_4^{2-} (24 ppm), 6: NO_3^- (8,0 ppm) und 7: Cl^- (34 ppm).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Titrationstechnik

Die Vorgabe, ein neuartiges on-line-Titrationssystem auf der Basis eines einfachen 3-Wege-Ventils zu entwickeln, kann erfolgreich erfüllt werden. Teure und technisch sehr aufwendige Dosiereinrichtungen werden dadurch überflüssig; eine kompakte Bauweise lässt sich leicht verwirklichen. Die Entwicklung erstreckt sich dabei sowohl auf Systeme mit potentiometrischer als auch konduktometrischer und photometrischer Detektion. Eine Kopplung der Detektionsarten ist bei Bedarf möglich.

Bei der Anwendung der potentiometrischen Titration können Auswertemethoden nach Gran problemlos eingesetzt werden. Die lineare Approximation der nach Gran ausgewerteten Messdaten ergibt Abweichungen von den theoretisch erwarteten Werten im Prozentbereich. Der Variationskoeffizient von nur 1,1 % spricht jedoch für die grundsätzliche Eignung der Methode. Die lineare Annäherung wird dennoch nicht weiter verfolgt, da mit der ebenfalls von Gran vorgegebenen Methode der Approximation über ein Orthogonalpolynom 2. Ordnung deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden können. Die Approximation der nach Gran ausgewerteten Messwerte mit dem Orthogonalpolynom 2. Ordnung ergibt Abweichungen von den theoretischen Werten von nur noch maximal 0,1 %. Die ermittelten Variationskoeffizienten liegen durchwegs unter 1,0 %. Für die Auswertung nach Gran sind nur 4 oder 5 Messwerte nötig. Dadurch kann bereits im einfachen Laboraufbau die Analysendauer deutlich unter 10 Minuten für eine Analyse gesenkt werden.

Weitere Versuche zeigen, dass mit ausreichend kleiner Schaltzeit und Rasterung sowie geeigneter Zeit-Programm-Steuerung Titrationskurven entstehen, die denen der klassischen Autotitratoren ähneln. Die Problematik diskontinuierlich gebildeter Mischungen in Kapillaren lässt sich besonders effektiv durch Mischkammern im μL -Bereich lösen. Dadurch werden letztendlich Strömungsprofile erzeugt, die denen von homogenen Mischungen weitgehend entsprechen. Die sog. Secondary-Flow-Effekte lassen sich in einem Serpentina-Reaktor so steuern, dass auf zusätzliche Dämpfungsglieder verzichtet werden kann.

Dennoch wird mit der entwickelten Mikro-Mischkammer bevorzugt gearbeitet, da diese universeller einsetzbar und zur effizienten Durchmischung der als Plug injizierten Volumenelemente letztendlich vorteilhafter ist. Die Vermischungseffekte durch Kapillaren ermöglichen alleine noch keine auswertbare Titration, da deren Länge aufgrund des zunehmenden Druckverlustes nicht beliebig gesteigert werden kann. Eine Mischkammer sollte ein zur Vermischung der injizierten Plugs erforderliches Mindestvolumen nicht überschreiten, da mit Zunahme des Mischkammervolumens das Messsignal langsamer zur Basislinie zurückkehrt und somit die maximal erreichbare Messfrequenz vermindert

wird. Eine auf die Geometrie des Gesamtsystems abgestimmte, gerührte Mischkammer von 400 μL erfüllt die gestellten Anforderungen.

Bei der Titration carbonathaltiger Proben kann es zur Bildung störender Gasblasen (vorwiegend CO_2) kommen. Diese können im einfachsten Falle durch den Einbau einer Blasenfalle (kontinuierlich oder diskontinuierlich) aus dem System abgezogen werden. Die Entstehung der Blasen könnte auch durch Anlegen eines Gegendrucks (ca. 2 bar) bereits im Vorfeld verhindert werden. Im Rahmen dieser Dissertation wird diese Lösung sowohl aus technischen Gründen als auch aufgrund der Vorgabe, ein möglichst preisgünstiges System zu entwickeln, nicht realisiert.

Als Fördereinrichtung erweist sich eine Schlauchpumpe als sehr gut geeignet. Die alternativ geprüften Pumpen sind weniger aufgrund ihrer Bauart, als vielmehr durch die Größe der Pumpenköpfe problematisch. Im Fall einer Flügelzellenpumpe und Zahnradpumpe kann gezeigt werden, dass eine Eignung grundsätzlich gegeben ist. Pumpen dieser Bauart mit den für das System geforderten geringen Volumenströmen sind zwar v.a. im Fall der Zahnradpumpe erhältlich, würden jedoch die Gesamtkosten erhöhen. Die besonders geeigneten Flügelzellenpumpen mit ihrem konstanten Förderstrom sind nach eingehender Recherche derzeit nicht in der passenden Größe erhältlich. Die verwendete Schlauchpumpe ist trotz des benötigten Getriebes und damit technisch anspruchsvolleren Aufbaus eine gute Lösung, da sie die hohen Anforderungen an die Konstanz des Förderstromes und der Korrosionsbeständigkeit erfüllen kann.

Für die Wahl der Systemparameter wird ein Kompromiss zwischen der Genauigkeit der Messwerte, dem Reagenzienverbrauch und der Analysendauer gefunden. Als optimaler Parameter des selbst entwickelten Steuerungsprogramms hat sich bei einer Stufenanzahl von 100 eine Stufendauer von 3 Sekunden herausgestellt. Eine Anzahl von 100 (Volumenverhältnis-)Stufen ermöglicht im Experiment eine ausreichend feine Rasterung des zu betrachtenden Titrationsbereichs. Der durch die Diskretisierung des Volumenverhältnissbereichs entstehende maximale systematische Fehler des Steuerungsprogramms wird so auf unter 1 % reduziert. Eine lineare Interpolation zwischen den aufeinanderfolgenden Stufen führt zu einer Minimierung des Diskretisierungsfehlers.

Die Stufendauer von 3 Sekunden sollte bei 100 Stufen nicht weiter verkürzt werden, da das Steuerungsprogramm und die Mechanik des Magnetventils die unterschiedlichen Schaltzeiten von Titrant und Probe aufeinanderfolgender Stufen nicht mehr auflösen können. Um durch das Steuerungsprogramm verursachte Ungenauigkeiten zu minimieren, wird der von Visual-Basic standardmäßig zur Verfügung gestellte Timer (55 ms-Taktung unter Windows 9x) durch einen speziell für hohe Zeitauflösung programmierten Timer (ca. 10 ms-Taktung) ersetzt. Der neue Timer führt zu deutlich genaueren Ergebnissen und erhöhter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Der Volumenstrom wird sowohl hinsichtlich des Reagenzienverbrauchs als auch der Auswertbarkeit der Titrationskurve und ggf. deren erster Ableitung optimiert. Ein ausreichend scharfer Umschlagspunkt wird ab einem Volumenstrom von $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ erreicht. Eine weitere Zunahme würde nur den Reagenzienverbrauch unnötig steigern und ein erhöhtes Mischkammervolumen erfordern, da bei gleichen Schaltzeiten die Länge der zu vermischenden injizierten Plugs zunimmt.

Das entwickelte Titrationssystem eignet sich für Säure-Base-Titrationen im on-line-Betrieb. Am Beispiel der Titration einer starken Base (NaOH), einer schwachen Base (NaHCO_3) und einer mehrprotonigen Säure (H_3PO_4) wird die Vergleichbarkeit des neuen Systems mit einem kommerziellen Autotitrator demonstriert. Abweichungen von den theoretischen Werten liegen bei nur ca. 0,2 % bei Variationskoeffizienten von durchwegs deutlich unter 1 %.

Die neue Methode kann auf die Bestimmung der Säurekapazität nach DIN 38409-7 übertragen werden. Diese beruht auf einer volumetrischen Bestimmung des Kohlensäure-Gleichgewichts. Mit bekannten Methoden kann dieses Säure-Base-System aufgrund der äußerst ungünstigen pK_S -Werte nur ungenau erfasst werden. Abbildung 74 zeigt den typischen Titrationsverlauf einer Realprobe (Pegnitzwasser). Der Variationskoeffizient der mit der neuen Methode schnell und einfach durchführbaren on-line-Titration liegt bei nur ca. 0,6 % und übertrifft somit die nach DIN-Vorschrift gestellten Anforderungen.

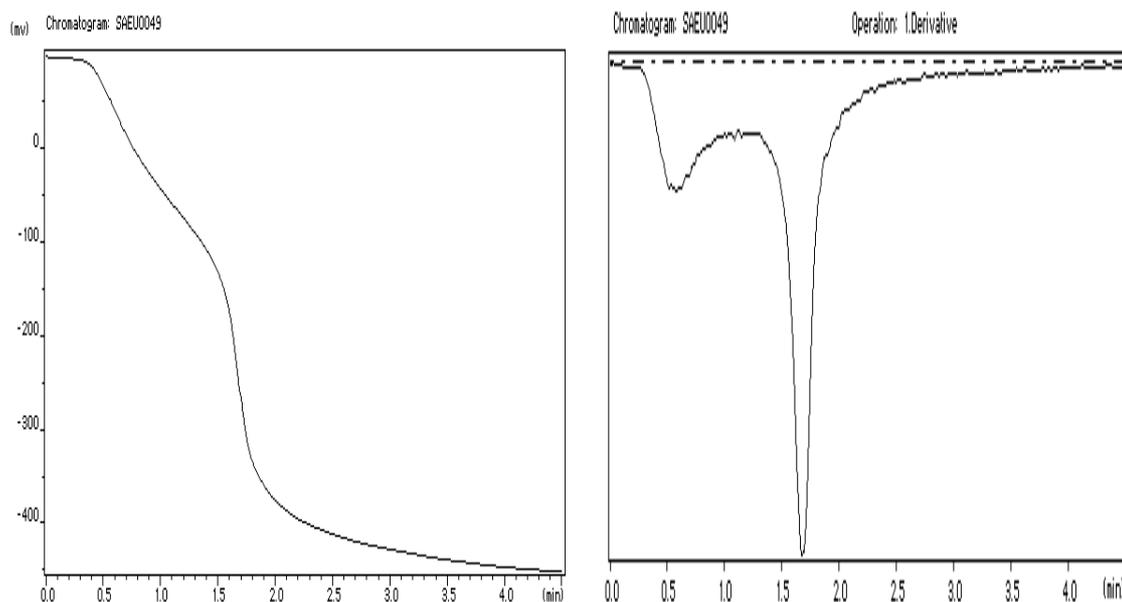


Abb. 74: Titrationskurve und erste Ableitung einer Pegnitzwasserprobe (20.08.2000) zur Bestimmung der Säurekapazität ($K_{\text{S}4,3}$).

Titrant: HCl ($0,0100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); \dot{V} : $1,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Stufenanzahl: 100; Schleifenzahl: 1; Schleifendauer: 3 s; Volumenverhältnis Titrant/Probe von 0 bis 2.

Die Bestimmung der Wasserhärte nach DIN 38409-6, einer komplexometrischen Titration von Calcium- und Magnesium-Ionen mittels des Dinatriumsalzes der Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Titrationsmittel und Eriochromschwarz T als Indikator, kann ebenso erfolgreich auf das neuartige Titrationssystem übertragen werden. Durch den modularen Aufbau kann die hierzu erforderliche Reagenzienzugabe einfach realisiert werden. Die Untersuchung einer Mineralwasserprobe unterstreicht mit den dabei erzielten Ergebnissen die Leistungsfähigkeit der neuen Bestimmungsmethode.

Das neue on-line-Titrationssystem ermöglicht bereits im Laboraufbau mindestens 5 Messungen pro Stunde bei einer Analysendauer von unter 5 Minuten. In der Routineüberwachung bei annähernd bekanntem Äquivalenzpunkt sind deutlich mehr Bestimmungen möglich, da durch das neuartige Prinzip bei einem beliebigen Titrationsgrad gestartet werden kann. Längere Wartezeiten für die MesswertEinstellung entfallen weitgehend im Vergleich zu klassischen Methoden.

Um aufzuzeigen, welchen breiten Anwendungsbereich das neue Titrationssystem besitzt, werden Substanzen aus dem Bereich der Biochemie analysiert. Als Beispiel dienen die häufig anzutreffenden Aminosäuren. Um alle Umschlagspunkte erfassen zu können, müssen diese jedoch zum Teil vor der Analyse mit Säure bzw. Base auf die entsprechenden pH-Werte gebracht werden. Eine konduktometrische Detektion ist im Falle der Aminosäuren nicht anwendbar, da die Kurven nicht präzise auswertbar sind; die Potentiometrie führt jedoch zu sehr guten Ergebnissen. Die Titration von Aminosäuren liefert hinsichtlich ihrer Präzision und Reproduzierbarkeit überzeugende Resultate. Die Titration eines Proteins macht die Eignung des Autotitrators selbst für schwierige Analyten deutlich.

Das entwickelte System eignet sich für den Einsatz als stand-alone-System z.B. im Bereich der Gewässer- oder der Prozesswasserüberwachung. Es bietet einen vollwertigen Ersatz für kommerziell erhältliche Titrationssysteme bei deutlich reduzierten Betriebs- und Anschaffungskosten. Die mit dem neuen Titrationssystem durchgeführten on-line-Messungen führen selbst bei sog. Realproben zu den gleichen Ergebnissen wie sie bei der deutlich aufwendigeren und kostenintensiveren Titration nach DIN 38409-7 und DIN 38409-6 erhalten werden.

4.2. Flusssteuerung in der Kapillarelektrophorese

Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Aktoren weisen unterschiedliche Auflösungen im unteren Nanometerbereich auf, die im Fall der Piezoaktoren durch den D/A-Wandler limitiert werden. Daneben sind sie durch ihre maximale Stellwegänderung begrenzt. Zu jedem Aktor muss daher das passende Bauteil gewählt werden, welches die lineare Auslenkung in ein Volumen umsetzt. Die Kriterien hierfür sind eine Probenaufgabe im (Sub-)Nanoliter-, eine Auflösung im Picoliter- sowie eine maximale Volumenver-

drängung im mittleren Mikroliterbereich. Gasdichte Mikroliterspritzen haben sich dafür als geeignet herausgestellt. Spritzen mit Volumina kleiner/gleich 50 μL weisen durch ihren Stempel eine zu große Flexibilität auf und können nicht die gewünschten Ergebnisse liefern. Bei Bedarf wäre ein Führungssystem für diese Spritzen denkbar. Als optimal erweisen sich für den Makroblocktranslator P-290.00 eine 250 μL - und für den motorgetriebenen Aktor (M-227.50) eine 100 μL -Spritze. Der Scheibentranslator P-286.50 ist durch seinen geringen Stellbereich nur in Verbindung mit dem motorgetriebenen Linearaktor sinnvoll einsetzbar und wird ebenfalls mit einer 100 μL -Spritze betrieben.

Ein aus theoretischen Überlegungen erstelltes Anforderungsprofil bedingt eine zu realisierende Auflösung von 20 pL für 50- und 44 pL für 75 μm -Kapillaren. Sowohl mit dem motorgetriebenen Linearaktor (M-227.50) als auch mit dem Disk-Translator (P-286.50) lassen sich die Forderungen in Verbindung mit den o.a. Mikroliterspritzen sicher erfüllen. Die piezoelektrischen Aktoren werden von Hysterese, Nichtlinearität und einem Positionskriechen begleitet. Diese Ungenauigkeiten werden experimentell nachgewiesen und durch identische Versuchsbedingungen mit Hilfe einer vollständigen Automatisierung der Messungen eliminiert. Die Betätigung des Autosamplers und der Ventile, Wartezeiten nach bestimmten Vorgängen und die Auslenkung des Stellgliedes werden von einem PC mit einem selbst entwickelten Steuerprogramm, das einen vollautomatischen Betrieb des gesamten Systems gestattet, gesteuert.

Beim Ziehen von Flüssigkeit in die Kapillare wird ein Unterdruck im System erzeugt, der ein Entgasen der Flüssigkeit bewirken kann, so dass alle verwendeten Lösungen vor dem Gebrauch evakuiert werden. Zusätzlich wird der Inhalt der Spritze in regelmäßigen Abständen ausgetauscht. Ein flexibler Versuchsaufbau mittels Stativ ermöglicht ein problemloses Entleeren und Füllen der Spritze sowie den einfachen Wechsel der Aktoren. Das mechanische Umkehrspiel, das u.a. durch Verbindungselemente entsteht, wird durch eine Vorpositionierung in Einzugsrichtung über einen Stellwegbereich von mindestens 400 μm stets umgangen.

Das über die Abmessungen der Apparatur berechnete Volumen, welches pro μm Stellwegänderung injiziert bzw. aus der Kapillare gedrückt wird, wird mittels Durchbruchmessung in etwa bestätigt. Gleichzeitig wird die Nichtlinearität der Piezokeramiken aufgezeigt, da der erhaltene Wert eine geringe Abhängigkeit vom zugrundeliegenden Hubbereich aufweist. Eine unsynchrone Bewegung von Spritzenstempel und Flüssigkeit in der Kapillare wird v.a. bei großen Stellgeschwindigkeiten beobachtet. Es kann gezeigt werden, dass dies durch ein Verringern der Geschwindigkeit kurz vor der zu stellenden Position sowie durch entsprechende Wartezeiten kompensiert werden kann. Die absolut injizierte Probenmenge spielt für den geplanten Einsatz in Kapillarelektrophoresesystemen im Gegensatz zur Reproduzierbarkeit eine untergeordnete Rolle, solange das elektrophoretische Trennsystem nicht überlastet wird und die Breite der Banden akzeptabel ist.

Die optimale Einzugs­geschwindigkeit für die Probenaufgabe im Nanoliterbereich mittels Piezoaktor beträgt $0,15 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Messreihen für verschiedene Injektionsvolumina (4 – 200 nL) weisen eine offensichtlich zufällige Verteilung der Werte ohne jeglichen Trend auf.

Das Kriechen des piezoelektrischen Positioniersystems macht sich durch eine Abhängigkeit der injizierten Volumina von der vorangegangenen Wartezeit bemerkbar. Je größer der Zeitraum nach dem Überbrücken des mechanischen Spiels bis zur Probenaufgabe ist, desto weniger Substanz wird anschließend in die Kapillare bei gleicher Stellwegänderung gezogen. Das Kriechen besitzt stets die gleiche Richtung wie die letzte gesteuerte Positionsänderung und nimmt logarithmisch ab. Diese Schwäche der Piezo-Aktoren wird durch eine für alle Messungen konstante Wartezeit und eine vollständige Automatisierung der Messungen relativiert.

Bei optimierten Bedingungen werden Kalibrierkurven im unteren nL-Bereich erstellt. Die direkte Proportionalität zwischen erzeugter Peakfläche und Einzugsstellweg ist eindeutig. Zufällige Diffusion und andere Kapillareffekte, die sich durch positive y-Achsenabschnitte bemerkbar machen, werden untersucht und quantifiziert. Durch eine geeignete Prozessführung, die diese Effekte vermindert, und optimierte Versuchsbedingungen werden Reproduzierbarkeiten von etwa 5 % für den piezoelektrischen Makro-Translator (P-290.00) und ca. 2 % für den Disk-Translator (P-286.40) in Injektions- und Positionierungsexperimenten mit Volumina im unteren nL-Bereich erhalten.

Die Effekte der ubiquitären Injektion werden demonstriert. Große Wartezeiten im Probengefäß und hohe Probenkonzentrationen begünstigen die Diffusion von Analyten in die Kapillare und führen neben einem Blindwert zu einem zusätzlichen Fehler bei der Injektion durch die schwere Kontrollierbarkeit dieser Effekte. Durch kurze Verweilzeiten im Probengefäß und eine schnelle Injektion wird die ubiquitäre Injektion bestmöglichst vermindert.

Der motorgetriebene Linearaktor (M-227.50) ist durch seine hohe Auflösung bei großem maximalen Stellbereich, seine Robustheit, seine einfache Bedienung und seinen vergleichsweise niedrigen Preis optimal für den Einsatz im Positioniersystem geeignet. Von allen getesteten Aktoren weist er mit Werten von 0,60 % bis 1,9 % die beste Reproduzierbarkeit für eine Injektion und Positionierung von Volumina im Bereich von 5 bis 25 nL auf. Die lineare Abhängigkeit der Peakfläche vom Injektionsvolumen ist wie bei den piezoelektrischen Aktoren gegeben.

Die Zunahme der Bandenverbreiterung mit der Positioniergeschwindigkeit kann aufgezeigt werden und bedingt einen Kompromiss zwischen Auflösung und Analysendauer. Bei einer Geschwindigkeit von $8,0 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ bezogen auf die Kapillare ergibt sich sowohl eine akzeptable Bandenverbreiterung als auch Analysendauer für die Positionierungsexperimente ohne elektrophoretische Trennung. Beim Bewegen von elektrophoretisch

getrennten Zonen muss die Geschwindigkeit i.A. deutlich vermindert werden, um eine Zurückvermischung zu verhindern. Als optimale Injektionsgeschwindigkeit ergeben sich $1,7 \text{ nL}\cdot\text{s}^{-1}$. Ein Nachziehen des Injektionssystems nach der Vorpositionierung zur Überwindung des mechanischen Umkehrspiels wird wie bei den piezoelektrischen Aktoren beobachtet. Die Erklärung liegt vermutlich in flexiblen Bauteilen des Systems begründet, die konstruktionsbedingt notwendig sind. Ein negativer Effekt auf die Reproduzierbarkeit der Injektion wird widerlegt, ebenso spielt die Wartedauer vor der Injektion eine eher untergeordnete Rolle. Ein Verbleiben nach der Injektion im Probengefäß sollte allerdings unterbleiben, um Diffusion weitgehend zu vermeiden.

Als kostengünstige Alternative zu den o.a. Aktoren wird eine speziell angefertigte Spritzenpumpe untersucht. Die Vorgabe eines Stellwegs muss hierbei über eine Stellgeschwindigkeit und Stellzeit vorgenommen werden. Längere Stellzeiten erweisen sich hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Injektionsvolumina als vorteilhaft. Aus theoretischen und steuertechnischen Überlegungen wird eine Auflösung von ca. 1 nL ermittelt. Die aus den Geräteabmessungen berechneten Werte für die Positioniergeschwindigkeit und das Injektionsvolumen weichen jedoch deutlich von den experimentell ermittelten ab. Durch eine geeignete Steuerung lassen sich allerdings Injektionen im unteren Nanoliterbereich mit einer zufriedenstellenden Wiederholbarkeit von unter 3 % erreichen, was die grundsätzliche Einsetzbarkeit der Spritzenpumpe für „low cost“-Systeme zeigt.

Beim Aufbau des Kapillarelektrophoresesystems ist zu berücksichtigen, dass der Trennpuffer nicht durch metallische Kanäle läuft, da ansonsten der Stromfluss nicht aufrecht erhalten werden kann. Als geeignete Verbindungsteile erweisen sich T-Stücke aus PEEK und Ventile mit Teflonkanälen. Ein mit der Apparatur möglicher einseitig geschlossener Betrieb erweist sich aufgrund einer deutlich verschlechterten Trennleistung als nachteilig, weshalb die elektrophoretischen Trennungen beidseitig geöffnet durchgeführt werden.

Ein Substanzgemisch aus 20 ppm K^+ , 10 ppm Na^+ , 10 ppm Ca^{2+} und 5 ppm Mg^{2+} wird mittels piezoelektrischem Translator in die Kapillare injiziert, problemlos getrennt und mittels indirekter UV-Detektion bestimmt. Ein Probenaufgabevolumen von 30 nL erzielt eine gute Signalintensität bei ausreichender Auflösung. Die Variationskoeffizienten der korrigierten Peakflächen (Peakfläche / Migrationszeit) für die Systemkombination piezoelektrischer Makro-Translator P-290.00 – 100 μL -Spritze liegen im Bereich von 5 %, welche nicht zufriedenstellend sind und daher den Makro-Translator neben den theoretischen Überlegungen zum Auflösungsvermögen als nur bedingt geeignet erscheinen lassen.

Eine Imidazolösung, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, bei pH 4,1 und eine 4-Aminopyridinlösung, $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, bei pH 3,9 stellen geeignete Hintergrundelektrolyten für die Kationentrennung mit indirekter UV-Detektion dar.

Die bei den Positionierungsexperimenten mit dem motorgetriebenen Linearaktor (M-227.50) erhaltenen positiven Ergebnisse lassen sich bei den elektrophoretischen Tren-

nungen bestätigen. Sowohl die Reproduzierbarkeit der Peakflächen als auch der -höhen sind bei einem Injektionsvolumen von 30 nL mit Werten von 1,01 bis 1,67 % (Peakflächen) bzw. 0,88 bis 1,23 % (Peakhöhen) den in kommerziell erhältlichen Kapillarelektrophoresesystemen eingesetzten Injektionsvarianten ebenbürtig und übertreffen diese sogar teilweise. Das entwickelte System stellt somit seine Leistungsfähigkeit unter Beweis.

Der Fehler kommt zudem nicht nur durch die Probenaufgabe zustande, sondern wird auch durch die Detektion und Integration sowie durch Effekte innerhalb der Kapillare verursacht. Da konstruktionsbedingt weder die Kapillare noch die Elektrolytgefäße temperiert werden, beeinflussen mögliche Temperaturschwankungen ebenfalls das Ergebnis.

Die Leistungsfähigkeit der Leitfähigkeitsdetektion im Vergleich zur indirekten UV-Detektion wird anhand einer Anionenbestimmung aufgezeigt. Ein Substanzgemisch aus 4 ppm Bromid, 2 ppm Chlorid, 4 ppm Nitrit, 4 ppm Nitrat, 4 ppm Sulfat, 1 ppm Fluorid und 4 ppm Phosphat kann innerhalb von 6 Minuten bei hervorragender Empfindlichkeit getrennt werden. Als Elektrolyt kommt hierzu ein Gemisch aus 50 mmol·L⁻¹ CHES (2-[N-Cyclohexylamino]ethansulfonsäure), 20 mmol·L⁻¹ LiOH und 0,03 % Trion X-100 mit einem pH-Wert von 9,2 zum Einsatz. Der verwendete Leitfähigkeitsdetektor erschwert allerdings als end-capillary-Detektor die Kopplung des Positioniersystems, wodurch die Reproduzierbarkeit hinter den o.a. Ergebnissen zurückbleibt. Ebenso kann die Spritzenpumpenmechanik ihre Einsatzfähigkeit in Kapillarelektrophoresesystemen als Injektionsystem nicht bestätigen. Mit Streuungen der Peakflächen von über 10 % bleibt sie weit hinter den Erwartungen zurück. Sinnvolle Einsatzgebiete wären u.U. Analysetechniken mit „wide bore“-Kapillaren, wie beispielsweise die Isotachophorese, bei denen die Injektionsvolumina deutlich höher liegen.

Es gelingt nach der Injektion die Probe an jeden beliebigen Ort der Kapillare zu bewegen und nach der anschließenden Trennung das gesamte Trennvolumen innerhalb der Kapillare durch die Detektorzelle zu ziehen. Mit dieser neuentwickelten Methode ist es möglich auch die „kleinsten“ Anionen und Kationen in nur einem Lauf zu trennen. Als taugliche Elektrolyte werden zum einen eine Variante eingesetzt, die sowohl einen positiv geladenen als auch einen negativ geladenen Chromophor enthält. Daneben wird ein Elektrolyt für die Simultanbestimmung mit nur positiv geladenem Chromophor und einer nicht absorbierenden Puffersubstanz als Gegenion vorgestellt. Eine Lösung aus 6 mmol·L⁻¹ 4-Aminopyridin, 2,7 mmol·L⁻¹ H₂CrO₄ und einem pH-Wert von 8,8 erfüllt die erstgenannten Anforderungen. Sowohl die Kationen als auch die Anionen einer Mischung aus Kaliumhydrogencarbonat, Natriumhydrogenphosphat und Lithiumchlorid werden in ca. 5 Minuten getrennt und detektiert. 6 mmol·L⁻¹ 4-Aminopyridin und 8,2 mmol·L⁻¹ Essigsäure als Puffersubstanz ermöglichen bei einem pH-Wert von 4,75 die Trennung von K⁺, Na⁺, Li⁺, NO₃⁻ und Cl⁻. Die Migrationszeiten sind mit Varitationskoeffizienten um die 1 % hinreichend stabil, so dass von einer exakten Positionierung und leichten Identifizierbarkeit

über die Migrationszeit ohne den zwingenden Zusatz eines internen Standards ausgegangen werden kann.

Eine Untersuchung unterschiedlicher Pufferzusammensetzungen auf ihre Trenneigenschaften bezüglich Kationen und Anionen ergibt, dass sich ein Elektrolyt aus $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES (2-Morpholinoethansulfonsäure) und $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Histidin sowohl für die Anionen- als auch Kationentrennung mit konduktometrischer Detektion eignet. In einer daraufhin erstmals durchgeführten Simultantrennung mit Leitfähigkeitsdetektion gelingt es die Ionen K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , NO_3^- und Cl^- simultan innerhalb von 10 Minuten zu trennen. Die neuartige Methode stellt damit ihre Leistungsfähigkeit unter Beweis und zeigt neue Möglichkeiten in der Ionenanalytik auf.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation werden neuartige analytische Mikrotechniken für die Biochemie und die Umweltüberwachung beschrieben. Schwerpunkte sind die Entwicklung und Optimierung eines on-line-Titrationssystems mit neuartigem Titrationsprinzip sowie eines Nanoliter-Injektions- und Flusststeuerungssystems auf Basis hochauflösender Linearaktoren für die Kapillarelektrophorese. Die Systeme sind mittels PC, eigens entwickelten Steuerprogrammen und preisgünstigen Steuerkomponenten vollautomatisiert.

Das grundlegende Prinzip des entwickelten Titrationssystems unterscheidet sich wesentlich von der bisher üblichen Vorgehensweise. Erstmals wird der herkömmliche Bezug der Messsignale auf den – zu einer vorgelegten Probenmenge – zugegebenen Volumeneintrag durch die Zeit bzw. das Mischungsverhältnis ersetzt. Der technische Aufwand und die erforderlichen Arbeitsschritte werden im Vergleich zu kommerziellen Autotitratoren auf ein Minimum reduziert. Teure Dosiersysteme, wie zum Beispiel Motorkolbenbüretten oder Überlaufpipetten, werden durch ein einziges Fördersystem für Probe und Titrant, bestehend aus einer einfachen Mikrodosierpumpe und einem Flüssigkeits-Mikro-Ventil, ersetzt. Sehr preisgünstige Zahnrad- oder Flügelzellenpumpen aus PKW-Scheibenwischenanlagen sind ebenfalls grundsätzlich geeignet, wenn sie in der Lage sind die geringen Volumenströme von etwa $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ konstant zu fördern. Das herkömmliche Prinzip der schrittweisen Zugabe von Titrant zu einer vorgelegten Menge an Probe wird in ein einfaches alternatives Ansteuern von Proben- und Reagenzstrom abgeändert. Die Mischung des zunächst inhomogenen Flusses erfolgt in einer gerührten Mischkammer oder auch in einem Kapillarreaktor. Die eigentliche Messung findet entweder in einer speziell entwickelten potentiometrischen Messzelle oder in kommerziell erhältlichen Durchflusszellen für Leitfähigkeitsdetektoren bzw. Photometer statt.

Sowohl Anschaffungs- als auch Betriebskosten des entwickelten Analysensystems liegen aufgrund der innovativen Arbeitsweise deutlich unter denen kommerzieller Autotitratoren (ca. 2.500 € im Vergleich zu ca. 15.000 € für den quasi on-line-Einsatz bzw. 40.000 € für echte on-line-Titratoren). Proben- und Reagenzvolumina können durch die unkonventionelle Verwendung von (Kapillar-)Reaktoren zur Mischung von Probe und Titrant auf unter 10 % des Verbrauchs der klassischen Methoden nach DIN reduziert werden.

Die neue Titrationstechnik eignet sich, im Gegensatz zu kommerziellen Titratoren, für einen echten on-line-Betrieb, da im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden die aufwendige Probendosierung sowie Spül- und Reinigungsschritte entfallen. Das System kann vor Ort als vollautomatisches stand-alone System eingesetzt und direkt mit der Probenahmestelle verbunden werden. Diese Betriebsweise vereinfacht den Analysenablauf und vermeidet zufällige Fehler durch den Analytiker. Eine Miniaturisierung des entwickelten

Analysensystems ist aufgrund seines einfachen Aufbaus ohne aufwendige Dosiersysteme und Mischgefäße deutlich einfacher zu realisieren als bei herkömmlichen Titratoren.

Die Präzision des neuen Titrationssystems ist vergleichbar mit klassischen Titrationmethoden. Die Eignung des neuartigen Titrationssprinzips auch für schwierige Matrices, wie z.B. biochemische Proben, wird demonstriert. Das entwickelte on-line-Titrationssystem bietet somit im Bereich der Laboranalytik einen mindestens gleichwertigen Ersatz für kommerzielle Titratoren; im on-line-Betrieb gibt es derzeit keine kommerziell angebotene echte Alternative.

Mit Hilfe von Aktoren der mechanischen Mikrostelltechnik mit (Sub-)Nanometerauflösung gelingt es über ein Mikrodosierelement Flüssigkeiten in Mikrokapillaren zu dosieren oder zu positionieren. Aus theoretischen Überlegungen für kapillarelektrophoretische Trennungen vorgegebene Auflösungen von 20 pL für Kapillaren mit 50 µm Innendurchmesser und 44 pL für 75 µm-Kapillaren können mit dem Positioniersystem realisiert werden.

Die Reproduzierbarkeit des neuen Injektionssystems ist der von kommerziell erhältlichen Varianten mindestens ebenbürtig und übertrifft diese sogar teilweise. Generelle Einschränkungen der Nanoinjektion aufgrund von Diffusionseffekten werden aufgezeigt.

Mit diesem neuartigen Flusssteuerungssystem ist es nicht nur möglich Volumina im Extrembereich von Nano- und Picolitern sicher zu handhaben, sondern auch die sogenannten „kleinsten“ Kationen und Anionen kapillarelektrophoretisch in nur einem Lauf zu trennen und zu detektieren. Mit Hilfe des Stellgliedes der Apparatur werden Proben sowohl injiziert als auch an jede beliebige Position der Kapillare bewegt. Nach der anschließenden elektrophoretischen Trennung besteht die Option, das gesamte Trennvolumen durch den Detektor zu ziehen und somit positiv als auch negativ geladene Ionen zu bestimmen. Durch die variable Probenpositionierung innerhalb der Kapillare kann zusätzlich zu den üblichen Parametern die Trennstrecke der Kationen und der Anionen für die jeweilige Probe optimiert werden. Dies führt zu einer erheblichen Steigerung der Flexibilität und dürfte den Anwendungsbereich der klassischen Kapillarelektrophorese deutlich erweitern.

Kommerziell erhältliche Elektrophoresesysteme ermöglichen zwar durch bestimmte, aufwendige Operationen über Elektrolytzusammensetzungen oder zusätzliche Bauelemente prinzipiell die simultane Bestimmung von Kationen und Anionen. Jedoch mit der hier beschriebenen neuartigen analytischen Technik auf Basis hochauflösender Linearaktoren gelingt es erstmalig alle, auch die „kleinsten“, Ionen in einem Lauf, mit nur einer Kapillare, nur einer einmaligen Probeninjektion und innerhalb von ca. fünf Minuten zu trennen. Die mit dieser Arbeit eingeführte Simultantechnik eröffnet neue Aspekte im Bereich der Ionenanalytik.

6. Literaturverzeichnis

- [1] A. Manz, H. Becker (Eds.), *Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York (1999)
- [2] A. Gerlach, A. Guber, *LaborPraxis*, Sonderausgabe LabFuture (2002) 56
- [3] Th.W. Astle, *JALA*, 3/3 (1998) 63
- [4] V. Dolnik, S. Liu, S. Jovanovich, *Electrophoresis*, 21 (2000) 41
- [5] S. Bülow, *GIT Fachz. Lab.*, 44 (2000) 396
- [6] H. Wehning, *Nachr. Chem.*, 48 (2000) 1566
- [7] K. Fukushi, S. Takeda, K. Chayama, S. Wakida, *J. Chromatogr. A*, 834 (1999) 349
- [8] J. Boden, I. Haumann, A. Mainka, *GIT Fachz. Lab.*, 44 (2000) 924
- [9] A. Bazzanella, H. Lochmann, K. Bächmann, *GIT Fachz. Lab.*, 40 (1996) 10
- [10] M. Chen, R.M. Cassidy, *J. Chromatogr.*, 640 (1993) 425
- [11] D. Kaniansky, M. Masár, J. Marák, R. Bodor, *J. Chromatogr. A*, 834 (1999) 133
- [12] G. Gübitz, M.G. Schmid, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 179
- [13] H.-J. Gaus, *Kapillarelektrophoretische Trennungen von Peptiden, Proteinen und Oligonukleotiden und Direktkopplung mit Elektrospraymassenspektrometrie*, Dissertation, Universität Tübingen (1994)
- [14] C. Heller, *Electrophoresis*, 22 (2001) 629
- [15] F. Menzinger, Ph. Schmitt-Kopplin, D. Freitag, A. Kettrup, *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 45
- [16] A. Paulus, A. Klockow-Beck, *Analysis of Carbohydrates by Capillary Electrophoresis*, Vieweg-Verlag, Wiesbaden, *Chromatographia CE-Series 3* (1999)
- [17] K.D. Altria, M.A. Kelly, B.J. Clark, *Trends Anal. Chem.*, 17 (1998) 214
- [18] H.M. Widmer, *Chimia*, 43 (1989) 134
- [19] P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 770 (1997) 281
- [20] P. Jandik, G. Bonn, *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*, VCH, New York (1993)

- [21] Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung – TrinkwV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 5. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2612)
- [22] K. Aurand, U. Hässelbarth, H. Lange-Aschenfeldt, W. Steuer (Hrsg.), Die Trinkwasserverordnung: Einführung und Erläuterungen für Wasserversorgungsunternehmen und Überwachungsbehörden, Erich Schmidt-Verlag, Berlin, 3. Auflage (1991)
- [23] Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. November 1996 (BGBl. I S. 1696)
- [24] M. Czychowski, Wasserhaushaltsgesetz unter Berücksichtigung der Landeswassergesetze und des Wasserstrafrechts, Beck-Verlag, München, 7. Auflage (1998)
- [25] EG-Richtlinie, Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft L 300 (05.12.1998)
- [26] J. Růžička, E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, John Wiley & Sons, New York, 2nd edition (1988)
- [27] W. Zimmermann, J.K. Reichert, W. Maurer, GIT Fachz. Lab., 39 (1995) 964
- [28] M. Otto, Analytische Chemie, VCH, Weinheim (1995)
- [29] K. Cammann, H. Galster, Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 3. Auflage (1996)
- [30] G. Schwedt, Analytische Chemie – Grundlagen, Methoden und Praxis, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart – New York (1995)
- [31] U. Kunze, G. Schwedt, Grundlagen der qualitativen und quantitativen Analyse, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart – New York, 4. Auflage (1996)
- [32] Zweckverband zur Wasserversorgung Moosrain, WASSER-LEXIKON, <http://www.wasser-lexikon.de> (10.09.2001)
- [33] W. Kölle, Wasseranalysen – richtig beurteilt, Wiley-VCH, Weinheim (2001)
- [34] H. Naumer, W. Heller, Untersuchungsmethoden in der Chemie, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart – New York, 3. Auflage (1997)
- [35] G. Jander, K.F. Jahr, Maßanalyse, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin – New York, 16. Auflage (2001)

- [36] F. Oehme, W. Richter, Instrumentelle Titrationstechnik, Dr. Alfred Hüthig-Verlag, Heidelberg (1983)
- [37] S. Ebel, W. Parzefall, Experimentelle Einführung in die Potentiometrie, VCH, Weinheim (1975)
- [38] D.A. Skoog, J.J. Leary, Instrumentelle Analytik, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York (1996)
- [39] GlobalFIA Inc., FIA/SIA-Tutorial, <http://www.globalfia.com> (14.11.2001)
- [40] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, Flow-Injection Analysis, John Wiley & Sons, New York (1987)
- [41] CD Römpp Chemie Lexikon, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart – New York, Version 1.0 (1995)
- [42] J.F. Gülich, Kreiselpumpen, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York (1999)
- [43] G. Leuschner, Kleines Pumpenhandbuch für Chemie und Technik, VCH, Weinheim (1967)
- [44] J. Růžička, Anal. Chim. Acta, 78 (1975) 145
- [45] H. Bauer, Skriptum Instrumentelle Analytik, Georg-Simon-Ohm-Fachhochschule, Nürnberg (1998)
- [46] R. Tijssen, Anal. Chim. Acta, 114 (1980) 71
- [47] M. Baerns, Chemische Reaktionstechnik, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart – New York, 3. Auflage (1995)
- [48] H. Poppe, Anal. Chim. Acta, 114 (1980) 59
- [49] DIN 38409-6, Härte eines Wassers (H 6), 1 (1986)
- [50] DIN 38406-3, Bestimmung von Calcium und Magnesium, komplexometrisches Verfahren (E 3), 8 (2001)
- [51] Firmenschrift, Trink- und Brauchwasser im Härtetest, Merck Spektrum, Darmstadt, 1 (1988) 44
- [52] DIN 38409-7, Bestimmung der Säure- und Basekapazität (H 7), 5 (1979)

- [53] F. Seel, Grundlagen der analytischen Chemie, VCH, Weinheim (1970)
- [54] A.F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, Lehrbuch der Anorganischen Chemie, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin – New York, 101. Auflage (1995)
- [55] F.H. Frimmel, Wasserchemie für Ingenieure, in: DVGW (Hrsg.), Lehr- und Handbuch Wasserversorgung, Bd. 5, R. Oldenburg-Verlag, München (1993)
- [56] P. Koppe, A. Stozek, Kommunales Abwasser, Vulkan-Verlag, Essen, 3. Auflage (1993)
- [57] A. Tiselius, Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups., Ser. IV 7 (No. 4) (1930) 1
- [58] T. Wieland, E. Fischer, Naturwissenschaften, 35 (1958) 29
- [59] S. Raymond, L. Weintraub, Science, 130 (1959) 711
- [60] S. Hjertén, Biochem. Biophys. Acta, 53 (1961) 514
- [61] A.L. Shapiro, E. Vinuela, J.V. Maizel, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28 (1967) 815
- [62] S. Hjertén, Chromatogr. Rev., 9 (1967) 122
- [63] A.J.P. Martin, F.M. Everaerts, Anal. Chim. Acta, 38 (1967) 233
- [64] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, Th.P.E.M. Verheggen, J. Chromatogr., 169 (1979) 11
- [65] J.W. Jorgenson, K. Lukacs, J. Chromatogr., 218 (1981) 209
- [66] Institut für Technische Chemie der Universität Hannover, Kapillarelektrophorese, <http://vw.tci.uni-hannover.de/freitag/brueg/Kapillar.htm> (17.07.1995)
- [67] A.R. Timerbaev, W. Buchberger, J. Chromatogr. A, 834 (1999) 117
- [68] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, Kapillarelektrophorese, Vieweg-Verlag, Braunschweig – Wiesbaden (1994)
- [69] Waters Corporation, Capillary Ion Analysis Basic Chemistry, <http://www.waters.com> (10.01.2001)
- [70] J.H. Knox, I.H. Grant, J. Chromatogr., 24 (1987) 135
- [71] U. Pyell, Nachr. Chem. Tech. Lab., 45 (1997) 33

- [72] D.N. Heiger, High Performance Capillary Electrophoresis, Hewlett-Packard Company, Frankreich, 3. Auflage (1997)
- [73] J.C. Reijenga, G.V.A. Aben, Th.P.E.M. Verheggen, F.M. Everaerts, J. Chromatogr., 260 (1983) 241
- [74] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem., 56 (1984) 111
- [75] J.W. Jorgenson, Anal. Chem., 58 (1986) 743
- [76] B.L. Karger, A.S. Cohen, A. Guttman, J. Chromatogr., 492 (1989) 585
- [77] F. Eisenbeiss, C. Vorschneider, GIT Fachz. Lab, 41 (1997) 452
- [78] W.R. Jones, P. Jandik, J. Chromatogr., 608 (1992) 385
- [79] J. Weiss, D. Hauffe, GIT Fachz. Lab., 38 (1994) 57
- [80] F. Foret, S. Fanali, L. Ossicini, P. Boček, J. Chromatogr., 470 (1989) 299
- [81] G. Debus, GIT Fachz. Lab., 39 (1995) 38
- [82] K. Bächmann, I. Haumann, T. Groh, Fresenius J. Anal. Chem., 343 (1992) 901
- [83] P. Kuban, B. Karlberg, Anal. Chem., 70 (1998) 360
- [84] X. Xiong, S.F.Y. Li, Electrophoresis, 19 (1998) 2243
- [85] X. Xiong, S.F.Y. Li, J. Chromatogr. A, 822 (1998) 125
- [86] C. Raguénès, X. Xiong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 22 (1999) 2353
- [87] X. Xiong, S.F.Y. Li, J. Chromatogr. A, 835 (1999) 169
- [88] J.L. Beckers, J. Chromatogr. A, 679 (1994) 153
- [89] J. Collet, P. Gareil, J. Chromatogr. A, 716 (1995) 115
- [90] B. Lu, D. Westerlund, Electrophoresis, 19 (1998) 1683
- [91] S.S. Shamsi, N.D. Danielson, Anal. Chem., 67 (1995) 4210
- [92] E. Grushka, R.M. McCormick, J. Chromatogr., 471 (1989) 421
- [93] R. Huopalahti, J. Sunell, J. Chromatogr., 636 (1993) 133

- [94] D.J. Rose, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 642
- [95] S. Honda, S. Iwase, S. Fujiwara, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 313
- [96] M. Deml, F. Foret, P. Boček, *J. Chromatogr.*, 320 (1985) 159
- [97] J. Tehrani, R. Macomber, L. Day, *HRC*, 14 (1991) 10
- [98] C.S. Effenhauser, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2637
- [99] N.A. Guzman, R.E. Majors, *LC-GC Eur.*, 14 (2001) 288
- [100] Z.K. Shihabi, M.E. Hinsdale, *Electrophoresis*, 16 (1995) 2159
- [101] Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 807 (1998) 27
- [102] M.A. Friedberg, M. Hinsdale, Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A*, 781 (1997) 35
- [103] G.S. Wynia, G. Windhorst, P.C. Post, F.A. Maris, *J. Chromatogr. A*, 773 (1997) 339
- [104] K.D. Altria, M.A. Kelly, B.J. Clark, *Trends Anal. Chem.*, 17 (1998) 204
- [105] H. Wätzing, C. Dette, *J. Chromatogr. A*, 636 (1993) 31
- [106] B.R. Thomas, X.G. Fang, X. Chen, R.J. Thyrell, S. Ghodbane, *J. Chromatogr. B*, 657 (1994) 383
- [107] K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr.*, 480 (1989) 91
- [108] R.P.W. Scott, *Liquid Chromatography Detectors*, Elsevier, Amsterdam (1977)
- [109] J.C. Sternberg, *Adv. Chromatogr.*, 2 (1966) 205
- [110] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *J. High Resol. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 4 (1981) 230
- [111] E.V. Dose, G.A. Guiochon, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 123
- [112] H. Yin, C. Keely-Templin, D. McManigill, *J. Chromatogr. A*, 744 (1996) 45
- [113] K.D. Altria, H. Fabre, *Chromatographia*, 40 (1995) 313
- [114] K.D. Altria, F. Campi, *LC-GC Eur.*, 12 (1999) 358
- [115] K.D. Altria, N.G. Clayton, R.C. Harden, J.V. Makwana, M.J. Portsmouth, *Chromatographia*, 40 (1995) 47
- [116] J.A. Lux, H.F. Yin, G. Schomberg, *Chromatographia*, 30 (1990) 7

- [117] J.H. Knox, K.A. McCormack, *Chromatographia* 38 (1994) 279
- [118] R.M. McCormack, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2322
- [119] A. Sjögren, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1933
- [120] E.V. Dose, G.A. Guiochon, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1063
- [121] H.A. Fishman, N.M. Amudi, T.T. Lee, R.H. Scheller, R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2318
- [122] H.A. Fishman, R.H. Scheller, R.N. Zare, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 99
- [123] P.W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH, Weinheim, 2. Auflage (1996)
- [124] S. Shoji, M. Esashi, *J. Micromech. Microeng.*, 4 (1994) 157
- [125] Firmenschrift, Nanopositionierung, Physik Instrumente (PI) GmbH, Karlsruhe (1998)
- [126] J. Tichý, G. Gautschi, *Piezoelektrische Messtechnik*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York (1980)
- [127] K. Ruschmeyer, *Piezokeramik: Grundlagen, Werkstoffe, Applikationen*, Expert-Verlag, Renningen-Malmsheim (1995)
- [128] Firmenschrift, Unternehmensbereich Bauelemente der Philips GmbH, Piezooxide (PXE) Datenbuch, Dr. Alfred Hüthig-Verlag, Heidelberg (1986)
- [129] M. Hammer, *Herstellung und Gefüge-Eigenschaftskorrelationen von PZT-Keramiken*, Dissertation, Universität Karlsruhe, UFO Atelier für Gestaltung & Verlag GbR, Stuttgart, 1. Auflage (1996)
- [130] Physik Instrumente (PI) GmbH, Theory and Applications of Piezo Actuators and PZT NanoPositioning Systems, <http://www.physikinstrumente.com/tutorial> (17.08.2001)
- [131] A. Frittrang, *LaborPraxis*, 22/2 (1998) 36
- [132] J. Zimmermann, *Gen. Eng. News*, 19/1 (1999) 1
- [133] S. Liedtke, L. Kremser, G. Allmaier, A. Rizzi, A. Roitinger, *BIOforum*, 24 (2001) 152
- [134] H. Berndt, B. Kainka, *Messen, Steuern und Regeln mit Word und Excel*, Franzis-Verlag, 2. Auflage (1999)

- [135] R. Degner, S. Leibl, pH messen, VCH, Weinheim (1995)
- [136] Tabellenbuch Metall, Verlag Europa-Lehrmittel, Wuppertal, 35. Auflage (1985)
- [137] B. Maciej, Neuartiges on-line Analysenverfahren für wässrige Proben mit integriertem Aufschluss, Dissertation, Universität Tübingen (1999)
- [138] V. Neitzel, U. Iske, Abwasser – Technik und Kontrolle, VCH, Weinheim (1998)
- [139] K. Doerffel, R. Geyer, H. Müller, Analytikum, Wiley-VCH, Weinheim, 9. Auflage (1994)
- [140] D.L. Nelson, M. Cox, Lehninger Biochemie, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 3. Auflage (2001)
- [141] K. Dose, Biochemie, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 5. Auflage (1996)
- [142] O.E.S. Godinho, L.M. Aleixo, Anal. Biochem., 112 (1980) 323
- [143] B.R. Ebner, Elektrophorese in Kapillaren, Dissertation, Universität Tübingen (1991)

7. Verzeichnis der akademischen Lehrer

- Frau Prof. Dr. Abbasi
- Herr Prof. Dr. Aust
- Herr Prof. Dr. Bartsch
- Herr Prof. Dr. Bauer
- Herr Prof. Dr. Bisswanger
- Herr Prof. Dr. Braun
- Herr Prof. Dr. Dorn
- Herr Prof. Dr. Duszenko
- Herr Prof. Dr. Eckstein
- Herr Prof. Dr. Fricke
- Herr Prof. Dr. Hamprecht
- Herr Prof. Dr. Herold
- Herr Prof. Höhne
- Herr Prof. Dr. Kinkel
- Herr Prof. Dr. Körner
- Herr Prof. Dr. Maurus
- Herr Prof. Dr. Mecke
- Herr Prof. Dr. Metcalfe
- Herr Prof. Dr. Plott
- Herr Prof. Dr. Popp
- Herr Prof. Dr. Reinhold
- Herr Prof. Dr. Stark
- Herr Prof. Dr. Stephan
- Herr Prof. Dr. Stieß
- Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Voelter
- Herr Prof. Dr. Volgnandt
- Herr Prof. Dr. Wehnert
- Herr Prof. Dr. Wolf
- Herr Prof. Dr. Zägelein
- Herr Prof. Dr. Zaidi
- Herr Prof. Dr. Zhang

8. Lebenslauf

Name: Holger Niebauer
Anschrift: Wöhrder Kreuzgasse 11, 90489 Nürnberg
Geburtsdatum: 24. August 1973
Geburtsort: Weilheim i. OB.
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:
September 1980 - Juli 1986: Grund- und Hauptschule, Weilheim
September 1986 - Juli 1990: Staatliche Realschule, Weilheim
September 1990 - Juli 1992: Staatliche Fachoberschule, Weilheim
Abschluss: Fachhochschulreife

Wehrdienst:
Juli 1992 - Juni 1994: Stab Lufttransportgeschwader 61, Penzing

Studium:
Oktober 1994 - November 1998: Studium der Technischen Chemie
Georg-Simon-Ohm-Fachhochschule Nürnberg
Studienschwerpunkt Analysentechnik
20. November 1998: Diplom: 1,0 »mit Auszeichnung«
seit April 1999: Durchführung der Dissertation mit dem Titel
„Neuartige analytische Mikrotechniken für die
Biochemie und die Umweltüberwachung“
unter Anleitung von Prof. Dr. H. Bauer
Fachbereich Technische Chemie
Georg-Simon-Ohm-Fachhochschule Nürnberg

Auslandsaufenthalte:
Februar 1997 - Juli 1997: School of Chemical and Life Sciences
University of Greenwich, London, UK
November 1998 - Dezember 1998: H.E.J. Research Institute of Chemistry
University of Karachi, Karachi, Pakistan
Mai 2001 - Juni 2001: Dalian Institute of Chemical Physics
Chinese Academy of Sciences, Dalian, VR China