

# **Kapillarelektrophorese zur Analyse von komplexen Polyelektrolyten**

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs  
(Dr.-Ing.)

genehmigte  
Dissertation

eingereicht von

**Dipl.-Ing. Karl-Heinz Priestersbach**  
aus Lahnstein

Berichterstatter:	PD Dr. H. Pasch
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Vogel
Tag der Einreichung:	5.12.2006
Tag der mündlichen Prüfung:	29.01.2007

Darmstadt (2007)

**D17**

Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Pasch möchte ich für die interessante Aufgabenstellung und die hervorragende Betreuung ganz herzlich danken. Des Weiteren möchte ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen und den Freiraum bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Herrn K. Rode möchte ich für die Unterstützung bei den MALDI-TOF-MS-Messungen danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. W. Hiller für die Durchführung der NMR-Experimente.

Ich bedanke mich bei Frau C. Hock und allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Abteilung Analytik, die mit ihrer Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die tolle Unterstützung.

Diese Arbeit wurde am Deutschen Kunststoff-Institut unter Leitung von PD Dr. H. Pasch in der Zeit von Dezember 2002 bis Dezember 2006 durchgeführt.

*Meiner Frau Andrea, meinen Kindern Felix und Lea gewidmet*

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Tagungen in Form von Vorträgen und als Poster vorgestellt:

*Vorträge:*

1. "Capillary Electrophoresis of polyelectrolytes; a short in Introduction"  
BASF, 5.12.2005, Ludwigshafen.
2. "Coupling Capillary Electrophoresis and MALDI-TOF-MS for the investigation of synthetic polyelectrolytes"  
10-MALDI-Kolloquium-BAM, 9.5.2006, Berlin.

*Poster:*

1. "Capillary Electrophoresis of synthetic polyelectrolytes"  
344. WE-Heraeus-Seminar, Understanding the Self-Organization of Charged Polymers, 4-6.4.2005, Bad Honnef.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen</b>	<b>4</b>
2.1 Elektrophoretische Mobilität	4
2.2 Elektroosmotischer Fluß	6
2.2.1 Parameter zur Kontrolle des EOF	8
2.3 Trenneffizienz und Auflösung in der CE	10
2.4 Temperatureffekte in der CE	12
2.5 Kapillar-Gel-Elektrophorese (CGE)	16
2.5.1 Theorie der CGE	16
2.5.1.1 Überlappungskonzentration	17
2.5.1.2 Maschenweite	18
2.5.1.3 Maschendynamik	19
2.6 Apparativer Aufbau	20
2.7 Detektion	21
2.7.1 Direkte UV-Detektion	21
2.7.2 Indirekte UV-Detektion	22
2.7.3 Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion	23
2.8 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	25
2.8.1 Grundlagen	25
2.8.2 Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers	25
2.9 Polyelektrolyte	28
2.9.1 Polyelektrolyte in Lösung	28
2.9.2 Gegenionen Kondensation	30
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>32</b>
3.1 Oligomerentrennung von Natriumpolystyrolsulfonat durch CE mit MALDI-TOF-MS-Detektion	32
3.1.1 Verbesserte Isomerentrennung durch Verwendung hochkonzentrierter Natriumboratpuffer	36
3.1.2 Optimierte Trennung durch Einsatz organischer EOF-Modifizier	41

3.1.3	Abhängigkeit der Oligomerentrennung vom Volumenanteil des eingesetzten Modifiers	48
3.2	Methodenentwicklung zur Trennung und Detektion UV-transparenter Polyelektrolyte	51
3.2.1	Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion (CCD)	51
3.2.1.1	Vergleich der Trenneffizienz verschiedener organischer Puffersysteme in Abhängigkeit von ihrer Konzentration	54
3.2.1.2	Verbesserte Oligomerentrennung für PAS1,3k durch konzentrierte Arginin/Sorbinsäure-Puffer	57
3.2.1.3	Untersuchung verschiedener Polyacrylsäuresalze mit der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion	59
3.2.2	Indirekte UV-Detektion (IUV)	61
3.2.3	Vergleich zwischen CCD und IUV für die Trennung von PAS1,3k mit dem Arginin/Sorbinsäure-Puffer AS6	64
3.2.4	Vergleich der elektrophoretischen Trennung von PAS1,3k und PMAS1,2k	66
3.2.5	Untersuchung verschiedener Polyacrylsäure-Na-Salze mit der indirekten UV-Detektion	69
3.2.6	Bestimmung der Nachweisgrenze der indirekten UV-Detektion	74
3.3	Methodenentwicklung zur Charakterisierung und Detektion UV-transparenter segmentierter Copolymere	76
3.3.1	Indirekte UV-Detektion von segmentierten Copolymeren	76
3.3.2	Leitfähigkeitsdetektion von segmentierten Copolymeren	80
3.3.3	Trennung eines Blends aus MPEG-MAS-Copolymer und MAS-Homopolymer	82
3.4	Methodenentwicklung zur Trennung hochmolekularer Polymethacrylsäure-Na-Salze	85
3.5	Vergleich zwischen der Trenneffizienz der CE und der CGE bei der Trennung eines Blends aus verschiedenen PMAS- und PSS-Standards	90

<b>4.</b>	<b>Experimentelle Bedingungen</b>	<b>93</b>
4.1	Apparaturen	93
4.2	Verwendete Software	93
4.3	Leitfähigkeitsdetektor	94
4.4	Kapillarmaterial	94
4.5	Chemikalien	94
4.6	Proben und Standards	95
4.7	Ansetzen der Pufferlösungen	95
4.8	CE-Bedingungen	95
4.9	MALDI-TOF-MS-Messungen	96
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Verwendete Abkürzungen und Symbole</b>	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>105</b>

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Synthetische Polyelektrolyte gewinnen zunehmend an Bedeutung sowohl in industriellen und pharmazeutischen Anwendungen als auch im Konsumgüterbereich. Als Beispiele seien hier die Anwendungen als Flockungsmittel bei der Abwasseraufbereitung, Superabsorber in Babywindeln, Inkrustationsinhibitoren in Waschmitteln, Betonverflüssiger und Tablettencoatings genannt. Derartige Polyelektrolyte weisen in der Regel komplexe chemische Strukturen auf. Neben der für Polymere üblichen Molmassenverteilung sowie den Uneinheitlichkeiten bezüglich der Funktionalität (unterschiedliche Endgruppen) und der Architektur weisen synthetische Polyelektrolyte unter Umständen noch eine Ladungsverteilung auf. Copolymere weisen weitere Verteilungen auf. So kann der Einbau der Comonomere statistisch, alternierend oder in Blöcken erfolgen. Zusätzlich können Verzweigungen auftreten. Desweiteren können Pfropfcopolymere gebildet werden. Für die Optimierung ihrer Anwendungen und eine zielgerichtete Weiterentwicklung ist eine umfassende Charakterisierung von großem Interesse.

Wasserlösliche Polymere tragen polare oder ionische funktionelle Gruppen an den Kettenenden oder entlang der Polymerkette, die zu unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den Polymermolekülen und z. B. der stationären Phase eines chromatographischen Systems führen können. Aufgrund dieser Wechselwirkungen stellt die Analytik von wasserlöslichen und ionischen Polymeren mit HPLC-Methoden immer noch eine Herausforderung dar. Nicht nur die Molmassenbestimmung mit der SEC, sondern insbesondere auch die Auftrennung von komplexen Copolymeren nach der chemischen Zusammensetzung mit der HPLC wird häufig durch das Vorliegen unterschiedlich geladener Spezies in der Probe gestört.

Hier bietet die Kapillarelektrophorese („capillary electrophoresis“, CE) einen entscheidenden Vorteil gegenüber den chromatographischen Methoden. Der Vorteil der CE gegenüber der HPLC bei der Analyse von stark polaren oder ionischen Molekülen liegt darin, dass die die HPLC störenden ionischen Wechselwirkungen im System gezielt für die Trennung genutzt werden können. Auf diese Weise kann z.B. nach der Ladungsdichte von Molekülen aufgetrennt werden. Für ionische Copolymere wäre erwartungsgemäß eine

Trennung nach der chemischen Heterogenität zu erreichen.

Im Bereich der Bioanalytik hat sich die Kapillarelektrophorese (CE) als wichtiges und leistungsfähiges Instrument erwiesen [1-5]. Die Trennung erfolgt nach dem Ladung-zu-Radius-Verhältnis der Moleküle. Die erreichbaren Trennleistungen sind deutlich höher als in der HPLC und können bis zu  $10^6$  theoretische Böden betragen. In der Polymeranalytik ist die CE eine noch weitestgehend neue Methode. In den letzten 10 Jahren haben erste Experimente an Modellpolymeren wie Polystyrolsulfonaten (PSS) und derivatisierten Polyethylenoxiden (PEG) die Anwendbarkeit der CE in der Polymeranalytik gezeigt [6-9]. Es wurde allerdings beschrieben, dass die Trennung von synthetischen Polyelektrolyten in der CE nur für Oligomere möglich ist [10,11]. Die Trennung hochmolekularer Polystyrolsulfonat-Proben gelang mit der Kapillargelelektrophorese (capillary gel electrophoresis, CGE). Hierbei werden dem Puffer sogenannte Gelbildner wie z.B. Dextran, Pullulan, PEO oder Hydroxyethylcellulose zugesetzt. Das sich in diesem Puffersystem ausbildende Netzwerk ermöglicht die Trennung der Proben nach dem Molekulargewicht [12-17].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von elektrophoretischen Methoden für die Trennung und Charakterisierung von synthetischen Polyelektrolyten. Hierbei sollen zuerst optimierte CE-Trennungen für Oligomere erstellt werden. Durch den Einsatz hochkonzentrierter Puffer sowie durch gezielte Modifizierungen der verwendeten Elektrolytsysteme soll eine verbesserte Oligomerentrennung ermöglicht werden. Die Untersuchungen wurden an niedermolekularen Polystyrolsulfonaten durchgeführt. Anschließend soll die Kopplung mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie erstmals eine umfassende Charakterisierung von niedermolekularen Polyelektrolyten ermöglichen.

Im Weiteren sollen neue Trenn- und Detektionsverfahren für die CE-Analyse von UV-transparenten Polyelektrolyten entwickelt werden. Die zur Zeit kommerziell erhältlichen CE-Apparaturen sind nur mit spektroskopischen Detektoren wie dem UV- oder dem Laser-induzierten Fluoreszenz-Detektor (LIF) ausgestattet. Dies macht die Analyse UV-transparenter Polyelektrolyte

wie z.B. Polyacrylsäure (PAS), Polymethacrylsäure (PMAS) oder Copolymere aus Polyethylenoxid (PEO) und Polymethacrylsäure bzw. Polyacrylsäure mit der CE nahezu unmöglich. In den bisher erfolgten Trennungen von Polyethylenoxiden mit der CE wurde das Detektionsproblem durch Derivatisierung der Proben mit UV-aktiven Reagenzien behoben [8,9]. In der vorliegenden Arbeit wird auf die Derivatisierung der Proben bewusst verzichtet, da diese Derivatisierungsreaktionen in der Regel sehr zeitintensiv sind. Hierbei wird der Vorteil der normalerweise sehr schnellen CE-Analyse wieder zunichte gemacht. Desweiteren sind solche Umsetzungen nie quantitativ. Ebenfalls können unerwünschte Reaktionen, die eine Veränderung der Probe verursachen, nicht vollständig ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit werden Methoden sowohl für die indirekte UV-Detektion als auch für die kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion entwickelt. Diese Methoden werden dann für CE-Untersuchungen von PMAS und PAS angewendet. Komplementär zur SEC und zur HPLC werden Methoden entwickelt, mit denen komplex aufgebaute PEO-PMAS-Copolymere nach der Ladungsdichte und damit der chemischen Zusammensetzung aufgetrennt werden können.

Da in der CE hochmolekulare Polyelektrolyte nicht mehr aufgetrennt werden können, wird im Weiteren zur Trennung von hochmolekularen PMAS-Proben nach dem Molekulargewicht eine optimierte Kapillargelelektrophorese-Methode entwickelt. Hierbei wird insbesondere der Einfluss des Molekulargewichts und der Konzentration der eingesetzten Gele auf die Trennung der Proben untersucht. Anschließend wird eine Methode zur Trennung hochmolekularer Polyelektrolyte nach der chemischen Struktur und dem Molekulargewicht anhand verschiedenen PMAS- und PSS-Proben entwickelt.

## 2. Grundlagen

### 2.1 Elektrophoretische Mobilität

In der Kapillarelektrophorese (CE) erfolgt die Trennung der Analytione aufgrund unterschiedlicher Ionenbeweglichkeiten im elektrischen Feld. Auf ein Ion der Ladung  $z_i$  wirkt in einem elektrischen Feld die Beschleunigungskraft  $F_E$ :

$$F_E = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad (1)$$

mit:  $z_i$  = Ladungszahl  
 $e_0$  = Elementarladung  
 $E$  = elektrisches Feld

Da sich die Ionen in einem viskosen Medium - in den meisten Fällen eine wäßrige Lösung – bewegen, wirkt auf sie eine der elektrischen Beschleunigungskraft  $F_E$  entgegengesetzte Reibungskraft  $F_R$ . Für kugelförmige Teilchen kann die Reibungskraft  $F_R$  durch die *Stokessche* Gleichung beschrieben werden.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta \cdot v_i \quad (2)$$

mit:  $v_i$  = Geschwindigkeit des Ions  $i$   
 $\eta$  = dynamische Viskosität der Lösung  
 $r_i$  = Radius des solvatisierten Ions  $i$

Nach einer kurzen Anlaufphase stellt sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Beschleunigungskraft und Reibungskraft ein.

$$z_i \cdot e_0 \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta \cdot v_i \quad (3)$$

Das Ion bewegt sich mit der konstanten Geschwindigkeit  $v_i$

$$v_i = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (4)$$

Gleichung 4 besagt, dass die Migrationsgeschwindigkeit eines Ions proportional der elektrischen Feldstärke ist. Den Quotienten aus Geschwindigkeit und Feldstärke bezeichnet man als die absolute Mobilität  $\mu_a$

$$\mu_a = \frac{v_i}{E} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (5)$$

Nach Gleichung 5 hängt die Mobilität neben den Analytparametern  $z$ ,  $e$  und  $r$  nur von der dynamischen Viskosität des Elektrolyten ab, die ihrerseits temperaturabhängig ist. Diese Abhängigkeit kann durch folgenden Ansatz formuliert werden [18,19]

$$\eta = k \cdot \exp\left(\frac{E_A}{R \cdot T}\right) \quad (6)$$

mit:  $E_A$  = Aktivierungsenergie  
 $R$  = Gaskonstante  
 $T$  = absolute Temperatur  
 $k$  = Konstante

Für geringe Temperaturänderungen kann die Mobilität mit folgender Gleichung abgeschätzt werden [20].

$$\mu_{T_2} = \mu_{T_1}(1 + k \cdot \Delta T) \quad (7)$$

Für wässrige Lösungen erhält man für  $k$  einen Wert von  $0,02 \text{ K}^{-1}$ . Daraus folgt, dass die Mobilität um 2 % je ein Kelvin Temperaturanstieg zunimmt.

Die direkte Berechnung der elektrophoretischen Mobilität ist nicht möglich, da wichtige Parameter, wie die effektive Ladung eines Ions, der hydrodynamische Ionenradius oder der Einfluss aller Elektrolytkomponenten nicht zugänglich sind. Desweiteren gilt Gleichung 5 nur für sphärische Teilchen in unendlich verdünnten Lösungen.

Experimentell wird die Mobilität nach folgender Gleichung berechnet:

$$\mu = \frac{L_{eff}}{t_i \cdot E} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{t_i \cdot U} \quad (8)$$

mit:  $\mu$  = Mobilität  
 $t_i$  = Migrationszeit  
 $E$  = elektrische Feldstärke  
 $U$  = Spannung  
 $L_{eff}$  = effektive Kapillarlänge (Länge bis zum Detektor)  
 $L_{ges}$  = gesamte Kapillarlänge

Es ist wichtig zwischen der Gesamtlänge ( $L_{ges}$ ) und der Länge bis zum Detektor ( $L_{eff}$ ) zu unterscheiden, da das elektrische Feld über der gesamten Länge der Kapillare abfällt, die Ionen aber nur die effektive Kapillarlänge in der Zeit  $t_i$  durchwandern.

## 2.2 Elektroosmotischer Fluß

In vielen elektrophoretischen Systemen wird die Wanderung der Ionen vom elektroosmotischen Fluß (EOF) überlagert. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analytens setzt sich somit additiv aus den Vektoren der Geschwindigkeit des EOF und der Mobilität des Ions zusammen.

Als Elektroosmose wird die Bewegung einer flüssigen Phase relativ zu einer stationären, geladenen Oberfläche durch ein angelegtes elektrisches Feld bezeichnet [21]. Im Falle der in der CE verwendeten Quarzglas kapillaren kommt es bei pH-Werten über 4 zur annähernd vollständigen Deprotonierung der Silanolgruppen. Es kommt zur Bildung einer negativen Oberflächenladung. Solvatisierte Kationen aus der Elektrolytlösung lagern sich unter Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht an die negativ geladene Kapillarinnenwand an. Wie in Abb. 1 gezeigt, setzt sich diese Doppelschicht aus einer starren (*Helmholtz*-Schicht) und einer diffusen (*Gouy-Chapman*-Schicht) zusammen. Das sich aufgrund der Ladungsverteilung ausbildende Zetapotential  $\zeta$  fällt nach *Stern* [22] im Bereich der starren Schicht linear und in der diffusen Schicht exponentiell ab (Abb. 2).

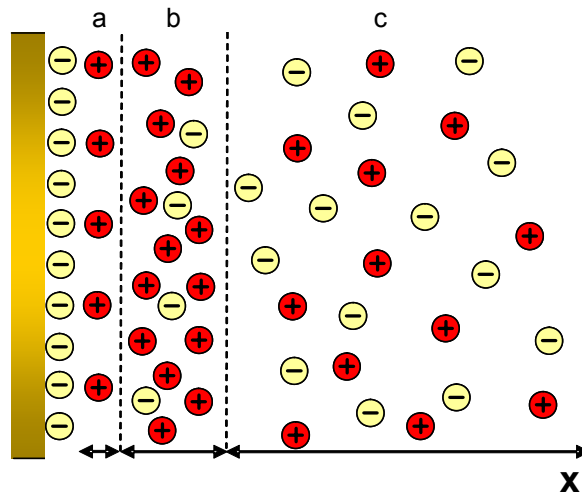


Abb. 1: Ladungsverteilung und Ausbildung der Doppelschicht  
 a: starre *Helmholtz*-Schicht  
 b: diffuse *Gouy-Chapman*-Schicht  
 c: Elektrolyt

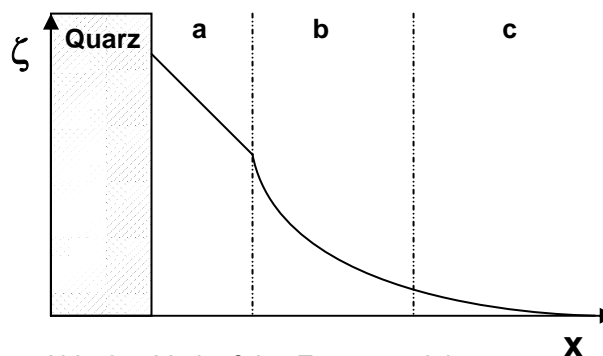


Abb. 2: Verlauf des Zetapotentials

In der diffusen Schicht der Elektrolytlösung herrscht, da auch die Gegenionen der Silanolgruppen im System verbleiben, ein „Überschuss“ an mobilen hydratisierten Kationen. Liegt parallel zur Oberfläche ein elektrisches Feld an, so werden die Gegenionen in der diffusen Schicht längs der Feldachse beschleunigt. Durch Impulsübertragung wird die gesamte Flüssigkeitssäule im Inneren der Kapillare mitbewegt. Es bildet sich ein extrem flaches kolbenförmiges Strömungsprofil aus. Im Gegensatz zum laminaren Strömungsprofil hydrodynamischer Flüsse bewirkt es praktisch keine zusätzliche Bandenverbreiterung.

Die Geschwindigkeit des EOF wird durch die *Helmholtz-Smoluchowski*-Gleichung beschrieben.

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon_r \cdot \varepsilon_0 \cdot E \cdot \zeta}{\eta_{BGE}} \quad (9)$$

mit:  $v_{EOF}$  = Geschwindigkeit des EOF  
 $\varepsilon_r$  = relative Dielektrizitätskonstante  
 $\varepsilon_0$  = Dielektrizitätskonstante im Vakuum  
 $\zeta$  = Zetapotential  
 $\eta_{BGE}$  = dynamische Viskosität des „Back Ground Electrolyte“

Gleichung 9 zeigt, dass die Geschwindigkeit des EOF umgekehrt proportional der Elektrolytviskosität, proportional der Dielektrizitätskonstanten des Elektrolyten, der elektrischen Feldstärke und dem Zetapotential ist. Das Zetapotential wird dabei durch die Oberflächenladungsdichte und die räumliche Ausdehnung der diffusen Schicht bestimmt. Die Oberflächenladungsdichte ist abhängig vom pH-Wert des Elektrolyten, während die Dicke der Doppelschicht hauptsächlich von der Ionenstärke des Elektrolyten abhängt. Mit Gleichung 10 kann das Zetapotential bestimmt werden.

$$\frac{1}{\zeta} = \sqrt{\frac{8 \cdot \pi \cdot e_0^2 \cdot N_A}{1000 \cdot \varepsilon \cdot kT}} \cdot I \quad (10)$$

mit:  $\zeta$  = Zetapotential  
 $e_0$  = Elementarladung  
 $N_A$  = Avogadrokonstante  
 $\varepsilon$  = Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten  
 $k$  = Boltzmannkonstante  
 $T$  = Temperatur  
 $I$  = Ionenstärke des Elektrolyten

### 2.2.1 Parameter zur Kontrolle des EOF

Da dem EOF eine zentrale Rolle bei der elektrophoretischen Trennung in Quarzglaskapillaren zukommt, ist dessen Kontrolle von entscheidender Wichtigkeit. Im Folgenden sind die zur Kontrolle des EOF verfügbaren Parameter und deren Auswirkungen aufgeführt [23].

<i>Parameter</i>	<i>Auswirkung</i>
pH-Wert	Änderung der Oberflächenladung. Zunahme des EOF für zunehmenden pH-Wert. Kann auch die Analytladung beeinflussen.
Pufferkonzentration	Änderung des Zetapotentials. Zunahme des EOF für abnehmende Pufferkonzentration. Hohe Ionenstärken führen zu höheren elektrischen Strömen und damit zu einer Erwärmung des Systems.
Temperatur	Änderung der Viskosität des Puffers. Zunahme des EOF durch Temperaturerhöhung. Beeinflussung der Selektivität.
Elektrisches Feld	Proportionale Änderung des EOF. Höhere Feldstärken führen zu höheren elektrischen Strömen. Dies führt wiederum zur Temperaturerhöhung im System.
Organische Lösungsmittel	Änderung des EOF aufgrund der Änderung der Dielektrizitätskonstanten des Puffers, des Zetapotentials und der Viskosität des Puffers.
Tenside	Adsorption an der Kapillarwand durch ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen. Kationische Tenside können den EOF reduzieren oder sogar umkehren.
Hydrophile Polymere	Bilden eine ungeladene Kapillaroberfläche aus. Unterdrücken den EOF.

Tab. 1: Parameter zur Kontrolle des EOF [23]

### 2.3 Trenneffizienz und Auflösung in der CE

In Analogie zur Chromatographie wird die Trenneffizienz durch die Höhe eines theoretischen Bodens  $H$  und die Anzahl der theoretischen Böden  $N$  beschrieben (Gleichung 11).

$$N = \frac{L}{H} \quad (11)$$

mit:  $N$  = Bodenzahl  
 $H$  = Höhe eines theoretischen Bodens  
 $L$  = Kapillarlänge

Die Peakbreite lässt sich durch die Varianz  $\sigma^2$  darstellen. Somit kann  $H$  als die auf die Kapillarlänge bezogene Varianz definiert werden (Gleichung 12).

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (12)$$

mit:  $H$  = Höhe eines theoretischen Bodens  
 $L$  = Kapillarlänge  
 $\sigma^2$  = Varianz

Unter Verwendung des Einsteinschen Diffusionsgesetzes (Gleichung 13) erhält man eine Beziehung zwischen der Bodenzahl  $N$ , der Feldstärke  $E$  und dem Diffusionskoeffizienten  $D$  der Probe (Gleichung 14).

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2DL_{\text{eff}}L_{\text{ges}}}{\mu U} \quad (13)$$

$$N = \frac{\mu U}{2D} \quad (14)$$

mit:  $N$  = Bodenzahl  
 $U$  = Spannung  
 $L_{\text{eff}}$  = effektive Kapillarlänge  
 $L_{\text{ges}}$  = Gesamtlänge der Kapillare  
 $\mu$  = Mobilität  
 $t$  = Migrationszeit  
 $D$  = Diffusionskoeffizient der Probe

Durch die ungefüllte Kapillare und das kolbenförmige Strömungsprofil ist im Gegensatz zur Chromatographie nur die Longitudinaldiffusion für die Bandenverbreiterung verantwortlich. Aus diesem Grund zeigt Gleichung 14, dass die Bodenzahl mit abnehmendem Diffusionskoeffizienten der Probe steigt.

Zur praktischen Berechnung der Bodenzahl werden die Migrationszeit und die Peakbreite in halber Höhe verwendet. Die Bodenzahl berechnet sich dann in Analogie zur Chromatographie nach Gleichung 15.

$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t}{b_{0,5}} \right)^2 \quad (15)$$

mit: N = Bodenzahl  
t = Migrationszeit  
 $b_{0,5}$  = Peakbreite in halber Höhe

Für die qualitative Beschreibung der Trennung zweier Analyten wird die Auflösung  $R$  verwendet. Die zur Chromatographie analoge Formel für  $R$  zeigt Gleichung 16.

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\Delta\mu_{eff}}{\bar{\mu}_{eff}} \quad \text{mit } \Delta\mu_{eff} = \mu_{eff}^2 - \mu_{eff}^1 \quad \text{und } \bar{\mu}_{eff} = \frac{\mu_{eff}^2 + \mu_{eff}^1}{2} \quad (16)$$

mit: R = Auflösung  
N = Bodenzahl  
 $\mu_{eff}^1, \mu_{eff}^2$  = effektive Mobilitäten der beiden Analyten 1 und 2

## 2.4 Temperatureffekte in der CE

Durch das angelegte elektrische Feld wird in der Kapillare ein Stromfluss erzeugt, der zu einer Erwärmung des Elektrolytsystems führt. Für eine mit Puffer gefüllte Kapillare lässt sich die erzeugte elektrische Leistung nach Gleichung 17 berechnen [23]:

$$P = U \cdot I = R \cdot I^2 = U^2 \cdot d^2 \cdot \frac{\pi \cdot \kappa}{2L} \quad (17)$$

mit: P = Elektrische Leistung  
 U = Spannung  
 I = Stromstärke  
 $\kappa$  = Spezifische Leitfähigkeit des Puffers  
 d = Innendurchmesser der Kapillare  
 L = Kapillarlänge

Gleichung 17 zeigt die quadratische Abhängigkeit der elektrischen Leistung von der angelegten Spannung und dem Innendurchmesser der Kapillare sowie die Abhängigkeit von der spezifischen Leitfähigkeit des Puffers. Die mit der elektrischen Leistung verbundene Temperaturänderung führt zu einem Temperaturgradienten innerhalb der Kapillare, der mit Gleichung 18 beschrieben werden kann [24].

$$\Delta T = T_i - T_w = \frac{P}{4 \cdot \pi \cdot k_b} \quad (18)$$

mit:  $T_i$  = Temperatur in der Kapillarmitte  
 $T_w$  = Temperatur an der Kapillarinnenwand  
 P = Elektrische Leistung  
 $k_b$  = Wärmeleitfähigkeit des Puffers

Für eine mit Puffer gefüllte Kapillare lässt sich die durch den Stromfluss erzeugte Wärmemenge nach Gleichung 19 berechnen [25]:

$$Q = E^2 \cdot \lambda \cdot c \quad (19)$$

Mit: Q = Wärmemenge pro Volumeneinheit  
 E = Elektrische Feldstärke  
 $\lambda$  = Molare Leitfähigkeit des Puffers  
 c = Konzentration des Puffers

Da die durch die elektrische Leistung erzeugte Wärmemenge nur über die Kapillarwand abgegeben wird, bildet sich im Inneren der Kapillare ein radialer Temperaturgradient senkrecht zur elektrophoretischen Wanderungsrichtung aus. In Abb. 3 ist der sich ausbildende Temperaturgradient schematisch dargestellt.

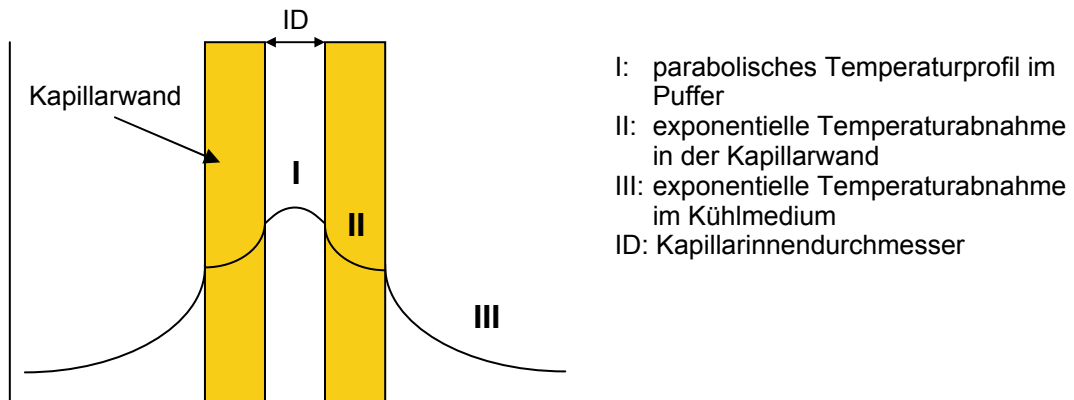


Abb. 3: Temperaturgradient im Puffer und in der Kapillarwand [23]

Die Temperaturerhöhung innerhalb einer nicht gekühlten Kapillare kann nach Knox mit folgender Formel berechnet werden: [25]

$$\log \Delta T = 1,7 \log d_i + \log Q - 4,2 \quad (20)$$

Mit:  $\Delta T$  = Temperaturänderung in der Kapillare  
 $d_i$  = Kapillarinne Durchmesser  
 $Q$  = Wärmemenge pro Volumeneinheit

In Abb. 4 sind die Temperaturänderungen innerhalb einer Kapillare in Abhängigkeit vom Kapillarinne Durchmesser ohne zusätzliche Kühlung für verschiedene Pufferkonzentrationen dargestellt. Die Berechnungen wurden für unterschiedliche Natriumboratpuffer für eine Kapillarlänge von 27 cm und einer Spannung von 15 kV durchgeführt. Die hohen Temperaturänderungen sind jedoch nur von theoretischem Interesse, da bei Erreichen des Siedepunktes der wässrigen Pufferlösung der Stromfluss durch die beginnende Blasenbildung innerhalb der Kapillare unterbrochen wird. Somit sind der Temperaturerhöhung und damit auch der freigesetzten Wärmemenge natürliche Grenzen gesetzt.

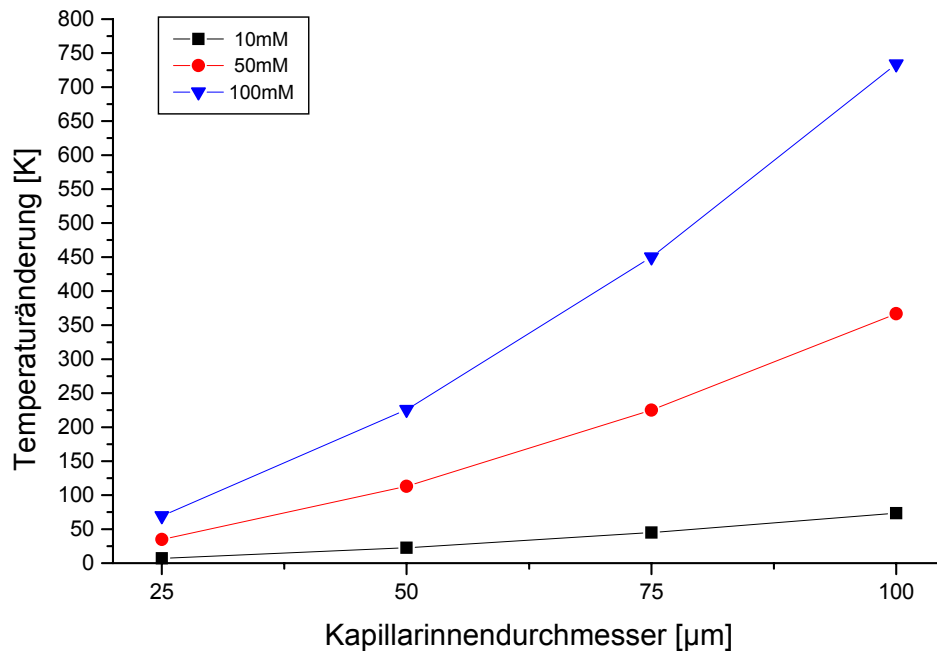


Abb. 4: Abhängigkeit der Temperaturänderung im Inneren einer Kapillare vom Kapillarinnendurchmesser für verschiedene Pufferkonzentrationen. Kapillarlänge: 27 cm, Spannung: 15 kV, Puffer: Natriumborat

In Abb. 5 ist die Abhängigkeit der Temperaturerhöhung im Inneren einer Kapillare von der elektrischen Feldstärke bei verschiedenen Pufferkonzentrationen dargestellt. Der exponentielle Temperaturanstieg verdeutlicht, dass die Verwendung hochkonzentrierter Puffer nur in Kapillaren mit geringem Innendurchmesser und ausreichender aktiver Kühlung möglich ist. Es zeigt sich zudem, dass Trennungen in hochkonzentrierten Puffern nur bei kleinen Feldstärken bzw. kleinen Spannungen durchgeführt werden können. Dies führt unweigerlich zu deutlich verlängerten Analysezeiten.

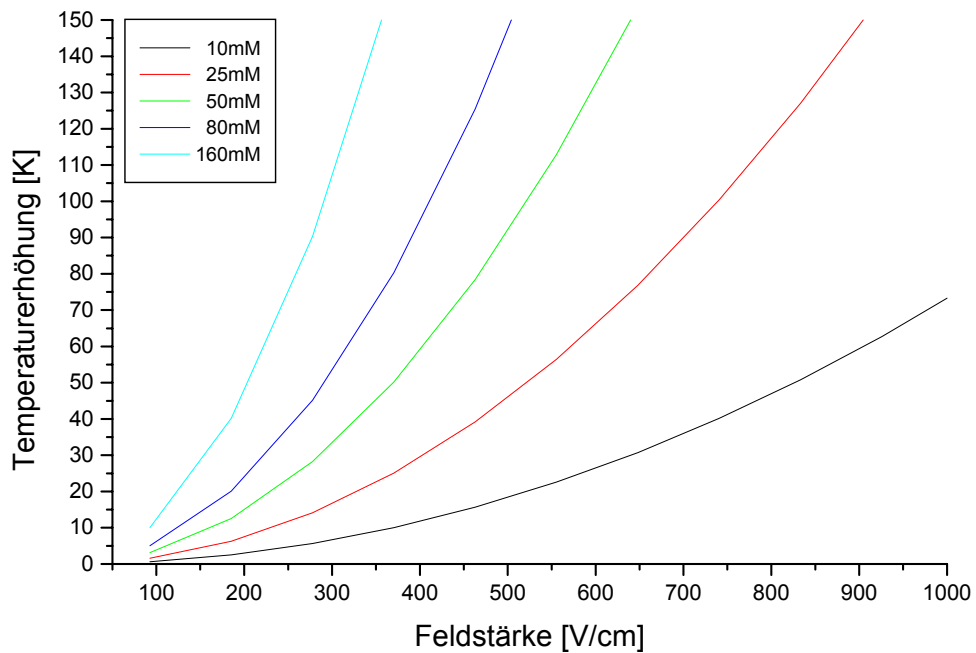


Abb. 5: Abhängigkeit der Temperaturänderung von der Feldstärke bei verschiedenen Pufferkonzentrationen ohne Kühlung  
Kapillare:  $L = 27$  cm,  $ID = 50\mu\text{m}$ ; Puffer: Natriumborat

Verursacht durch die Temperaturerhöhung kommt es ebenfalls zur Ausbildung eines Viskositätsgradienten im Puffer. Bei entsprechend hohen Temperatur- und Viskositätsgradienten kann es zusätzlich noch zu einer Änderung des Strömungsprofils innerhalb der Kapillare von der Kolbenströmung hin zur parabolischen Strömung kommen. Es kommt zur Bandenverbreiterung durch erhöhte thermische Diffusion und aufgrund von Migrationsunterschieden, die durch den Viskositätsgradienten und das parabolische Strömungsprofil verursacht werden. Durch die Temperaturerhöhung ändern sich zudem sowohl die Dissoziationskonstanten des Puffers als auch der Analyten. Bei Erhöhung der Dissoziationskonstanten des Puffers steigt die Leitfähigkeit, was wiederum zu einer Zunahme der Stromstärke mit den oben beschriebenen Auswirkungen führt. Die durch die Temperaturerhöhung hervorgerufenen komplexen Änderungen der Trennparameter führen im Allgemeinen zu einer Verringerung der Trenneffizienz und Abnahme der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse.

## 2.5 Kapillar-Gel-Elektrophorese (CGE)

Man mag annehmen, dass die elektrophoretische Mobilität eines Polyelektrolyten linear mit der Nettoladung der Kette zunimmt. Dies gilt jedoch nur für Oligomere. Für höhermolekulare Polyionen ergibt sich ein nahezu konstantes Oberfläche/Ladungsverhältnis. Hieraus resultiert eine konstante elektrophoretische Mobilität, die eine Trennung in ungefüllten Kapillaren unmöglich macht (siehe Abbildung 6).

Im Rahmen des amerikanischen „Genom-Projekts“, das Ende der achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts gestartet wurde, entwickelte man die Kapillar-Gel-Elektrophorese zur Trennung hochmolekularer Biomoleküle. Die Trennung in der CGE erfolgt nach der Molekülgröße. Um diese Trennung zu ermöglichen, werden dem Puffer hydrophile Gelbildner als Siebmedium zugesetzt. Diese bilden ein dynamisches, physikalisches Netzwerk aus. Durch entsprechende Wahl des Molekulargewichtes und der Konzentration des zugesetzten Gelbildners ist es möglich, sowohl die Maschengröße des Netzwerkes als auch die Maschendynamik zu bestimmen. Die am häufigsten zum Einsatz kommenden Gelbildner sind Dextran, Pullulan und vor allem Hydroxyethylcellulose.

### 2.5.1 Theorie der CGE

In Abbildung 6 ist die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität  $\mu$  von der Anzahl an Wiederholungseinheiten  $N$  schematisch dargestellt [11]. Im Bereich kleiner Oligomere ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von  $\mu$  zu  $N$ . Im Übergangsbereich von der Stäbchen- zur Knäuelkonformation durchläuft die Mobilität ein Maximum. Nach Durchlaufen des Maximums nimmt die Mobilität wieder leicht ab, bis sie im Bereich der Knäuelkonformation einen von  $N$  unabhängigen konstanten Wert annimmt. Der Bereich der konstanten Mobilität wird für vollständig geladene Polyionen sehr schnell erreicht. So erreicht die Mobilität z.B. für Natriumpolystyrolsulfonat und Polyacrylsäure-Na-Salz ihren konstanten Wert schon bei mittleren Molmassen  $M_W$  von ca. 2000 g/mol.

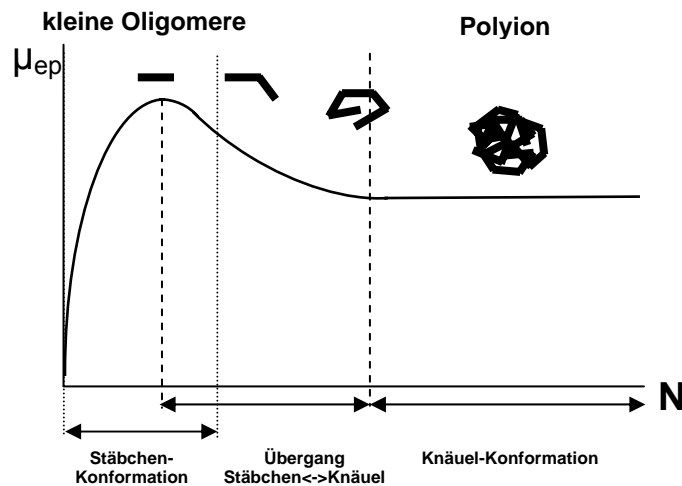


Abb. 6: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Mobilität in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungseinheiten für einen vollständig geladenen Polyelektrolyten [11]

### 2.5.1.1 Überlappungskonzentration

Die Überlappungskonzentration  $C^*$  für Polymerlösungen ist die Konzentration, bei der es durch Überlappung und Verschlaufung der einzelnen Polymerketten zur Ausbildung des Netzwerkes kommt. Die Überlappungskonzentration  $C^*$  kann wie folgt ausgedrückt werden [15,26]:

$$C^* = \frac{3M_w}{4\pi R_g^3 N_A} = \frac{3NM_0}{4\pi R_g^3 N_A} \quad (19)$$

mit:  $M_w$  = mittlere Molmasse des Gelbildners  
 $N$  = Anzahl an Monomereinheiten pro Polymerkette  
 $M_0$  = Masse der Monomereinheit  
 $R_g$  = Trägheitsradius  
 $N_A$  = Avogadrokonstante

Für ein athermisches Lösungsmittel erhält man für  $R_g$  folgenden Ausdruck [15]:

$$R_g = aN^{0,6} \quad (20)$$

mit:  $a$  = Monomerdimensionen  
 $N$  = Anzahl an Monomereinheiten pro Polymerkette

Setzt man Gleichung 20 in 19 ein, erhält man für die Überlappungskonzentration folgenden Ausdruck:

$$C^* = \frac{3N^{-0.8}M_0}{4\pi N_A a^3} \quad (21)$$

Gleichung 21 besagt, dass bei Zunahme der Molekülgröße (N) die Überlappungskonzentration abnimmt.

Nach *Mitnik* [27] kann bei bekanntem  $M_w$  die Überlappungskonzentration mit folgender Näherung bestimmt werden:

$$C^* = \frac{1,5}{[\eta]} \quad (22)$$

Ersetzt man in Gleichung 22 die intrinsische Viskosität  $[\eta]$  durch die *Mark-Houwink*-Beziehung,

$$[\eta] = KM_w^a \quad (23)$$

mit: K, a = Mark-Houwink-Parameter  
 $M_w$  = Molmasse

kann man die Überlappungskonzentration  $C^*$  aus den *Mark-Houwink*-Parametern abschätzen:

$$C^* = \frac{1,5}{KM_w^a} \quad (24)$$

### 2.5.1.2 Maschenweite

Die Siebeigenschaften des Polymernetzwerkes werden bestimmt durch die Maschenweite und die Maschendynamik bzw. die Lebensdauer einer Masche.

*Grossmann* und *Soane* schlugen die Abschirmlänge  $\xi$  zur qualitativen Beschreibung des Netzwerkes vor [28].  $\xi$  beschreibt die durchschnittliche Entfernung zweier Polymerstränge in einem Polymernetzwerk.

$$\xi = 0,5 \cdot R_g \left( \frac{C}{C^*} \right)^{\frac{3}{4}} \quad (25)$$

*Viovy* und *Duke* führten einen Ausdruck für die Maschenweite, den sog. „blob size“  $\xi_b$  ein [29].  $\xi_b$  ist durch einen universellen Vorfaktor mit der Abschirmlänge  $\xi$  verknüpft [30]:

$$\xi_b = 2,86 \cdot \xi = 1,43 \cdot R_g \left( \frac{C}{C^*} \right)^{\frac{3}{4}} \quad (26)$$

Nach *Cottet* erhält man durch Kombination von Gleichung 21, 22 und 26 folgende Beziehung für die Maschengröße  $\xi_b$  [15]:

$$\xi_b = 1,43 \frac{M_0^{0,75} N_A^{-0,75}}{a^{1,25}} C^{-0,75} \quad (27)$$

Gleichung 27 besagt, dass die Maschenweite eines Polymernetzwerkes von der Konzentration des eingesetzten Gelbildners, nicht jedoch von dessen Kettenlänge abhängt.

### 2.5.1.3 Maschendynamik

Im Gegensatz zu vernetzten Gelen, bilden die verschlauften Polymerlösungen dynamische Netzwerke aus. Die Maschendynamik, bzw. die durchschnittliche Lebensdauer einer Masche kann nach *de Gennes* wie folgt berechnet werden [31,17]:

$$t = \frac{6\pi\eta}{kT} \left( \frac{4\pi N_A}{3} \right)^{\frac{2-a}{a}} \left( \frac{K}{6^{3/2}\Phi} \right)^{\frac{2}{a}} C^{\frac{2-a}{a}} M_w^3 \quad (28)$$

mit:  $\phi$  = Flory-Viskositätskonstante  
 $K, a$  = Mark-Houwink-Parameter  
 $N_A$  = Avogadrokonstante  
 $C$  = Konzentration des Gels  
 $M_w$  = mittlere Molmasse des Gels

Aus Gleichung 28 ist ersichtlich, dass die Lebensdauer und damit die Maschendynamik sowohl von der Konzentration als auch von der mittleren Molmasse des eingesetzten Gelbildners abhängt.

Mit den beiden Parametern Maschenweite und Maschendynamik kann man nun für eine gegebene Trennaufgabe ein optimiertes Polymernetzwerk generieren. So wählt man zur Trennung hochmolekularer Proben eher wenig konzentrierte Gellösungen mit einem hohen Molekulargewicht. Für kleinere Probenmoleküle benutzt man hingegen höher konzentrierte Lösungen eines nicht so hochmolekularen Gels.

## 2.6 Apparativer Aufbau

Der schematische Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Hauptkomponenten einer solchen Anlage sind die mit Elektrolyt gefüllte Kapillare, die Hochspannungsversorgung, der UV-Detektor, die Druckgasanlage zur Probeninjektion sowie Gefäße für Proben und Puffer.

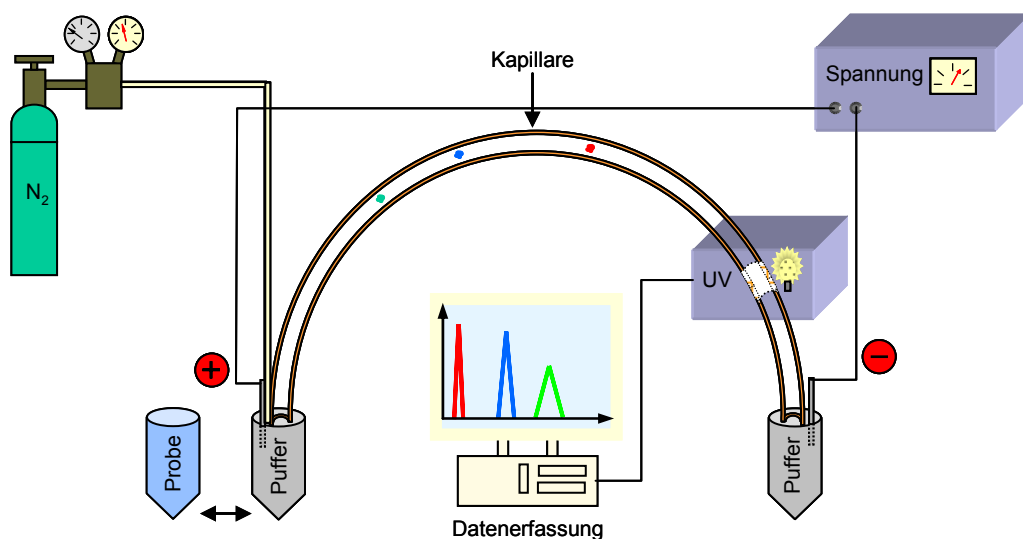


Abb. 7: Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur

Bei den verwendeten Kapillaren handelt es sich um Quarzglas Kapillaren mit Innendurchmessern von 25 bis 100  $\mu\text{m}$  und Gesamtlängen von ca. 25 bis 100 cm. Zur mechanischen Stabilisierung der Kapillaren werden diese außen mit einer Polyimidbeschichtung versehen.

Zur Probeninjektion wird an einem Ende der Kapillare das Elektrolytgefäß

während der Aufgabe durch ein Probengefäß ersetzt. Die Injektion erfolgt entweder hydrodynamisch oder elektrokinetisch. Die UV-Detektion erfolgt „on-column“. Hierbei wird ein ca 0,5 cm langes Teilstück der Polyimidschutzschicht entfernt. Das so präparierte Kapillarsegment dient dann als UV-Messzelle. Auf einzelne Detektionsprinzipien wird später noch ausführlich eingegangen.

## 2.7 Detektion

Die häufigsten Detektionsmethoden in der CE sind spektroskopische Methoden wie die UV-Detektion und die Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion (LIF). Die Detektion erfolgt „on-column“, d.h direkt in der Kapillare. Beispiele für nachgeschaltete Detektionsmethoden sind elektrochemische Detektoren, die Kopplung mit Massenspektrometern oder der Kernresonanzspektroskopie.

Im Gegensatz zur Chromatographie wandern die Analytionen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Detektionszelle. Diese unterschiedliche Verweildauer der Ionen im Detektor muss bei der quantitativen Auswertung der Peakflächen berücksichtigt werden.

### 2.7.1 Direkte UV-Detektion

Die UV-Detektion erfolgt wie bereits erwähnt „on-column“. Hierbei dient das von der Polyimidschicht befreite ca. 5 mm lange Kapillarsegment als UV-Messzelle. Für eine Kapillare mit 50 µm Innendurchmesser ergibt sich somit eine Detektorzelle mit einem Volumen von ca. 10 nL. Die UV-Absorption folgt dem *Lambert-Beerschen* Gesetz.

$$A = \log \frac{I_0}{I_d} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (29)$$

mit: A = Absorption  
 $I_0$  = Intensität des eingestrahnten Lichts  
 $I_d$  = Intensität des durchgehenden Lichts  
 $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient  
c = Konzentration  
d = Schichtdicke

Die geringe Schichtdicke der Detektorzelle wirkt sich natürlich nachteilig auf die Nachweisempfindlichkeit aus. Durch Modifikationen der Zellgeometrie („bubble“-Zelle oder „Z“-Zelle) kann die Empfindlichkeit durch einen verlängerten Lichtweg gesteigert werden [32,33].

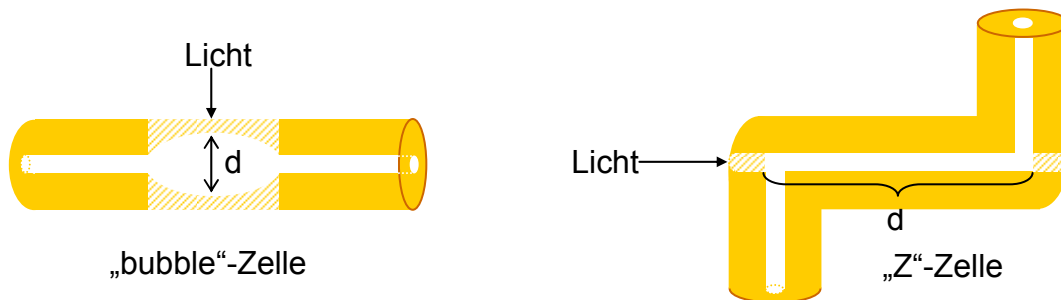


Abb. 8: Schematische Darstellung der Detektorzellen mit vergrößerter Zellgeometrie

### 2.7.2 Indirekte UV-Detektion

Viele Polyelektrolytsysteme, insbesondere solche, die Polyacrylsäure oder Polymethacrylsäure enthalten, weisen eine nur schwache UV-Absorption auf, die mit der direkten UV-Detektion kaum nachzuweisen ist. Durch den Einsatz der indirekten UV-Detektion können jedoch auch solche Polyelektrolyte mit einer hohen Empfindlichkeit detektiert werden [23,34,35]. Hierzu werden dem Puffer stark UV absorbierende Ionen zugegeben, die das gleiche Ladungsvorzeichen tragen wie die Analytione. Diese sogenannten Co-Ionen müssen ähnliche Mobilitäten aufweisen wie die zu untersuchenden Analytione, um „tailing“- oder „fronting“-Effekte zu vermeiden. Aufgrund der erforderlichen Elektroneutralität im Puffersystem kommt es zu einer Verdrängung der Co-Ionen durch die Analytione. Im Detektor macht sich dieser Verdrängungseffekt durch eine Abnahme der Extinktion und somit durch einen negativen Peak bemerkbar.

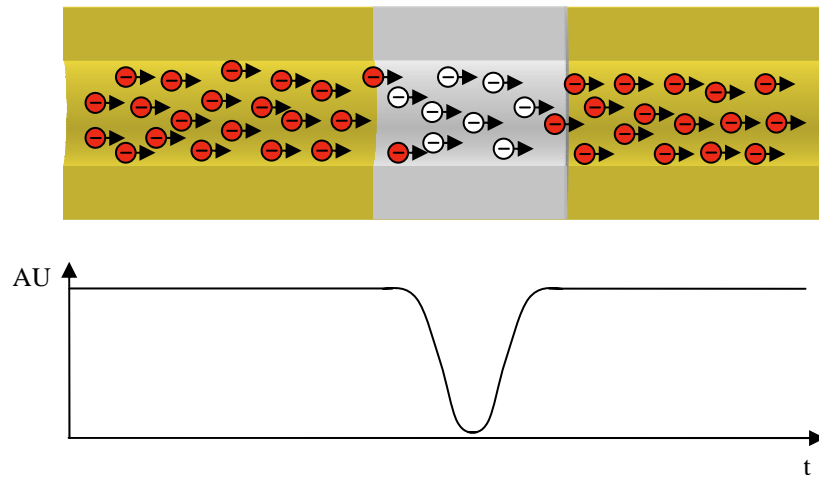


Abb. 9: Schema der Indirekten UV-Detektion [23]

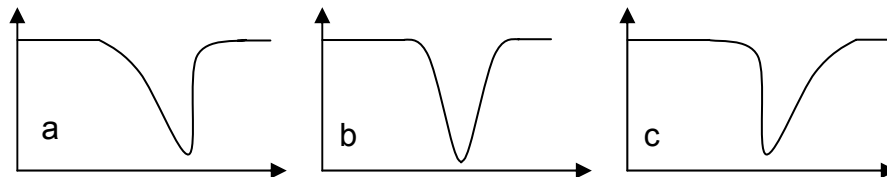


Abb. 10: Peakformen durch Mobilitätsunterschiede

- a:  $\mu_{\text{Co-Ion}} > \mu_{\text{Analyt}}$
- b:  $\mu_{\text{Co-Ion}} = \mu_{\text{Analyt}}$
- c:  $\mu_{\text{Co-Ion}} < \mu_{\text{Analyt}}$

### 2.7.3 Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion

In der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion [36-41] wird die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit  $\kappa$  beim Durchgang der Analytionen durch die Detektorzelle gemessen.

Als Leitwert  $L$  wird der reziproke elektrische Widerstand  $R$  in Lösungen bezeichnet (Gleichung 30).

$$L = \frac{1}{R} \text{ mit } R = \frac{\rho \cdot l}{A} \quad (30)$$

mit:  $\rho$  = spezifischer Widerstand  
 $l$  = Länge der Messzelle  
 $A$  = Fläche der Messzelle

Die Leitfähigkeit  $\kappa$  ist der reziproke Wert des spezifischen Widerstandes  $\rho$ .

Sie ist eine Stoffkonstante, die von der Art und Konzentration der gelösten Ionen, der Temperatur und dem Druck abhängt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit für starke Elektrolyte wird durch das Quadratwurzelgesetz von *Kohlrausch* beschrieben.

$$\Lambda = \Lambda_0 - k\sqrt{c} \quad (31)$$

mit:  $\Lambda_0$  = Grenzleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung  
 $k$  = Boltzmannkonstante  
 $c$  = molare Konzentration

In Abbildung 11 ist das Prinzip der kapazitiv gekoppelten kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion ( $C^4D$ ) [37] dargestellt. Der Detektor besteht aus zwei räumlich von einander getrennten, ringförmigen Elektroden der Länge  $l$ , durch die die Kapillare geführt wird. Anders als bei der „on-column-UV-Detektion“ muß hierbei die Polyimidschicht nicht entfernt werden. So kann der Detektor sehr variabel positioniert werden. Die von einem Oszillator erzeugte Wechselspannung wird über die Oszillatorelektrode durch einen kapazitiven Übergang ins Innere der Kapillare übertragen, durchläuft den Detektionsspalt  $d$  und wird nach einem weiteren kapazitiven Übergang auf die Verstärkerelektrode gleichgerichtet und verstärkt.

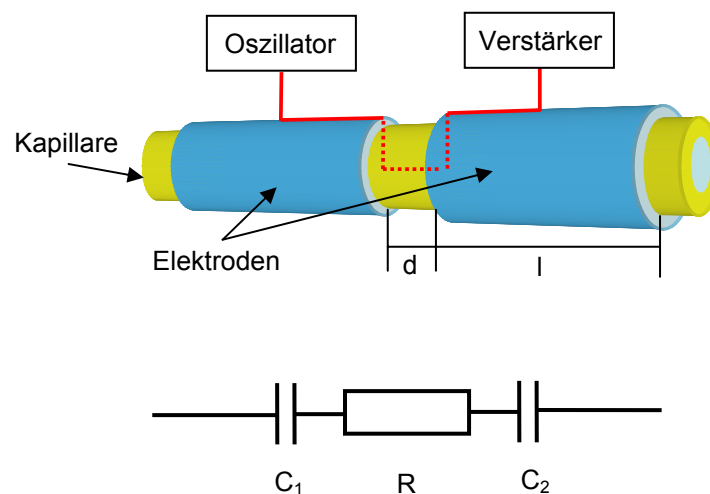


Abb. 11: Schematische Darstellung des  $C^4D$ -Detektors

Die Detektion erfolgt in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit des Elektrolyten entweder im direkten oder im indirekten Modus. Für die direkte Detektion muss der Elektrolyt eine geringere Leitfähigkeit als die zu untersuchenden Analytionen aufweisen. Im indirekten Modus verwendet man hingegen Puffer mit einer sehr hohen Leitfähigkeit (z.B. Borat- oder Phosphat-Puffer).

## **2.8 MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

### **2.8.1 Grundlagen**

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ist eine relativ neue und leistungsfähige Methode in der Polymeranalytik [42-45] zur Charakterisierung von Molmassen, Molmassenverteilungen, Monomereinheiten und Endgruppen. Anders als die herkömmliche Massenspektrometrie (MS) ist die MALDI-MS eine schonende Methode, bei der die Probenmoleküle in der Regel nicht fragmentiert, sondern unzersetzt in die Gasphase überführt und hier durch Anlagerung von Kationen ionisiert werden. Hierbei kommt der Matrix eine essentielle Aufgabe zu. Diese muss das zu untersuchende Polymer verdünnen, indem es ein Cokristallat mit den Probenmolekülen bildet, die Laserenergie absorbieren (meist ein UV-Laser bei 337 nm und einer Pulsdauer von 3-5 ns) und die aufgenommene Energie auf die Polymermoleküle übertragen. Die Detektion erfolgt anschließend in einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS).

### **2.8.2 Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers**

Massenspektrometer bestehen im wesentlichen aus einer Schleuse für den Probeneinlass, einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Den schematischen Aufbau eines MALDI-Massenspektrometers zeigt Abb. 12. Bei MALDI-Massenspektrometern wird Laserlicht über Spiegel und eine Fokussierungseinheit auf die Probenoberfläche gelenkt, wodurch die Probenmoleküle desorbiert und ionisiert werden. Nach der Ionisierung werden die Ionen durch Anlegen eines elektrischen Feldes beschleunigt und in den Flugzeitanalysator gelenkt. Nach dem Durchlaufen der Beschleunigungs-

strecke (1) besitzen Moleküle gleicher Ladung die gleiche kinetische Energie, welche durch die angelegte Beschleunigungsspannung gegeben ist. Die Geschwindigkeit  $v$ , mit der die Ionen die Driftstrecke (2) bis zum Detektor zurücklegen, ist hierbei abhängig von der Ionenmasse  $m$  (Gl. 32).

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 \quad (32)$$

Die Flugzeit  $T$  bis zum Detektor berechnet sich nach (Gl. 33):

$$T = s \cdot \sqrt{\frac{m}{2 \cdot z \cdot U}} \quad (33)$$

mit s: Flugstrecke  
 m: Molmasse  
 z: Ladungszahl  
 U: Beschleunigungsspannung

Nach der Driftstrecke, die durch ein Pumpensystem ständig unter Hochvakuum gehalten wird, treffen die Ionen auf den Detektor. Aus der Flugzeit kann nun das Masse-Ladungsverhältnis  $m/z$  ermittelt werden. Die Massenkalisierung der Flugzeitachse erfolgt mit Eichstandards.

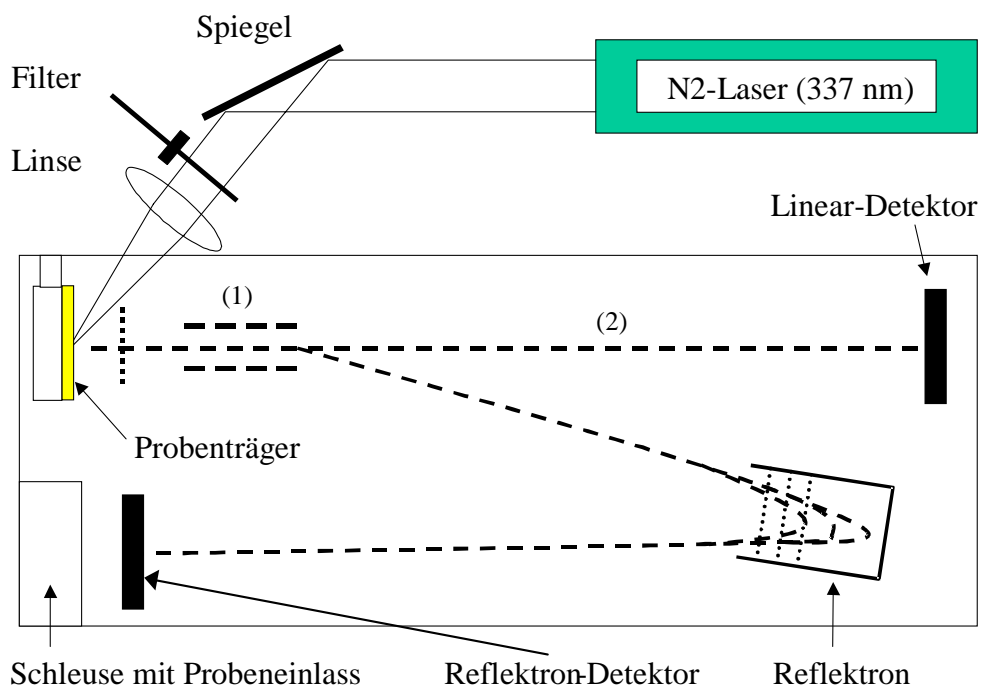


Abb. 12: Schematischer Aufbau eines MALDI-Massenspektrometers

In kommerziellen MALDI-TOF-Massenspektrometern werden Beschleunigungsspannungen von 20-30 kV verwendet. Bei der Desorption von Ionen mit gleichem Masse-Ladungsverhältnis tritt häufig eine Flugzeitverteilung auf. Dies rührt daher, dass die Ionen eine Ortsverteilung, eine unterschiedliche Desorptionszeit sowie eine unterschiedliche Ionisierungszeit aufweisen können. Durch verzögerte Ionenextraktion werden diese Effekte teilweise wieder ausgeglichen, was zu einer deutlich verbesserten Auflösung führt. Die verzögerte Ionenextraktion wird durch eine zeitliche Verzögerung zwischen dem Laserimpuls und dem Einschalten der Beschleunigungsspannung erreicht. Durch diese Verzögerung driften Ionen mit einer höheren Anfangsgeschwindigkeit tiefer in die Beschleunigungszone und werden nach Einschalten des Feldes entsprechend geringer beschleunigt. Die am Anfang langsameren Ionen werden nun dem Beschleunigungsfeld länger ausgesetzt, so dass im Idealfall die zu Beginn der Desorption aufgetretenen Verteilungen aufgehoben werden und alle Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis gleichzeitig detektiert werden [46].

Die Detektion erfolgt entweder nach Zurücklegen einer linearen Flugstrecke im Lineardetektor oder nach Umlenkung der Flugbahn im Reflektron-Detektor. In einem Reflektron werden die Ionen durch ein elektrisches Feld gebremst und umgelenkt. Ionen mit einer höheren kinetischen Energie dringen tiefer in den Reflektron ein und durchlaufen somit eine längere Wegstrecke. Durch geeignete Einstellungen können unterschiedliche Geschwindigkeiten bei Ionen mit gleichem  $m/z$ -Verhältnis ebenfalls ausgeglichen werden. Somit dient der Reflektron-Modus wie auch die verzögerte Ionenextraktion zur Verbesserung der Signalauflösung. Für die Detektion werden in der Regel Sekundärionenvervielfacher eingesetzt.

## 2.9 Polyelektrolyte

Polyelektrolyte sind Polymere die eine große Anzahl ionisierbarer Gruppen tragen. Für den Fall, dass jede Monomereinheit eine Ladung  $e$  trägt, spricht man von einem Makroion. In geeigneten Lösungsmitteln (i.a. Wasser) dissoziieren diese in hochgeladene Polyionen und eine entsprechende Anzahl niedermolekularer Gegenionen. Das hierbei auftretende elektrostatische Potential ist eine der Hauptursachen für das abweichende Verhalten der Polyelektrolyte von dem neutraler Polymere in Lösung.

### 2.9.1 Polyelektrolyte in Lösung

Die Konformation der Polyelektrolytketten in Lösung wird, im Vergleich zur Konformation neutraler Makromoleküle, maßgeblich durch die zusätzlich auftretende langreichweitige *Coulomb*-Wechselwirkung entlang und zwischen den einzelnen Ketten beeinflusst. Der Einfluss der lokalen Ionen („Salzabhängigkeit“) ist ebenfalls von Bedeutung für das Konformationsverhalten von Polyelektrolyten in Lösung.

Zur Beschreibung dieses Verhaltens kann das von *Skolnick, Fixman* [47] und *Odijk* [48,49] entwickelte sogenannte „*wormlike chain*“-Modell herangezogen werden. Ein zentraler Parameter dieses Modells ist die elektrostatische Persistenzlänge  $P_{el}$ , die den Beitrag der *Coulomb*-Wechselwirkungen zur Persistenzlänge beschreibt. Die Persistenzlänge  $P$  ist ein Maß für die Kettenflexibilität und gibt die Länge an, nach der innerhalb einer Kette die Richtungskorrelation bezüglich der ersten Einheit abgeklungen ist. Die Persistenzlänge für Polyelektrolyte ist größer als die Persistenzlänge analoger neutraler Polymere, da die elektrostatischen Wechselwirkungen einem Verbiegen der Kette entgegenwirken. Sie setzt sich aus zwei Komponenten, der intrinsischen  $P_0$  für die neutrale Kette und der elektrostatischen  $P_{el}$  zusammen.

$$P = P_0 \cdot P_{el} \quad (34)$$

mit:  $P$  = Persistenzlänge  
 $P_0$  = Intrinsische Persistenzlänge  
 $P_{el}$  = Elektrostatische Persistenzlänge

Die elektrostatische Persistenzlänge  $P_{el}$  kann wie folgt beschrieben werden:

$$P_{el} = \frac{l_b}{4 \cdot \kappa^2 \cdot d^2 \cdot f^2} \quad (35)$$

mit:  $l_b$  = Bjerrum-Länge  
 $\kappa$  = Abschirmkonstante  
 $d$  = Abstand zweier Ladungen auf der Kette  
 $f$  = Faktor, der die effektive Ladung der Kette berücksichtigt

Für den Faktor  $f$  gilt nach *Manning*:  $f=1$  für  $d > l_b$  und  $f=l_b/d$  für  $d < l_b$  [50]. Aus der Gleichung für die Abschirmkonstante  $\kappa$  ergibt sich, dass die Persistenzlänge und damit auch die Kettenkonformation durch die Ionenstärke bzw. die Salzkonzentration in der Lösung bestimmt werden.

$$\kappa = \sqrt{\frac{2 \cdot N_A \cdot e_0^2 \cdot I}{\epsilon_r \cdot \epsilon_0 \cdot kT}} \quad (36)$$

mit:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 \cdot c_i \quad (37)$$

mit:  $\kappa$  = Abschirmkonstante  
 $e_0$  = Elementarladung  
 $I$  = Ionenstärke  
 $N_A$  = Avogadrokonstante  
 $\epsilon_r$  = relative Dielektrizitätskonstante  
 $\epsilon_0$  = absolute Dielektrizitätskonstante  
 $k$  = Boltzmannkonstante  
 $T$  = absolute Temperatur  
 $z_i$  = Ladungszahl der Ionenart  $i$   
 $c_i$  = Konzentration der Ionenart  $i$

Aus Gleichung 36 und 37 wird ersichtlich, dass für abnehmende Ionenstärken die elektrostatische Abstoßung zwischen den einzelnen Ladungen auf der Polyelektrolytkette zunimmt. Dies führt zu einer Zunahme der Persistenzlänge, was wiederum zu einer stärker gestreckten Konformation des Polyions führt. Durch Zugabe eines niedermolekularen Salzes zur Polyelektrolytlösung kann die Konformation des Polyions von der gestreckten in die Knäuelform überführt werden. Diesen Effekt nutzt man bei elektrophoretischen Messungen durch Variation der Pufferkonzentration gezielt aus.

## 2.9.2 Gegenionenkondensation

In wässriger Lösung dissoziiert ein Polyelektrolyt in ein mehrfach geladenes Polyion und die äquivalente Zahl an niedermolekularen Gegenionen. Wie in Abb. 13 dargestellt sind die Gegenionen entweder „frei“ in Lösung oder an das Polyion „kondensiert“ bzw. gebunden.

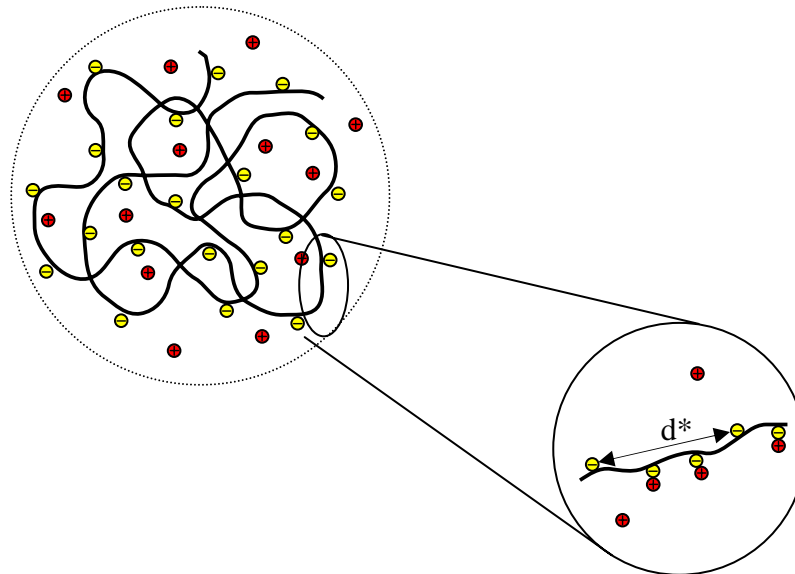


Abb. 13: Gegenionenkondensation an einem Polyelektrolyten in Lösung [51].  
 $d^*$  ist der kritische Ladungsabstand nach *Manning*

Unter der Annahme eines Stäbchenmodells berechnete *Manning* [50,52,53] mit Hilfe des *Debye-Hückel*-Potentials den kritischen Ladungsabstand  $d^*$ . Dieser Parameter bezeichnet den Mindestabstand zweier dissoziierter ionischer Gruppen im Polyion. Wird dieser Wert unterschritten kommt es zur Gegenionenkondensation, bis der Wert  $d^*$  erreicht ist. Für einwertige Gegenionen ist  $d^*$  gleich der *Bjerrum*-Länge  $l_b$ . Die *Bjerrum*-Länge ist der Abstand zweier nicht abgeschirmter Elementarladungen, bei der die *Coulomb*-Wechselwirkung gleich der Wärmebewegung  $kT$  ist. Die *Bjerrum*-Länge ist eine Funktion der Temperatur und der Dielektrizitätskonstante. Sie beträgt in Wasser bei 20°C 0,7 nm (Gleichung 38).

$$l_b = \frac{e_0^2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot kT} \quad (38)$$

mit:  $\epsilon_r$  = Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels  
 $\epsilon_0$  = absolute Dielektrizitätskonstante  
 $e_0$  = Elementarladung  
 $k$  = Boltzmannkonstante  
 $T$  = absolute Temperatur

Die dimensionslose Ladungsdichte  $\xi$  ist der Quotient aus *Bjerrum*-Länge und Ladungsabstand (Gleichung 39). Sie erreicht nach *Manning* den maximalen Wert 1. Für  $\xi > 1$  erfolgt Gegenionen Kondensation bis der Maximalwert 1 erreicht ist [50].

$$\xi = \frac{l_b}{d} \quad (39)$$

mit:  $\xi$  = Ladungsdichte  
 $l_b$  = Bjerrum-Länge  
 $d$  = Ladungsabstand auf der Kette

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Oligomerentrennung von Natriumpolystyrolsulfonat durch CE mit MALDI-TOF-MS-Detektion

Die CE ist eine sehr empfindliche und schnelle analytische Methode. Sie eignet sich hervorragend zur Oligomerentrennung synthetischer Polyelektrolyte. *Cottet* zeigte, dass es möglich ist, ein niedermolekulares Natriumpolystyrolsulfonat mit einer mittleren Molmasse von 1100 g/mol in einzelne Oligomere aufzuspalten [54]. In einer Arbeit von *Pasch* und *Hiller* [55] konnte gezeigt werden, dass neutrales Oligostyrol durch geeignete HPLC-Bedingungen ebenfalls in die einzelnen Oligomere aufgetrennt werden kann. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Experiment zeigte weiterhin die zu erwartenden isomeren Strukturen der einzelnen Oligomere. Für das Dimere wurden 2 Isomere, für das Trimere 4 Isomere und für das Tetramere 8 Isomere identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, ob es durch optimierte elektrophoretische Bedingungen auch für das PSS möglich ist, neben den Oligomeren auch die isomeren Verbindungen aufzutrennen. Mit diesen Untersuchungen sollten die Grenzen der CE aufgezeigt werden.

Für die in Abb. 14 dargestellte Auftrennung einer Natriumpolystyrolsulfonat-Probe kam ein vergleichsweise hochkonzentrierter Natriumborat-Puffer mit einer Konzentration von 160 mM und einem pH-Wert von 9 zum Einsatz. Üblicherweise werden in den meisten veröffentlichten CE-Anwendungen Pufferkonzentrationen von 5 bis 100 mM verwendet. Die Geschwindigkeit des sich unter diesen experimentellen Bedingungen ausbildenden EOF wird direkt durch die Pufferkonzentration beeinflusst. Mit zunehmender Pufferkonzentration nimmt die EOF-Geschwindigkeit ab. Dies führt zu einer scheinbaren Verlangsamung der Anionen. Es kommt zu einer verlängerten Verweilzeit der Anionen in der Kapillare und damit zu einer verbesserten Auftrennung. Man muss jedoch beachten, dass mit zunehmender Pufferkonzentration auch die auftretende Stromstärke zunimmt. Dies führt zu einer Erwärmung des Systems („Joule-Heating“), die sich nachteilig auf die Trenneffizienz auswirken kann.

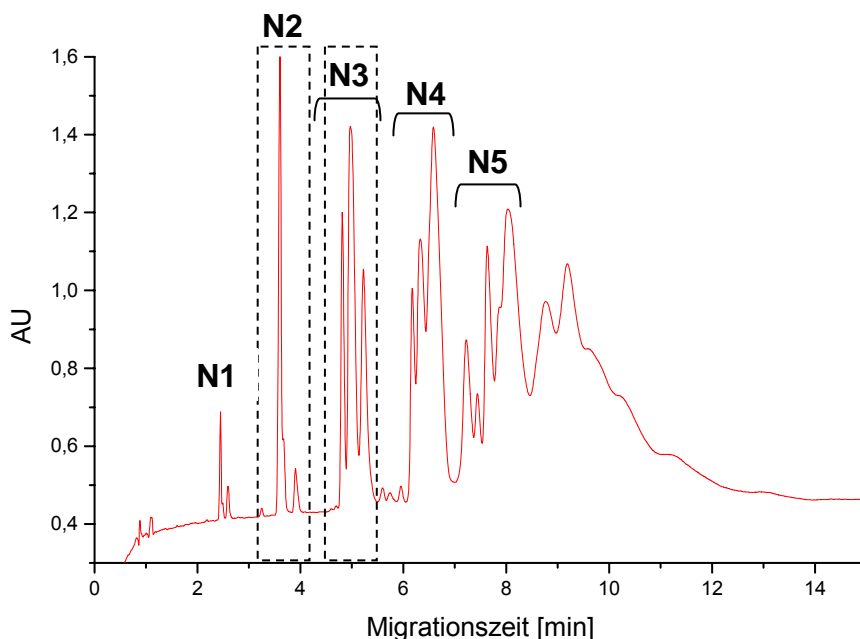


Abb. 14: Elektropherogramm von PSS1.1k  
Kapillare: 32 cm L x 50  $\mu$ m ID, unbeschichtet  
Puffer: 160 mM Natriumborat  
U: 15kV; Inj: 3s x 0,5psi; T: 23°C; UV: 200nm

In dem in Abb. 14 gezeigten Elektropherogramm des Natriumpolystyrolsulfonat-Standards (PSS1.1k) sind die Oligomerenpeaks N1 – N5 deutlich zu erkennen. Bei genauerer Betrachtung weisen die Oligomerenpeaks Substrukturen auf, die mit zunehmendem Polymerisationsgrad immer komplexer werden. Diese Substrukturen können verschiedene Ursachen haben. So können unterschiedliche Sulfonierungsgrade, verschiedene Isomere oder auch unterschiedliche Ladungsdichten, hervorgerufen durch unvollständige Dissoziation der Sulfonat-Gruppen, für das Auftreten der Substrukturen verantwortlich sein. Mit den zur Verfügung stehenden UV- und Leitfähigkeitsdetektoren ist es nicht möglich, Art und Ursache der Substrukturen aufzuklären. Das Problem, das sich bei der Auswertung eines solchen Elektropherogramms ergibt, ist die genaue Zuordnung der erhaltenen Peaks zu entsprechenden Strukturinformationen.

In der Analytik kleiner anorganischer oder organischer Moleküle erfolgt die Identifizierung der Peaks anhand der individuellen Migrationszeiten. Da für solche Analysen das exakte Verhältnis von Ladung-zu-Radius im

Allgemein bekannt ist, können die Peaks im Elektropherogramm eindeutig zugewiesen werden. Diese Bestimmung ist für synthetische Polyelektrolyte jedoch nur bedingt möglich. Synthetische Polyelektrolyte weisen neben einer Molmassenverteilung im ungünstigsten Fall auch eine Verteilung der Ladungsdichte auf. So ist es durchaus denkbar, dass die Peakaufspaltung in Abb. 11 durch unterschiedliche Ladungsdichten ein und desselben Molekulargewichts hervorgerufen wird. Im Falle eines wohl definierten Standards ist die Zuordnung relativ einfach. Schwierig wird es jedoch bei der Identifizierung von industriellen Proben oder noch nicht vollständig charakterisierten Substanzen.

Um sowohl die Oligomere der Natriumpolystyrolsulfonat-Probe exakt zuordnen sowie die Natur der Substrukturen erklären zu können, bot sich die Kopplung der CE und der MALDI-TOF-MS an. Im Falle des in Abb. 14 dargestellten Polystyrolsulfonats wurden die Peaks N2 und N3 fraktioniert und anschließend einer MALDI-TOF-Analyse unterzogen. Ebenfalls wurde zum Vergleich die Gesamtprobe mit MALDI-TOF untersucht. Um eine für die MALDI-TOF-Analyse ausreichende Probenmenge zu erhalten, wurden die Peaks N2 und N3 jeweils 10 mal fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit einem Überschuss an Matrix vermischt, auf den Probenträger aufgetragen, getrocknet und über eine Vakuumschleuse in das Massenspektrometer überführt. Die Detektion erfolgte im Linear-Modus bei negativer Polarisierung. Als Matrix wurde eine Lösung von 5 mg Harmin ( $C_{13}H_{12}N_2O$ ) in 1 ml THF verwendet.

In Abb. 15 sind die drei Massenspektren dargestellt. Spektrum 1 zeigt das Massenspektrum der Gesamtprobe. Neben den Massenpeaks für Matrixfragmente bei 486 Da und im Bereich von 800 – 900 Da zeigt das Spektrum eine Peakserie mit Masseninkrementen von jeweils 184 Da. Dieses Masseninkrement entspricht der Styrolsulfonsäure-Wiederholungseinheit. Die Endgruppen wurden zu Massen von 57 Da (n-Butylgruppe) und 1 Da (Wasserstoffatom) bestimmt. So kann der Peak mit der Masse von 425 Da eindeutig dem Dimeren, der Massenpeak bei 610 Da dem Trimeren zugeordnet werden.

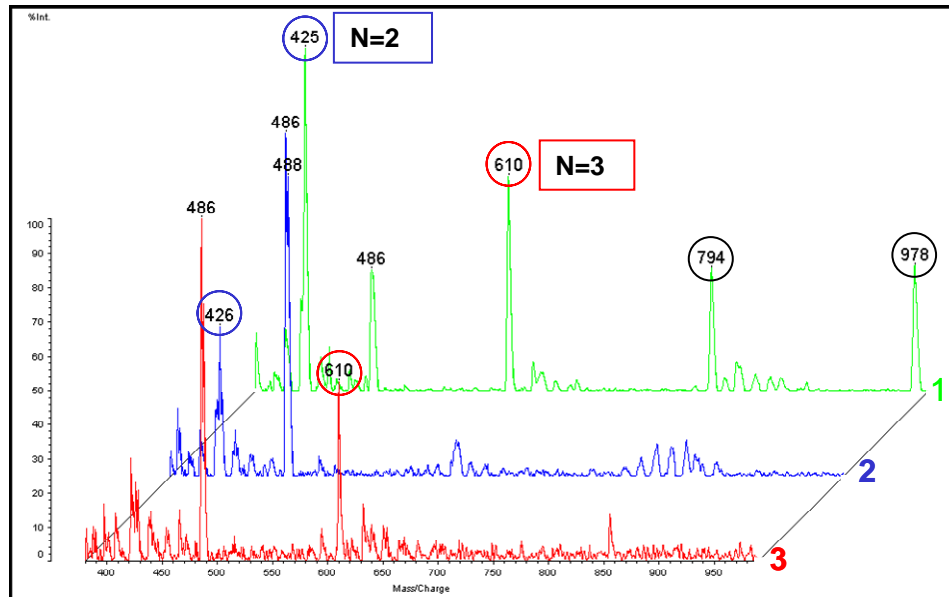


Abb. 15: Massenspektren der Gesamtprobe (Spektrum 1), der Fraktion N2 (Spektrum 2) und Fraktion N3 (Spektrum 3)

In Abb. 16 sind die möglichen Isomere für das Dimere und das Trimere gezeigt. Spektrum 2 zeigt die Fraktion N2. Neben den wiederum auftretenden Matrixpeaks ist nur ein einziger Peak mit der Masse von 425 Da zu erkennen. In Spektrum 3 ist ebenfalls nur ein Peak mit der Masse von 610 Da zu erkennen. Aus der MALDI-TOF-Analyse lassen sich nun die beiden Fraktionen eindeutig identifizieren. Fraktion N2 enthält das Dimere mit der Masse von 425 Da während Fraktion N3 nur das Trimere mit der Masse von 610 Da aufweist.

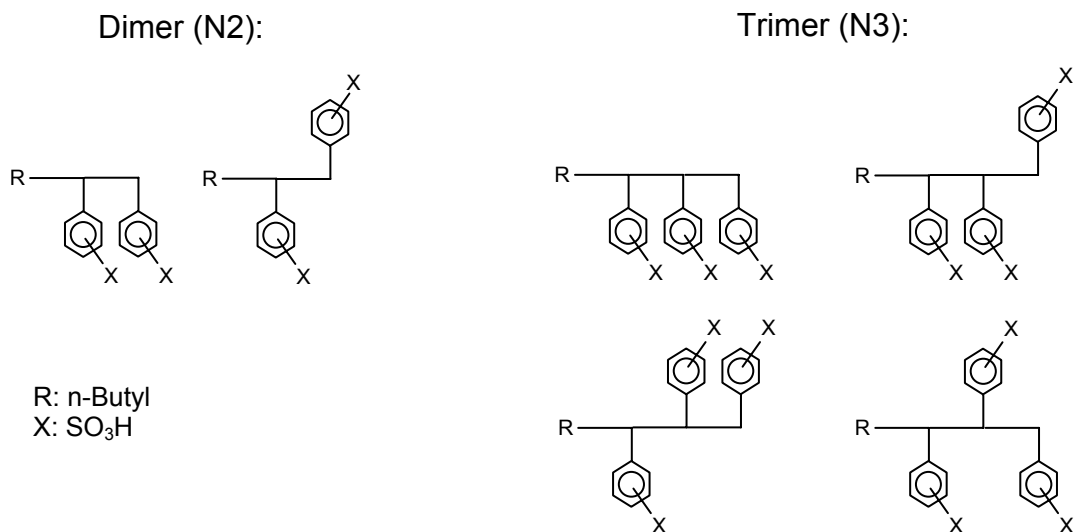


Abb. 16: Schematische Darstellung der isomeren Strukturen für die Oligomere N2 und N3

Die in Abb. 14 auftretenden Substrukturen der Oligomerenpeaks können verschiedene Ursachen haben. Auch zur Klärung dieser Frage konnte die MALDI-TOF-MS beitragen. Da die Trennung in der CE nach dem Verhältnis von Ladung-zu-Radius erfolgt, ist es denkbar, dass die Substrukturen durch Konformationsisomere verursacht werden. Ebenfalls kann eine unterschiedliche Anzahl an Sulfonatgruppen zu dieser Feinaufspaltung führen. Des Weiteren können auch unterschiedliche Dissoziationsgrade der Sulfonatgruppen und damit unterschiedliche Ladungsdichten diese Aufspaltung hervorrufen. Für den Fall, dass die Substruktur durch eine unterschiedliche Anzahl an Sulfonatgruppen verursacht würde, müsste man im Massenspektrum Satellitenpeaks mit einer um +/- 80 Da verschobenen Masse finden. Diese konnten jedoch weder für das Dimere noch für das Trimere beobachtet werden. Somit kann dieser Fall ausgeschlossen werden. Da der Puffer einen pH-Wert von 9 hat, kann davon ausgegangen werden, dass die Dissoziation der Sulfonatgruppen nahezu vollständig ist. Somit bleiben als Erklärung nur die isomeren Strukturen übrig, die zu dieser Aufspaltung führen. Da Isomere mit MALDI-TOF-MS nicht nachgewiesen werden können, ist dies jedoch nur ein indirekter Beweis.

### **3.1.1 Verbesserte Isomerentrennung durch Verwendung hochkonzentrierter Natriumboratpuffer**

In Abb. 14 wurde gezeigt, dass die Oligomere des Polystyrolsulfonats bei der CE-Trennung in Isomere aufspalten. Ziel der folgenden Untersuchung ist es, diese Isomerentrennung zu optimieren. In der Abb. 17 sind die Elektropherogramme für verschiedene Pufferkonzentrationen dargestellt. Die Natriumborat-Puffer werden aus Di-Natrium-Tetraborat hergestellt. Es werden Puffer mit Konzentrationen von 160 mM, 240 mM und 320 mM und pH-Werten von jeweils 9 eingesetzt. Um die bei diesen hohen Pufferkonzentrationen zu erwartenden hohen Ströme besser handhaben zu können, werden die Trennungen in einer Kapillare mit geringem Innendurchmesser durchgeführt. Es wird eine 37 cm lange Quarzglas-kapillare mit einem Innendurchmesser von 25  $\mu\text{m}$  verwendet. Die

auftretenden Stromstärken liegen im Bereich von ca. 10 bis 25  $\mu\text{A}$ . Durch eine effektive Kühlung der Kapillare kann die bei diesen Stromstärken auftretende Erwärmung des Puffersystems vernachlässigt werden.

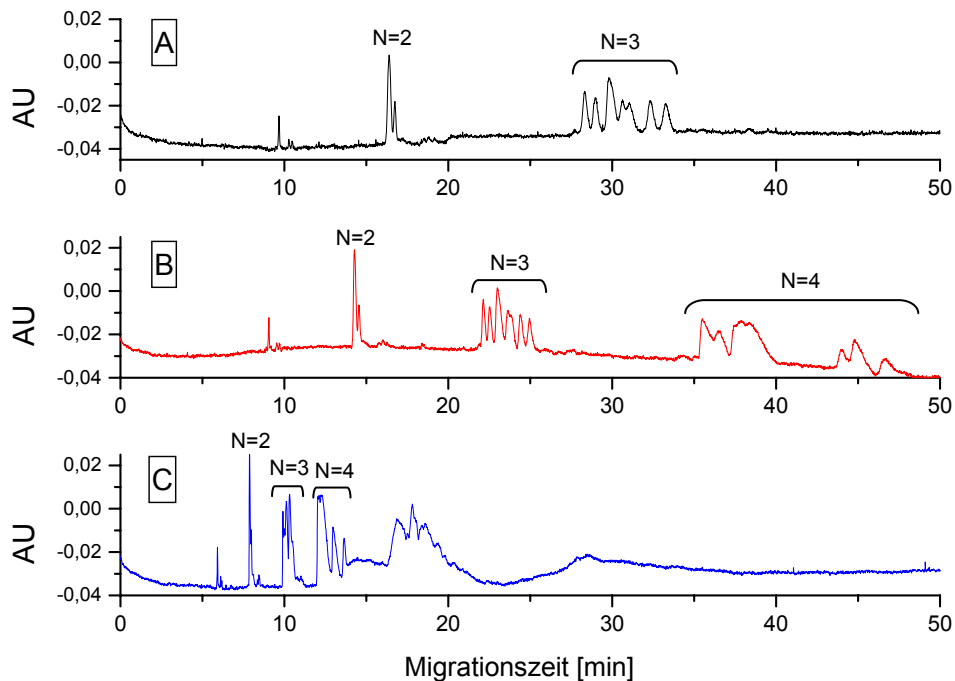


Abb. 17: Elektropherogramme bei unterschiedlichen Pufferkonzentrationen  
 A: 320 mM Natriumborat; B: 240 mM Natriumborat; C: 160 mM Natriumborat  
 Kapillare: 37 cm x 25 $\mu\text{m}$  I.D.; unbeschichtet  
 U: 15kV; Inj: 15s x 0,5 psi; T: 23°C; UV: 200nm

In Abb. 17 ist der Einfluss der Pufferkonzentration auf die Qualität der Trennung zu sehen. Betrachtet man das Peakmuster des Trimeren (N=3) erkennt man, dass mit zunehmender Pufferkonzentration die Anzahl an sichtbaren Isomerenpeaks zunimmt. Für den 320 mM Natriumboratpuffer erhält man 7 Peaks die teilweise basisliniengetrennt sind. Ebenfalls ist der Einfluss auf die Geschwindigkeit des EOF und damit auch auf die benötigte Trennzeit deutlich zu sehen. Während bei einer Pufferkonzentration von 160 mM (Kurve C) die gesamte Probe innerhalb 50 min getrennt und detektiert wird, kann für den hochkonzentrierten Natriumboratpuffer (Kurve A) im selben Zeitraum nur noch bis zum Trimeren detektiert werden. Bei der Verwendung eines hier nicht gezeigten Natriumboratpuffers mit einer Konzentration von 400 mM wird die Trenndauer so groß, dass in adäquater Zeit nur noch das Monomere detektiert werden kann. Da durch die

Verringerung der Geschwindigkeit des EOF auch die effektiven Mobilitäten der Analytionen verringert werden, kommt es für die höheren Oligomere zu so starken Peakverbreiterungen, dass die Peaksignale im Basislinienrauschen verschwinden.

In Abb. 18 ist die Aufspaltung für das Trimere vergrößert dargestellt. Kurve A zeigt die Aufspaltung für die Pufferkonzentration von 320 mM. Kurve B zeigt das Peakmuster für die Pufferkonzentration von 240 mM.

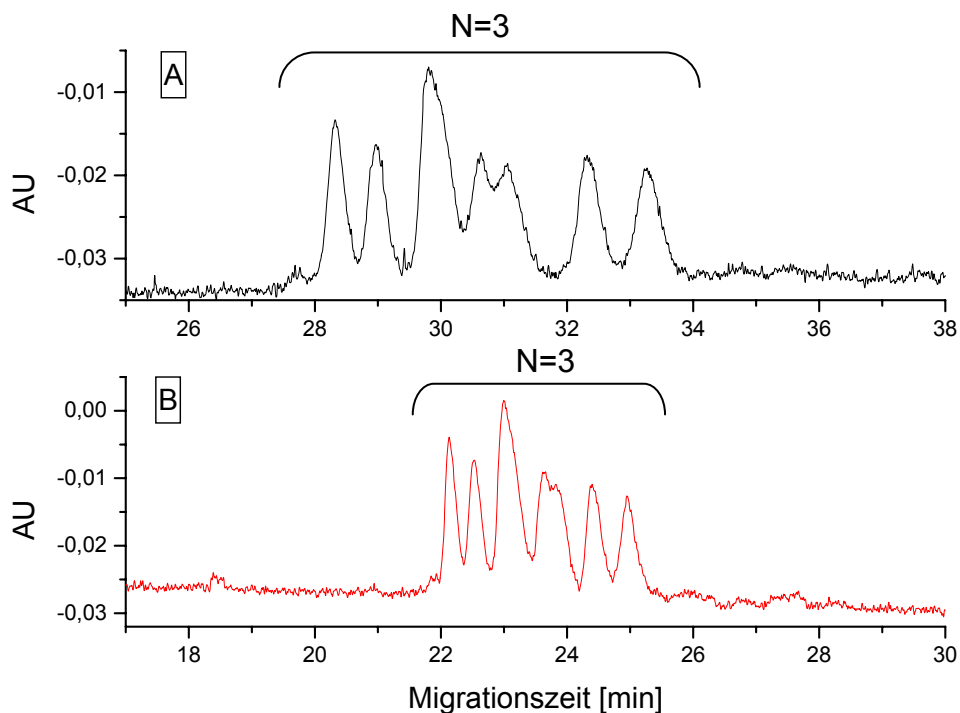


Abb. 18: Feinaufspaltung des Trimeren von PSS1.1k für verschiedene Pufferkonzentrationen  
 A: 320 mM Natriumborat; B: 240 mM Natriumborat

In Kurve A (Abb. 18) ist die Aufspaltung des Trimeren in 7 Peaks deutlich zu erkennen. Im Vergleich zur Trennung mit herkömmlichen Pufferkonzentrationen von ca. 10 mM bis maximal 100 mM (Abb. 14) kann die Auftrennung bei Verwendung von hochkonzentrierten Puffern signifikant verbessert werden. Bei näherer Betrachtung dieses Ergebnisses stellt sich die Frage, wodurch die Feinaufspaltung in 7 diskrete Peaks verursacht wird. Wie oben erwähnt, konnten Pasch und Hiller für das Trimere eines Oligostyrols im  $^1\text{H-NMR}$  vier

verschiedenen Konformationsisomere nachweisen. Die zusätzliche Zahl an Peaks, die in der CE erreicht wird, lässt darauf schließen, dass zusätzlich zu den Konformationsisomeren unterschiedliche Substitutionen der Sulfonat-Gruppen an den Aromaten zu dieser Feinaufspaltung führen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden eine  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung und ein DEPT-Experiment der Gesamtprobe vorgenommen. Bei der DEPT-Messung handelt es sich um ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experiment, bei dem durch eine entsprechende Pulssequenz nur  $\text{CH}$ -,  $\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen angeregt werden. Alle Signale der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messung, die durch quarternäre C-Atome hervorgerufen werden, sind im DEPT-Spektrum nicht vorhanden. In Abb. 19 ist das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum (A) und das DEPT-Spektrum (B) dargestellt.

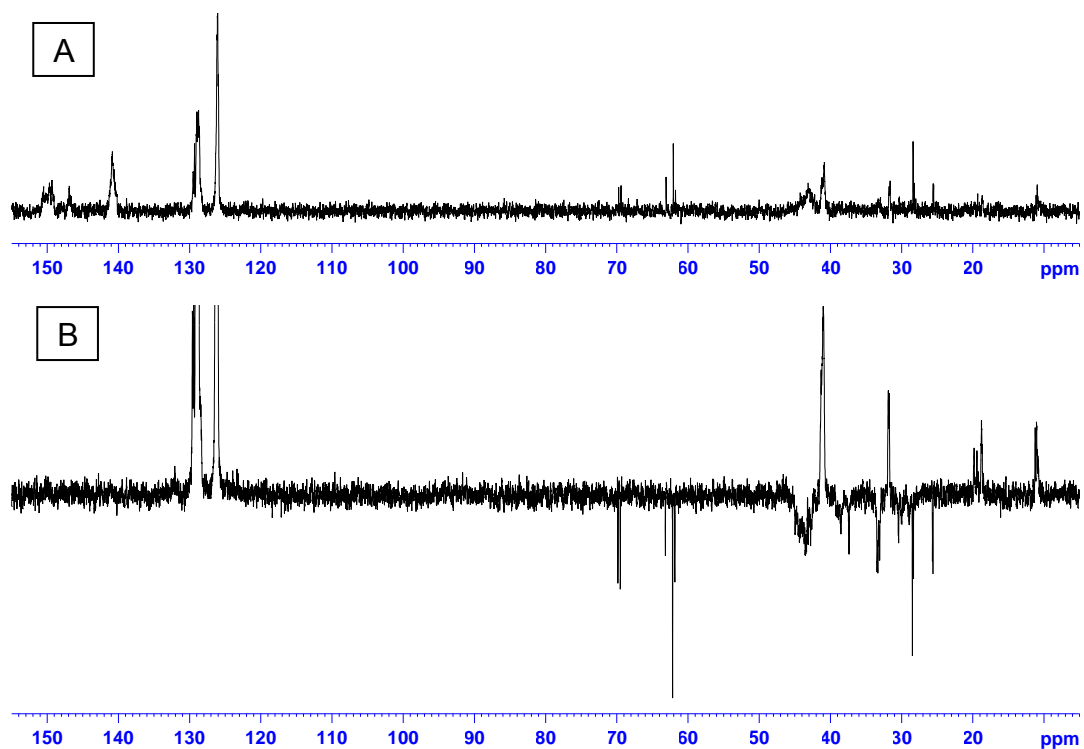


Abb. 19:  $^{13}\text{C}$ -NMR (A) und DEPT (B) von Polystyrolsulfonat PSS1.1k

Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum erkennt man 5 Signale im Bereich der Aromatenresonanz zwischen 125 und 152 ppm. Die Signale bei 126 und 129 ppm werden durch die aromatischen  $\text{CH}$ -Gruppen erzeugt. Die drei Signale bei 141-, 147- und 150 ppm verschwinden im DEPT-Spektrum (B) und können deshalb den quarternären Ring-C-Atomen zugeordnet werden. Um die beobachteten

Signale den verschiedenen Substitutionen zuordnen zu können, wurden mit Hilfe des ACD/Labs 8.0-Programms der Firma Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Kanada die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren für die para-, meta- und ortho-Substitutionen berechnet. In Abb. 20 sind die berechneten chemischen Verschiebungen für die verschiedenen Substitutionen dargestellt.

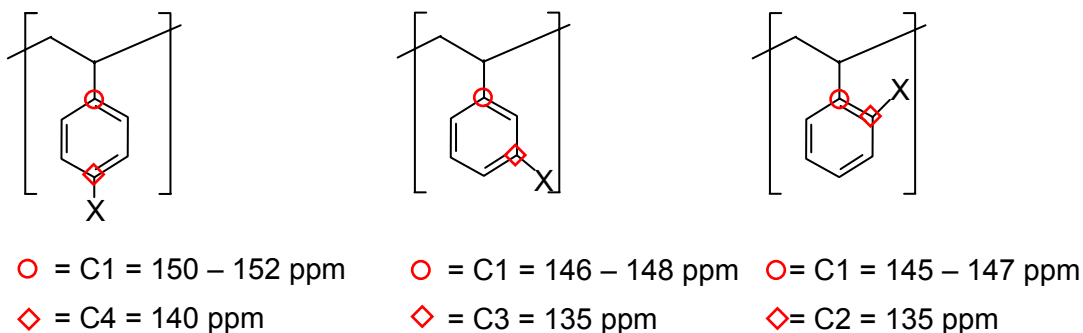


Abb. 20: Berechnete chemische Verschiebungen der quaternären C-Atome für die unterschiedlichen Substitutionen

Die Signale bei 141 ppm (C4) und 152 ppm (C1) in Abb. 19, Spektrum A, können der Struktur mit der para-Position der Sulfonatgruppe zugewiesen werden. Das Signal bei 147 ppm kann sowohl der C1-Position der meta- als auch der ortho-Position zugewiesen werden. Eine weitere Unterscheidung zwischen der meta- und der ortho-Substitution ist hier nicht möglich. Das NMR-Experiment konnte jedoch zeigen, dass es neben der para-Substitution noch weitere Substitutionen in der vorliegenden Polystyrolsulfonat-Probe gibt. Der Nachweis der unterschiedlichen Substitutionen kann als Erklärung für die in der CE erreichte Feinaufspaltung des Trimeren in sieben diskrete Peaks herangezogen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, unterschiedliche Isomere und unterschiedliche Substitutionen der Sulfonatgruppen an den Aromaten mit der CE zu trennen und nachzuweisen.

### 3.1.2 Optimierte Trennung durch Einsatz organischer EOF-Modifizier

*Schwer* und *Kenndler* haben gezeigt, dass durch Zugabe niedermolekularer Alkohole und Acetonitril als sogenannte organische Modifizier zum Puffersystem die Auflösung elektrophoretischer Trennungen verbessert werden kann [56]. Ursächlich hierfür ist eine Verringerung der EOF-Geschwindigkeit aufgrund der Änderungen der Dielektrizitätskonstante, der Viskosität und des Zeta-Potentials des Puffersystems. Durch die Verringerung der EOF-Geschwindigkeit kommt es zu einer verlängerten Verweilzeit der Analytione in der Kapillare, die zu einer verbesserten Auftrennung führt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch Zugabe organischer Modifizier zum Puffersystem die Auftrennung synthetischer Polyelektrolyte ebenfalls verbessert werden kann. Hierzu wurde der Einfluss des verwendeten Modifiers auf die Trennung der Oligomere für Natriumpolystyrolsulfonat untersucht. Für die folgenden Untersuchungen wurden Natriumboratpuffer mit Konzentrationen von 80, 160, 240 und 320 mM und pH-Werten von 9 verwendet. Diesen wurden jeweils 10 Volumenprozent (% v/v) eines organischen Modifiers zugesetzt. Zur Überprüfung der Trenneffizienz wurde ein Natriumpolystyrolsulfonat-Standard mit einem mittleren Molekulargewicht von 1100 g/mol (PSS1.1k) als Probensubstanz eingesetzt. Die Trennungen wurden in einer unbeschichteten Quarzglas-kapillare mit einer Gesamtlänge von 27 cm und einem Innendurchmesser von 25 µm bei einer Spannung von 10 kV durchgeführt. Als Modifizier kamen Ethanol (EtOH), Isopropanol (Iso) und Acetonitril (ACN) zum Einsatz. Die Modifizier müssen eine gute Mischbarkeit mit dem wässrigen Puffer aufweisen. Ebenfalls muss bei höheren Modifizierkonzentrationen im Puffergemisch eine ausreichende Löslichkeit des Natriumborats gegeben sein. Desweiteren sollten die Modifizier im gewählten Detektionsbereich von 200 nm eine ausreichende UV-Transparenz aufweisen. Um die durch die Zugabe der Modifizier auftretende Verdünnung auszugleichen, wurde den Pufferstamm-lösungen zur Vergleichsmessung ebenfalls 10 % v/v Wasser als „inert“ Modifizier zugesetzt.

In den Abbildungen 21 - 24 sind die Elektropherogramme der Probe PSS1.1k in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration und der Art des

Modifiers dargestellt. Man erkennt, dass die Auftrennung der Oligomere bei allen Pufferkonzentrationen vom reinen Puffer über Acetonitril, Isopropanol hin zu Ethanol deutlich zunimmt. Parallel hierzu nimmt jedoch auch die Trennzeit zu. So ist im Falle des 80 mM Natriumboratpuffers eine Verdopplung der Trennzeit zwischen der schnellsten Trennung für den reinen Puffer und der langsamsten, aber auch besten, Trennung für Ethanol zu erkennen. Diese Effekte sind für alle Pufferkonzentrationen zu beobachten. Für den höchst konzentrierten Puffer (320mM) ist die Trennung so langsam, dass in der vorgegebenen experimentellen Zeit von 50 Minuten nur noch die Oligomere N1 und N2 detektiert werden können.

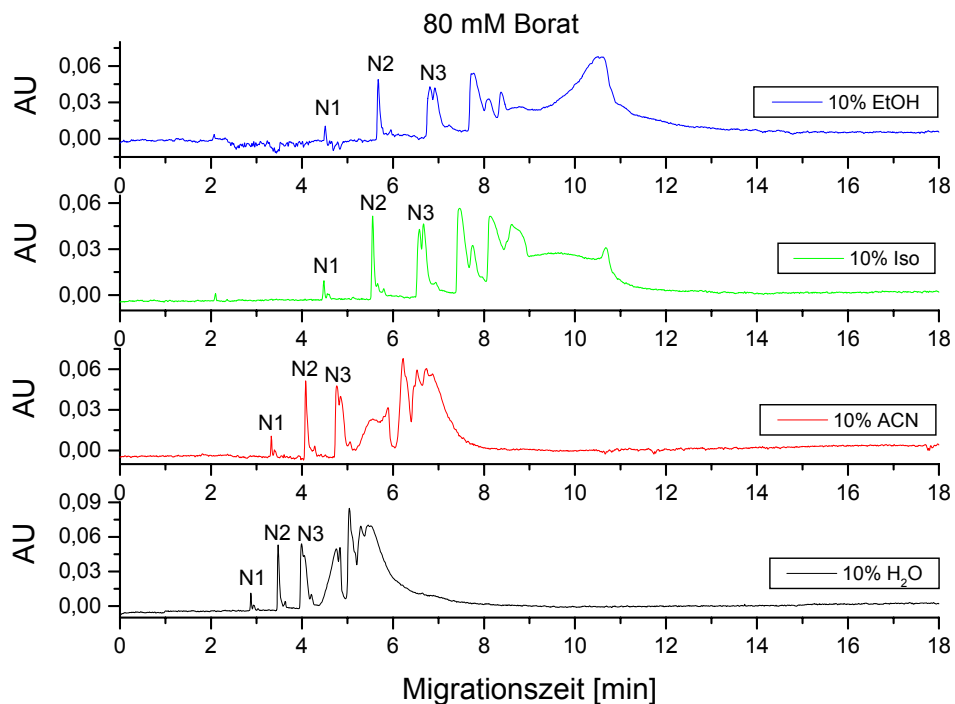


Abb. 21: Elektropherogramme von PSS1.1k in B80 mit unterschiedlichen Modifiern

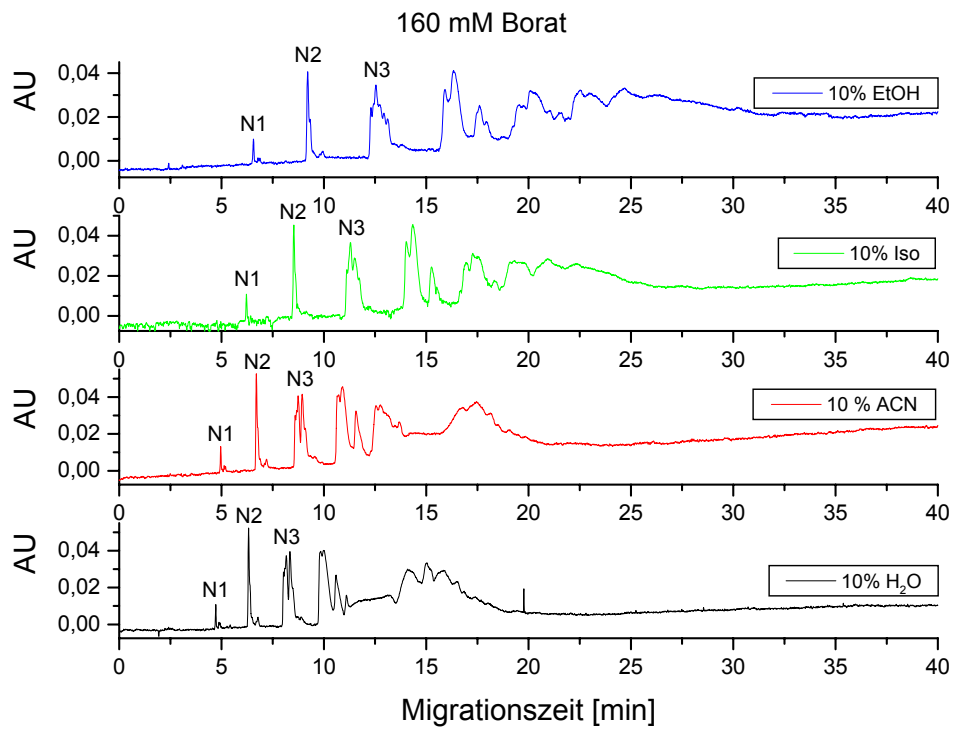


Abb. 22: Elektropherogramme von PSS1.1k in B160 mit unterschiedlichen Modifiern

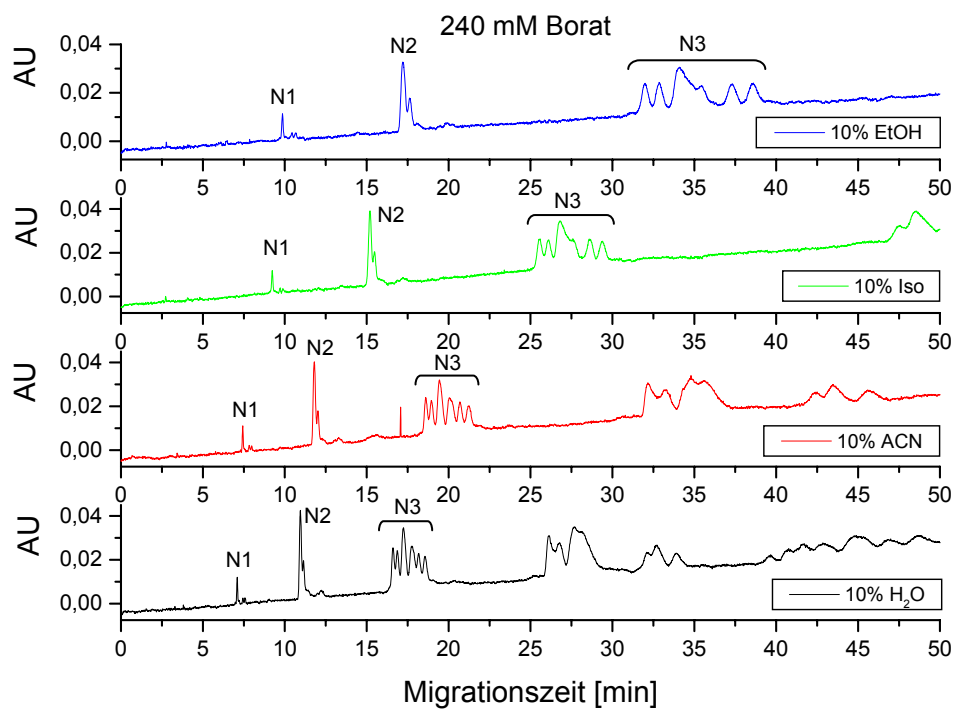


Abb. 23: Elektropherogramme von PSS1.1k in B240 mit unterschiedlichen Modifiern

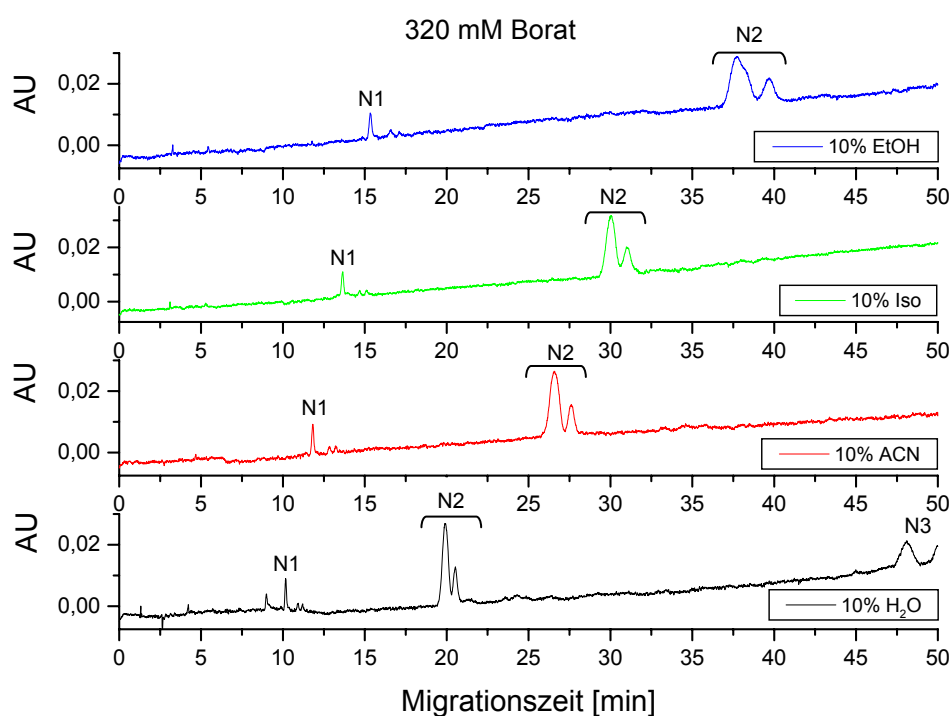


Abb. 24: Elektropherogramme von PSS1.1k in B320 mit unterschiedlichen Modifiern

In Abb. 25 sind die Migrationszeiten der Oligomere N1 – N3 in Abhängigkeit von der Art des Modifiers aufgetragen. Man erkennt, dass die Migrationszeiten durch Zugabe der Modifier zunehmen. Parallel hierzu erzielt man deutlich verbesserte Auftrennungen der Oligomerenpeaks. Hierbei ist der Einfluss von Acetonitril auf die Änderung der Migrationszeiten im Vergleich zum reinen Puffer nur gering. Für Isopropanol und Ethanol erhält man jedoch deutlich größere Änderungen der Migrationszeiten. So werden die Migrationszeiten durch Zugabe von 10 Vol.% Ethanol zum Puffer um den Faktor 2 verlängert. Aufgrund der größeren Änderungen der Migrationszeiten erhält man für Ethanol als Modifier die besten Trennergebnisse. In Abb. 23 erhält man für ACN eine scheinbar bessere Auftrennung. Man erhält deutlich schmalere Signale für das Trimerensextett. Die Peaks 3 und 4 dieses Sextetts sind im Vergleich zum Ethanol besser getrennt. Man erhält für ACN jedoch keine Basislinientrennung. In dem Puffersystem aus 240 mM Natriumborat mit 10 Vol.% EtOH erhält man hingegen annähernd basisliniengetrennte Signale des Trimerensextetts. Die schlechtere Auftrennung der Signale 3 und 4 im Puffer/EtOH-System lässt sich durch die

Peakverbreiterung aufgrund der verlängerten Migrationszeiten erklären.

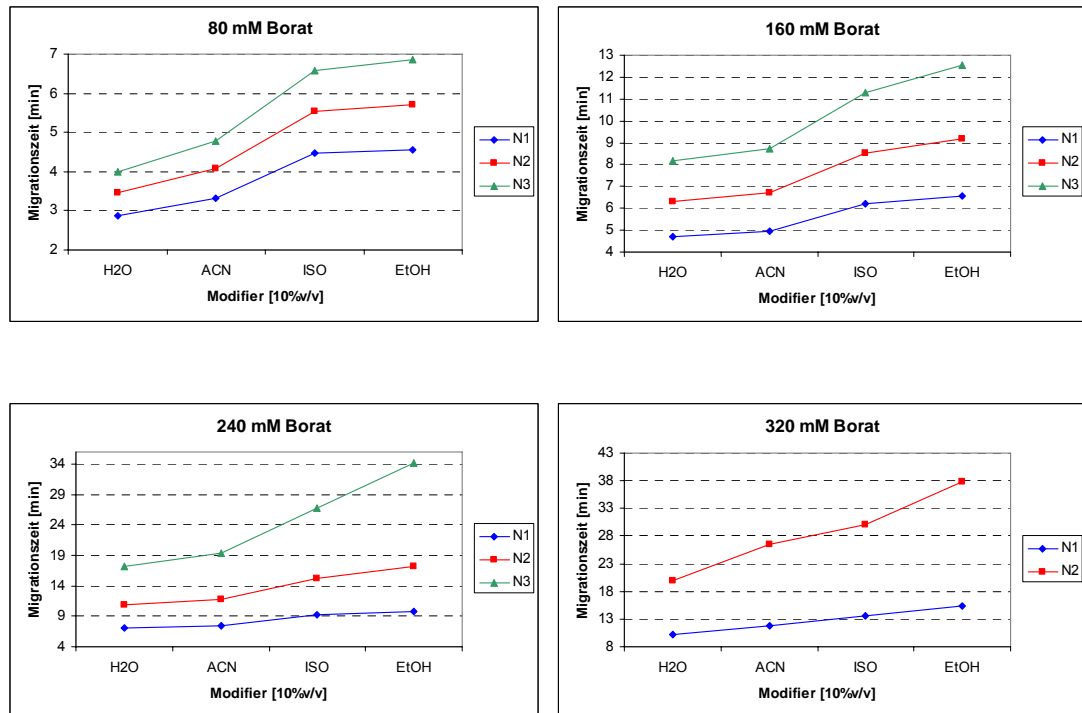


Abb. 25: Änderungen der Migrationszeiten der Oligomere N1-N3 in Abhängigkeit vom zugesetzten Modifier

Die Verwendung hochkonzentrierter Puffer führt in der Regel zu hohen Stromstärken und damit zu einer Erwärmung des Elektrolytensystems, der sogenannten Joule-Erwärmung. Aufgrund der sich ausbildenden Temperatur- und Viskositätsgradienten nimmt die Bandenverbreiterung zu und die Bodenzahl  $N$  entsprechend ab [Abschnitt 2.2.3]. Dies führt insgesamt zu einer Abnahme der Trenneffizienz [24,25]. Durch den Einsatz von Kapillaren mit geringen Innendurchmessern kann dieses Problem, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, überwunden werden. Man muss jedoch bedenken, dass sich hierdurch auch die Dimensionen der Detektorzelle verringern. Dies führt unweigerlich zu einer Verringerung der Nachweisempfindlichkeit der UV-Detektion. Für stark UV-absorbierende Substanzen stellt dies keinen nennenswerten Nachteil dar. Bei schwächer absorbierenden Proben kann es jedoch dazu führen, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze des Detektors liegen und somit nicht detektiert werden können.

Betrachtet man nun die während der Trennung auftretenden Stromstärken und deren Änderungen in Abhängigkeit vom verwendeten Modifier (Abb. 26), stellt man fest, dass für Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 25  $\mu\text{m}$  die Änderungen in den Stromstärken im Bereich von 5  $\mu\text{A}$  liegen. Da die Stromstärken nur im Bereich von 10 – 15  $\mu\text{A}$  liegen, sind die Absolutwerte sowie deren Änderungen für die Trenneffizienz nur von untergeordneter Rolle. Die bei diesen Stromstärken auftretende Joule-Erwärmung kann vernachlässigt werden.

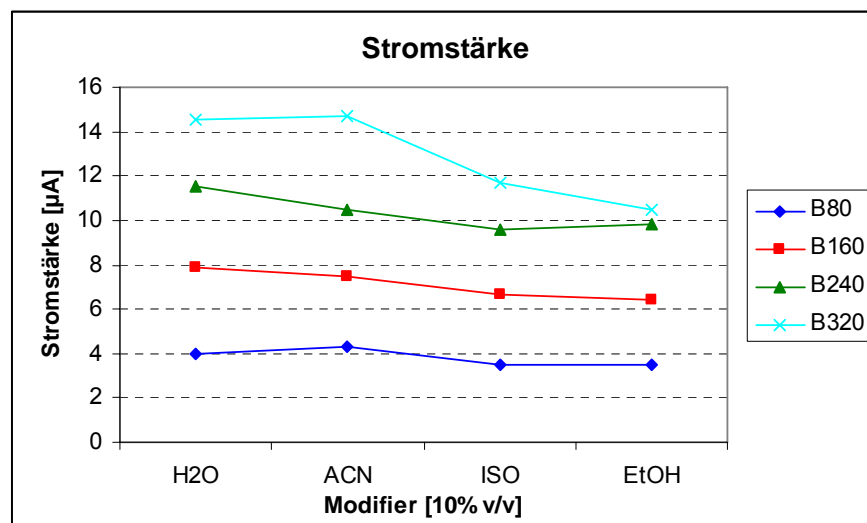


Abb. 26: Änderung der Stromstärken in Abhängigkeit vom Modifier

Werden die Messungen in einer Kapillare mit 50  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser durchgeführt, liegen die Stromstärken im Bereich von 120 – 180  $\mu\text{A}$ . Diese hohen Stromstärken und die damit verbundene Erwärmung des Systems können in Bezug auf die Trenneffizienz nicht mehr vernachlässigt werden. In Abb. 27 sind die Stromstärken in Abhängigkeit vom Modifier für Kapillaren mit 25  $\mu\text{m}$  und 50  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser dargestellt. Man erkennt, dass z.B. die Zugabe von 10 % Ethanol zum Puffer die auftretende Stromstärke um 50  $\mu\text{A}$  oder 28% senkt. Dies ist ein beträchtlicher Wert, der die Erwärmung und die dadurch verursachten negativen Auswirkungen auf die Trennleistung deutlich verringert. Hierdurch erhält man im Allgemeinen bessere Trennungen. Eine der Ursachen dieses Effektes liegt in der Verringerung der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  des modifizierten Puffers. Dies führt zu einer verringerten elektrischen Feldstärke und somit zu einer Verringerung der

erzeugten elektrischen Leistung mit den im Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Wirkungen auf die Trenneffizienz.

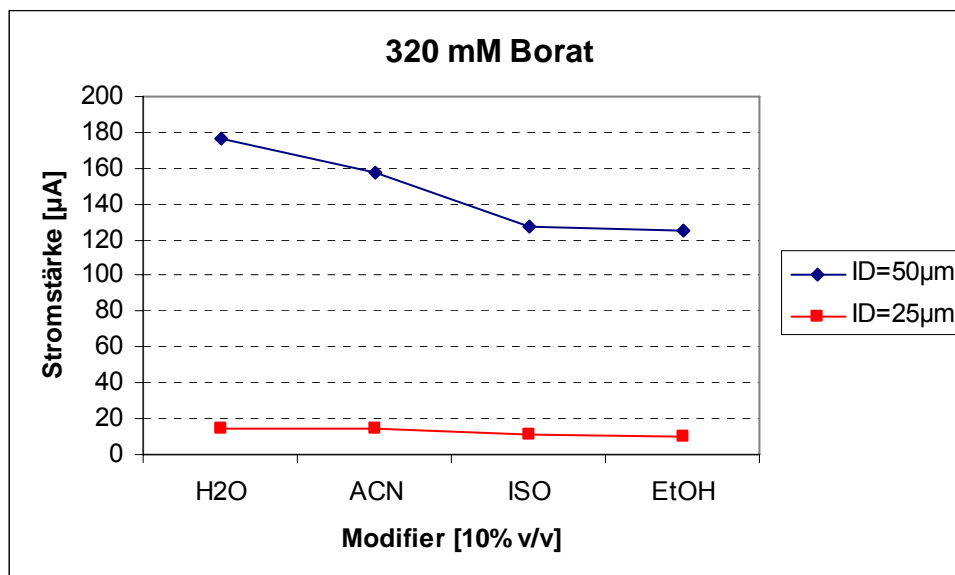


Abb. 27: Änderung der Stromstärke in Abhängigkeit vom Modifier für verschiedene Kapillarinendurchmesser

Durch den Zusatz sogenannter EOF-Modifier zum Puffer wird eine annähernd gleiche Trenneffizienz wie bei Verwendung hochkonzentrierter Puffer erreicht. Im Gegensatz zu den hochkonzentrierten Puffern werden bei Verwendung der modifizierten Puffer die auftretende Stromstärke und die damit einhergehende Temperaturerhöhung deutlich verringert. Eine Obergrenze für die sich ausbildende Stromstärke ist nur gerätetechnisch bestimmt. Die meisten kommerziell erhältlichen CE-Geräte lassen maximale Stromstärken von 250 – 300 µA zu. Die maximale Temperatur innerhalb der Kapillare muss unterhalb der Siedetemperatur der Pufferlösung liegen, da bei beginnender Gasentwicklung die sich in der Kapillare ausbildenden Gasblasen zu einem Zusammenbruch der Feldstärke und damit zu einem Abbruch der Messung führen.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass man durch die Zugabe organischer Modifier zum Puffer ein optimiertes Trennsystem erhält, das auch in Kapillaren mit größeren Innendurchmessern den Einsatz hochkonzentrierter Puffer bei höheren Spannungen zulässt. Als Modifier haben sich vor allem niedermolekulare Alkohole bewährt.

### **3.1.3 Abhängigkeit der Oligomerentrennung vom Volumenanteil des eingesetzten Modifiers**

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die Zugabe organischer Modifier zum Puffer einen positiven Einfluss auf elektrophoretische Trennungen hat. Um die Abhängigkeit der Trenneffizienz vom Volumenanteil des zugesetzten Modifiers zu untersuchen, wurden dem Puffer unterschiedliche Anteile an Isopropanol zugesetzt. Es wurde ein 160 mM Natriumboratpuffer mit jeweils 10, 20 und 30% v/v Isopropanol als organischen EOF-Modifier untersucht. Die Trennungen erfolgten in einer Quarzglaskapillare mit einer Länge von 32 cm und einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  bei einer Spannung von 15 kV. Die Trenneffizienz wurde anhand der Trennung von PSS 1.1k untersucht. Als EOF-Marker wurde Tetrahydrofuran (THF) verwendet.

In Abbildung 28 sind die Elektropherogramme für den 160 mM Natriumboratpuffer mit verschiedenen Volumenanteilen an Isopropanol dargestellt. Man erkennt, dass mit zunehmendem Isopropanolanteil die Auftrennung der Oligomere deutlich besser wird. Parallel hierzu nimmt die Trenndauer für das vorliegende Experiment um den Faktor 4 zu.

Für den reinen Puffer, Kurve A in Abbildung 28, erfolgt die Trennung innerhalb von 4 Minuten. Es werden jedoch nur die Oligomere N1 - N3 basisliniengetreunt. Mit zunehmendem Volumenanteil an Isopropanol wird auch die Auftrennung der höheren Oligomere deutlich besser. So erkennt man in Kurve B (10% v/v) bei 3,8 min zusätzlich den Oligomerpeak für das Pentamere N5. Ab einem Volumenanteil von 20% v/v (Kurve C) erfolgt eine zusätzliche Isomerenaufspaltung für die Oligomere N1 - N3. Für 30% v/v Isopropanol im Puffer (Kurve D) werden die Isomeren für N3 teilweise basisliniengetreunt. Für das Tetramere N4 werden ebenfalls zusätzliche Isomerenpeaks sichtbar.

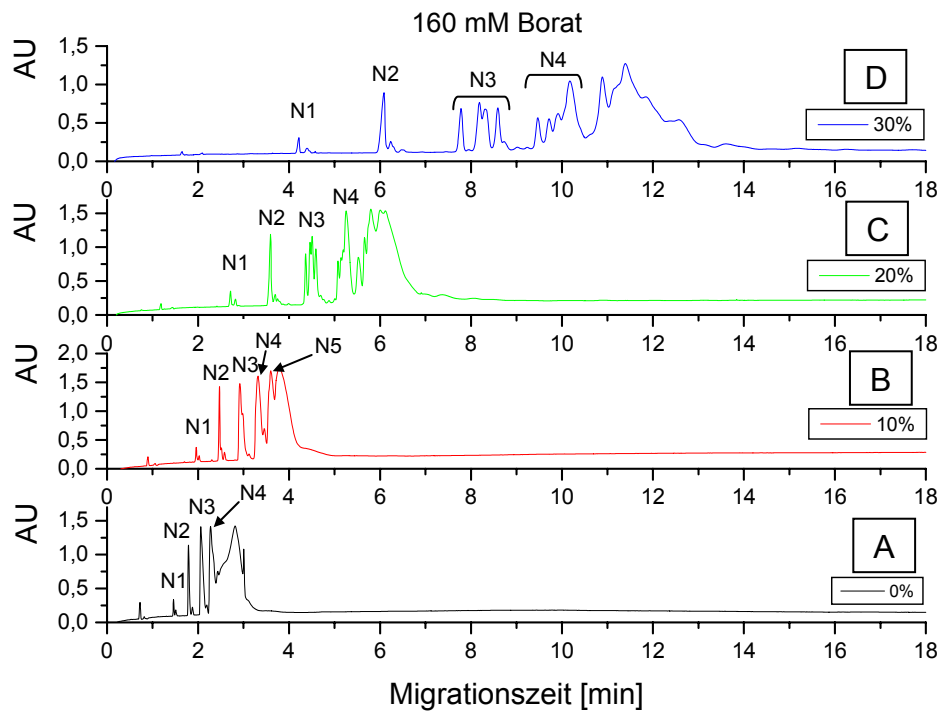


Abb. 28: Elektropherogramme von PSS 1.1k in Abhängigkeit vom Volumenanteil an Isopropanol.  
 Kapillare: 25/32 cm L x 50  $\mu$ m ID; Puffer: 160 mM Borat ph 9; U: 15 kV;  
 Inj: 3s x 0,5 psi;  $c_{PSS1.1k}$ : 0,2 g/l

In Abb. 29 sind die Migrationszeiten des EOF sowie der Oligomere N1 – N3 in Abhängigkeit vom Isopropanolanteil dargestellt. Da das Oligomer N3 ab einem Volumenanteil von 20 % in Isomere aufspaltet, wurde zur Bestimmung der Migrationszeit das Peakmaximum des Hauptpeaks ausgewertet.

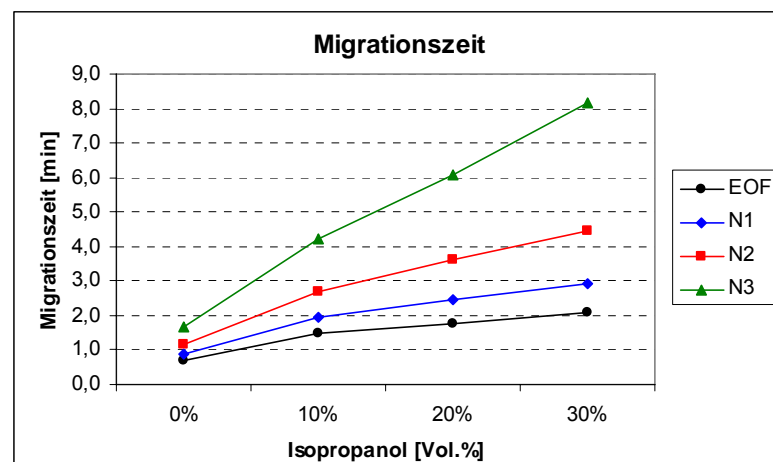


Abb. 29: Änderung der Migrationszeiten in Abhängigkeit vom Volumenanteil an Isopropanol

Die Zunahme der Migrationszeiten ist auf eine Abnahme der elektrischen Feldstärke innerhalb des Systems zurückzuführen. Durch Zugabe des Modifiers ändert sich die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  des Systems. Dies führt zu einer Änderung der elektrischen Feldstärke. Diese Änderung der Feldstärke kann durch die Änderung der während der Trennung auftretenden Stromstärken verdeutlicht werden. Mit zunehmendem Volumenanteil an Isopropanol verringert sich aufgrund der Abnahme der Feldstärke die Stromstärke (Abb. 30). Diese beiden Effekte wirken sich positiv auf die Trenneffizienz aus. Durch Erniedrigung der Feldstärke erhöht sich die Verweildauer in der Kapillare, während durch die Verringerung der sich ausbildenden Stromstärke die Joule-Erwärmung reduziert wird. Man erhält folglich deutlich bessere Trennungen.

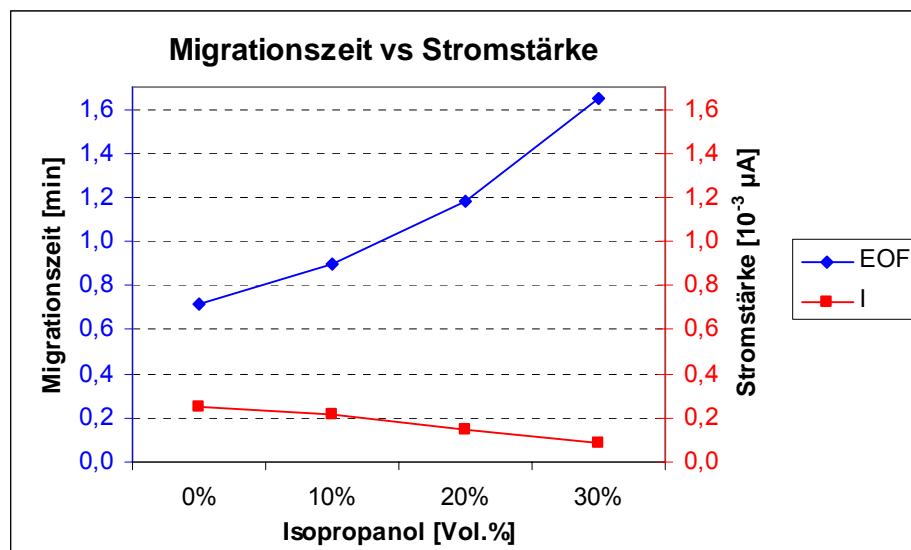


Abb. 30: Änderungen der Migrationszeit und der Stromstärke in Abhängigkeit vom Volumenanteil an Isopropanol

### **3.2 Methodenentwicklung zur Trennung und Detektion UV-transparenter Polyelektrolyte**

Im folgenden Abschnitt sollen unterschiedliche Detektionssysteme auf ihre Anwendbarkeit für die CE getestet werden. Viele industriell relevante Polymersysteme wie z.B. Polyacrylsäure (PAS), Polymethacrylsäure (PMAS) und Copolymere aus Polyethylenglycol (PEG) und Polyacryl- bzw. Polymethacrylsäure sind UV-transparent. Der typischerweise eingesetzte UV-Detektor ist hier nur von begrenztem Wert, da die Signale solcher Polymere teilweise unter der Nachweisgrenze des Detektors liegen. Als Alternativen bieten sich die kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion (CCD) und die indirekte UV-Detektion (IUV) an.

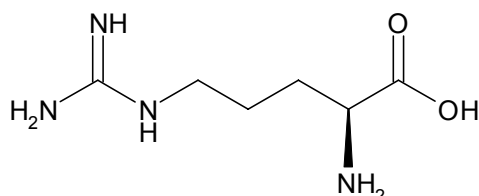
#### **3.2.1 Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion (CCD)**

In der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion wird die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit  $\kappa$  beim Durchgang der Analytionen durch die Detektorzelle gemessen. Für ein gutes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ist es wichtig, dass sich die Leitfähigkeiten des Elektrolyten und der Analytionen deutlich voneinander unterscheiden. Die in der CE verwendeten Borat-, Phosphat- und TRIS-Puffer weisen eine zu große Eigenleitfähigkeit auf. Mögliche Leitfähigkeitsänderungen, die beim Durchtritt der untersuchten UV-transparenten Polyelektrolyte durch den Detektor auftreten, können mit diesen Puffersystemen nicht detektiert werden. In Folge dessen müssen für die elektrophoretische Trennung mit anschließender Leitfähigkeitsdetektion solcher Polyelektrolyte neue Puffersysteme gefunden und getestet werden. Mögliche Alternativen zu den herkömmlichen Puffern können organische Puffersysteme sein, die aus Arginin/Sorbinsäure (AS), Histidin/Sorbinsäure (HS) oder Morpholinoethansulfonsäure/Arginin (MA) bestehen (Abb. 31). Bei der Leitfähigkeitsdetektion von anorganischen Anionen hat sich das Puffersystem aus 15 mM Arginin und 7 mM Sorbinsäure bewährt [38].

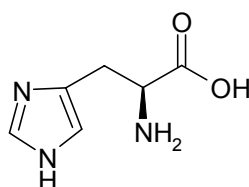
In den folgenden Untersuchungen wurden verschiedene organische Puffersysteme auf ihre Trenneffizienz und Detektionsfähigkeit hin getestet. Als Probe wurde das Natriumsalz einer Polyacrylsäure mit einem mittleren

Molekulargewicht von 1300 g/mol (PAS1,3k) verwendet. Die Trennungen wurden in einer unbeschichteten Quarzglaskapillare mit einer Gesamtlänge von 31 cm und einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  bei verschiedenen Spannungen durchgeführt.

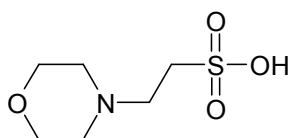
Arginin,  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ :



Histidin,  $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ :



MES,  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ :



Sorbinsäure,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ :

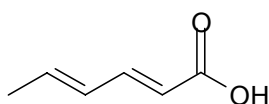


Abb. 31: Struktur- und Summenformeln der verwendeten organischen Puffer

In Abb. 32 sind die Elektropherogramme der Probe PAS1,3k für drei verschiedene Puffersysteme gezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass für alle drei Puffer eine Oligomerentrennung erzielt wird. Der Arginin/Sorbinsäure-Puffer (schwarze Kurve, AS12) weist hierbei die beste Trennung bei einem sehr guten Signal-zu-Rauschen-Verhältnis auf. Die Oligomere im Migrationsbereich von 4 – 11 min sind zum Teil basisliniengetrennt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Puffern weist das AS-Elektropherogramm

einen zusätzlichen intensiven Peak bei ca. 3 min auf. Auch der Histidin/Sorbinsäure-Puffer (rote Kurve, HS12) liefert eine gute Trennung der Oligomeren. Im Vergleich zum Arginin/Sorbinsäure-Puffer erhält man jedoch keine basisliniengetrennte Signale. Für den Morpholinoethansulfonsäure/Arginin-Puffer (blaue Kurve, MA12) ergibt sich eine deutlich schlechtere Auftrennung gegenüber den beiden anderen Puffern. Für die weiteren Untersuchungen wird der MA-Puffer nicht mehr berücksichtigt. Da sich der pH-Wert des AS-Puffers (pH 9) deutlich von dem des HS-Puffers (pH 5,5) unterscheidet, beide jedoch zu guten bis sehr guten Auftrennungen der einzelnen Oligomeren führen, werden sie im Folgenden näher untersucht.

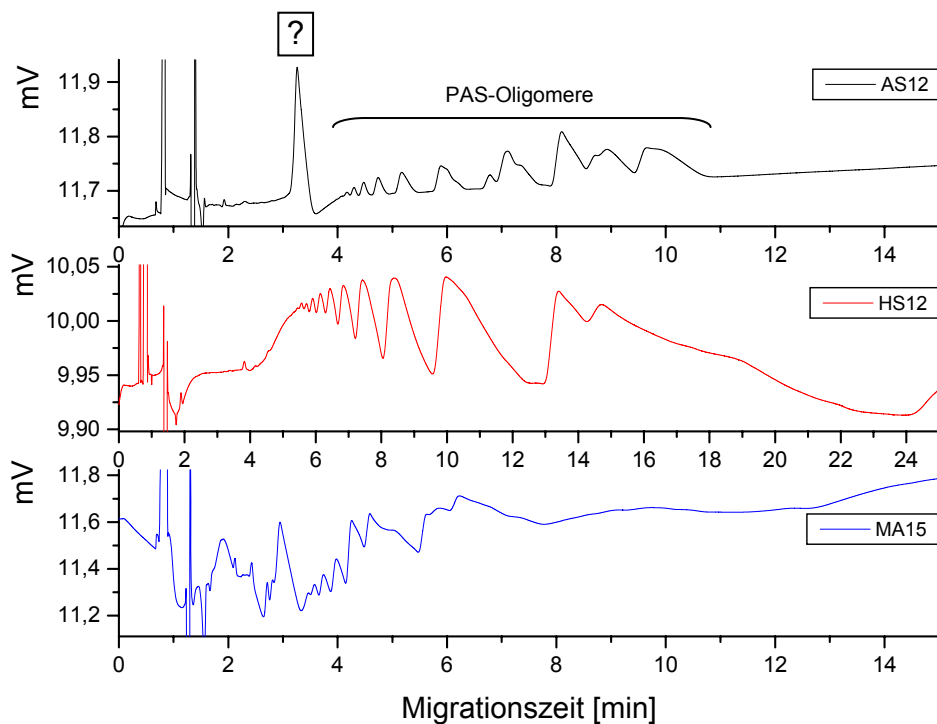


Abb. 32: Oligomerentrennung von PAS1.3k in Abhängigkeit von verschiedenen organischen Puffern  
**AS12:** 12 mM Arginin / 6 mM Sorbinsäure (pH 9); **HS12:** 12 mM Histidin / 6 mM Sorbinsäure (pH 5,5); **MA15:** 15 mM Arginin / 7,5 mM MES (pH 9)  
*U:* 10kV; *Inj:* 6s x 0,5 psi; *T:* 23°C

### 3.2.1.1 Vergleich der Trenneffizienz verschiedener organischer Puffersysteme in Abhängigkeit von ihrer Konzentration

Die im vorigen Abschnitt verwendeten organischen Puffersysteme aus Arginin/Sorbinsäure (AS) und Histidin/Sorbinsäure (HS) werden in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen auf ihre Trenneffizienz hin untersucht und miteinander verglichen. Die verwendeten Pufferkonzentrationen sind in Tabelle 2 dargestellt.

	<b>Arginin [mM]</b>	<b>Sorbinsäure [mM]</b>	<b>Histidin [mM]</b>	<b>pH-Wert</b>
AS3	3	1,5		9
AS6	6	3		9
AS12	12	6		9
HS3		1,5	3	5,5
HS6		3	6	5,5
HS12		6	12	5,5

Tab. 2: Zusammensetzung der Puffer

Die Trennungen wurden in einer unbeschichteten Quarzglaskapillare mit einer Gesamtlänge von 31 cm und einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  bei einer angelegten Spannung von 5 kV durchgeführt. Als Probe wurde wiederum das Polyacrylsäure-Na-Salz PAS1,3k verwendet.

In den Abb. 33 und 34 sind die Elektropherogramme für die verschiedenen AS- und HS-Puffer dargestellt. Sowohl für die AS-Puffer als auch für die HS-Puffer wird die Auftrennung in die Oligomere mit zunehmender Pufferkonzentration deutlich verbessert. Dies ist wiederum auf die Verringerung der EOF-Geschwindigkeit mit zunehmender Pufferkonzentration zurückzuführen.

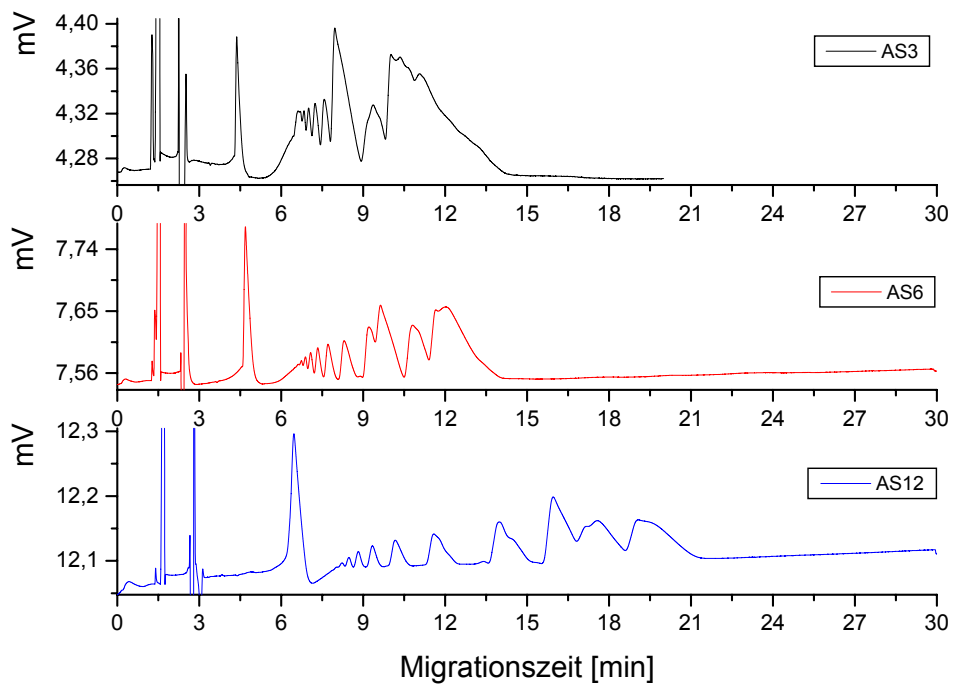


Abb. 33: Oligomerenauftrennung in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration für das Puffersystem Arginin/Sorbinsäure  
**AS3** (schwarz), **AS6** (rot) und **AS12** (blau)

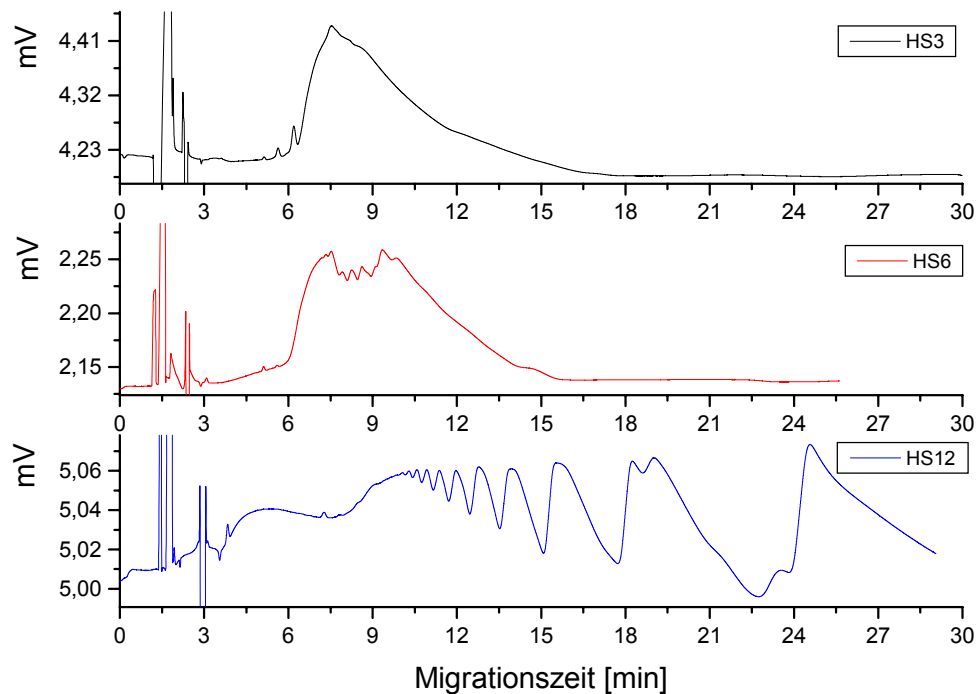


Abb. 34: Oligomerenauftrennung in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration für das Puffersystem Histidin/Sorbinsäure  
**HS3** (schwarz), **HS6** (rot) und **HS12** (blau)

Vergleicht man die entsprechenden AS- und HS-Puffer miteinander stellt man fest, dass schon für den AS3-Puffer eine deutliche Oligomerentrennung zu sehen ist. Mit zunehmender Pufferkonzentration wird diese immer besser. Für den AS12-Puffer erhält man sogar eine basisliniengetrennte Oligomerenverteilung. Im Gegensatz hierzu erreicht man bei den HS-Puffern erst für den HS12-Puffer eine Oligomerentrennung, die aber keine basisliniengetrennte Signale aufweist. In Abb. 35 ist, zur besseren Verdeutlichung der unterschiedlichen Trenneffizienzen, der Oligomerenbereich für die beiden Puffer AS12 und HS12 vergrößert dargestellt

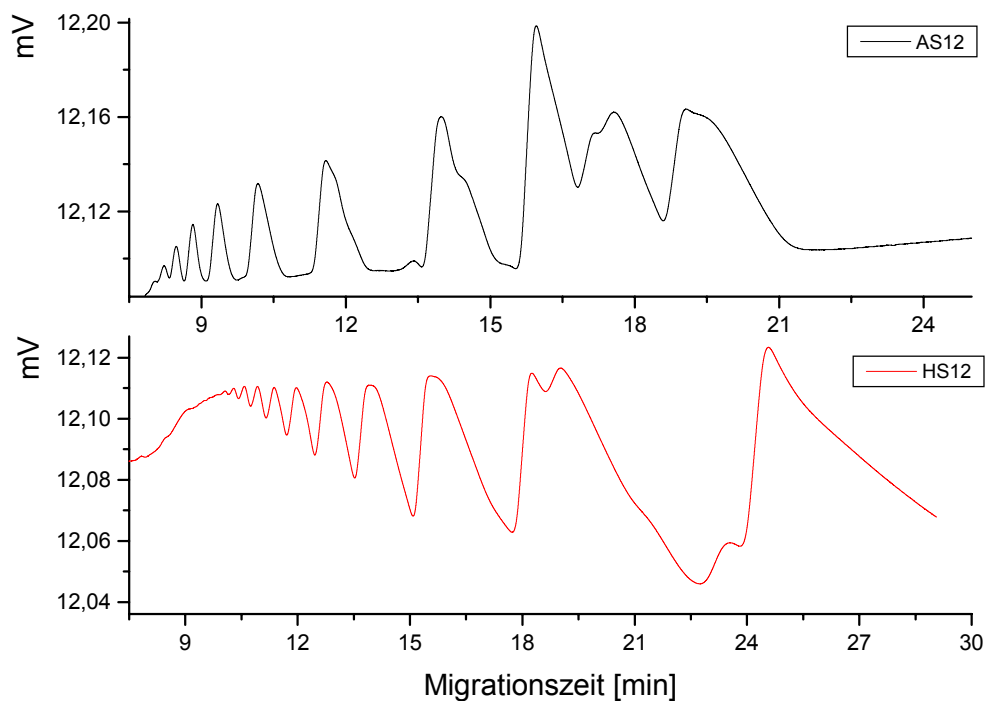


Abb. 35: Vergrößerte Darstellung des PAS1,3k-Oligomerenbereichs für die Puffer AS12 (schwarz) und HS12 (rot)

Neben der Basislinientrennung im AS-System erhält man zusätzlich eine feinere Signalaufspaltung. So sind für die Signale bei höheren Migrationszeiten Substrukturen zu erkennen, die für das HS-System nicht nachgewiesen werden können. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um isomere Strukturen. Eine eindeutige Zuordnung ist zur Zeit mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich.

Nach den erhaltenen Ergebnissen kann gesagt werden, dass die Arginin/Sorbinsäure-Puffer sehr geeignete Systeme für die kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion UV-transparenter synthetischer Polyelektrolyte sind. Durch die geringe Eigenleitfähigkeit der organischen Puffer erhält man für Polyacrylsäure- und Polymethacrylsäureproben ausreichende Leitfähigkeitsunterschiede im CCD-Detektor, die zu hohen Signalintensitäten führen. Durch den pH-Wert von 9 sind die Proben nahezu vollständig dissoziiert. Durch die geringe Leitfähigkeit der Puffer werden während der Trennung nur geringe Stromstärken in der Kapillare erzeugt. Die hierbei auftretenden geringen Temperatureffekte und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Trennleistung (siehe Abschnitt 2.3.3) können vernachlässigt werden.

#### **3.2.1.2 Verbesserte Oligomerentrennung für PAS1,3k durch konzentrierte Arginin/Sorbinsäure-Puffer**

Wie bei der Trennung von Polystyrolsulfonat in Abschnitt 3.1.1 gezeigt wurde, kann auch die Oligomerentrennung von niedermolekularen Polyacrylsäure-Salzen durch Einsatz höher konzentrierter organischer Puffer (Arginin/Sorbinsäure) deutlich verbessert werden. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass bei Erhöhung der Pufferkonzentration die Leitfähigkeit des Puffers ebenfalls steigt. Dies führt zu einer Verringerung des Leitfähigkeitsunterschieds zwischen Puffer und Analytione. Da die Signalintensität mit dem Leitfähigkeitsunterschied zwischen Puffer und Analytione korreliert, kann ein zu geringer Leitfähigkeitsunterschied dazu führen, dass die Signale unterhalb der Nachweisgrenze des Detektors liegen. Für den Arginin/Sorbinsäure-Puffer konnten bei Konzentrationen oberhalb von 40mM Arginin und 20 mM Sorbinsäure keine Signale mehr detektiert werden. Folglich können für die Leitfähigkeitsdetektion keine Pufferkonzentrationen wie bei der optimierten Trennung des PSS1,3k in Natriumboratpuffern eingesetzt werden. Die für die folgenden Untersuchungen verwendeten Pufferkonzentrationen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Puffer	Arginin [mM]	Sorbinsäure [mM]	pH-Wert
AS6	6	3	9
AS12	12	6	9
AS16	16	8	9
AS24	24	12	9

Tab. 3: Zusammensetzung der AS-Puffer

Abb. 36 zeigt die Elektropherogramme der Probe PAS1,3k in den vier verschiedenen AS-Puffern. Man erkennt wie erwartet eine deutlich verbesserte Trennung der einzelnen Oligomere sowie eine zunehmende Feinaufspaltung der Peaks mit zunehmender Pufferkonzentration. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen, aus Kapitel 3 überein.

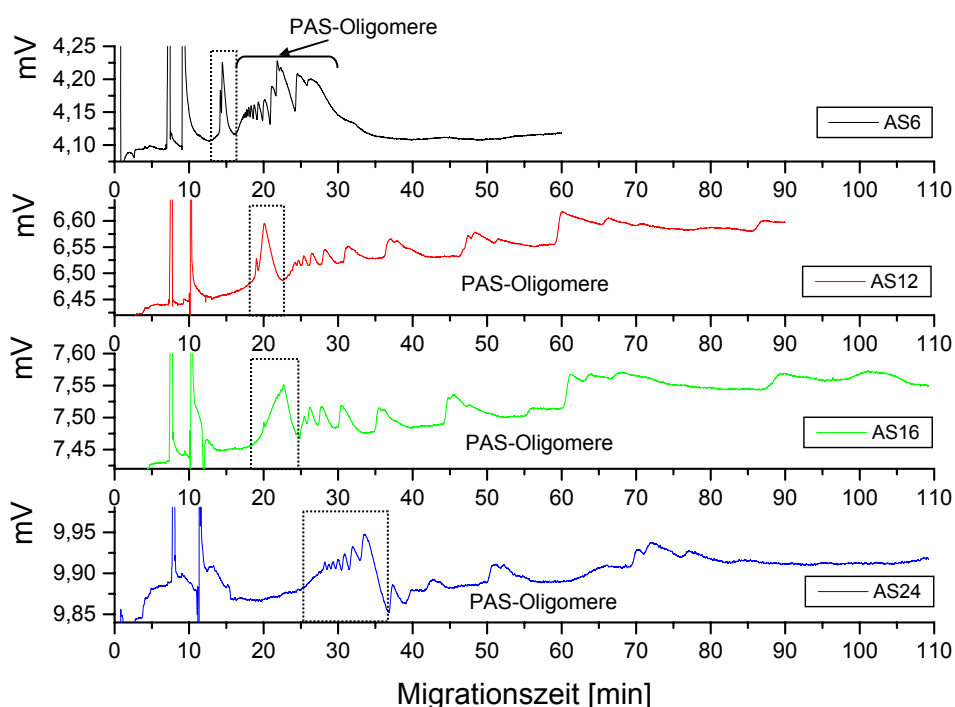


Abb. 36: PAS1,3k-Oligomerentrennung in Abhängigkeit von der Pufferkonzentration  
 Kapillare: 60cm L x 75 µm ID, unbeschichtet  
 U: 5 kV; Inj: 5s x 0,3 psi; T: 20°C

Bei den bisher durchgeführten Messungen an PAS1,3k mit gering konzentrierten AS-Puffern wurde ein sehr intensiver Peak direkt vor der Oligomerenserie beobachtet (Peak bei 15min für AS6). Dieser Peak wurde

bis jetzt als Systempeak betrachtet. Durch den Einsatz der höher konzentrierten AS-Puffer konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich keinesfalls um einen Systempeak handelt. Vielmehr weist dieser Peak eine zweite Oligomerenverteilung auf, die erst bei höheren Pufferkonzentrationen (AS24) aufgetrennt wird. Die chemische Struktur dieser Oligomerenverteilung konnte bis jetzt nicht erklärt werden.

### 3.2.1.3 Untersuchung verschiedener Polyacrylsäuresalze mit der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion

Die in den vorigen Abschnitten getesteten organischen Puffersysteme sollen nun auf die Trennung von Polyacrylsäuresalzen unterschiedlicher Molmasse angewendet werden. Es werden Polyacrylsäure-Na-Salz-Standards mit mittleren Molmassen im Bereich von 1.000 g/mol bis ca. 35.000 g/mol eingesetzt. Die Konzentrationen der Standardlösungen betragen je 0,75 g/l. In Abb. 37 sind die Elektropherogramme von vier verschiedenen PAS-Proben dargestellt.

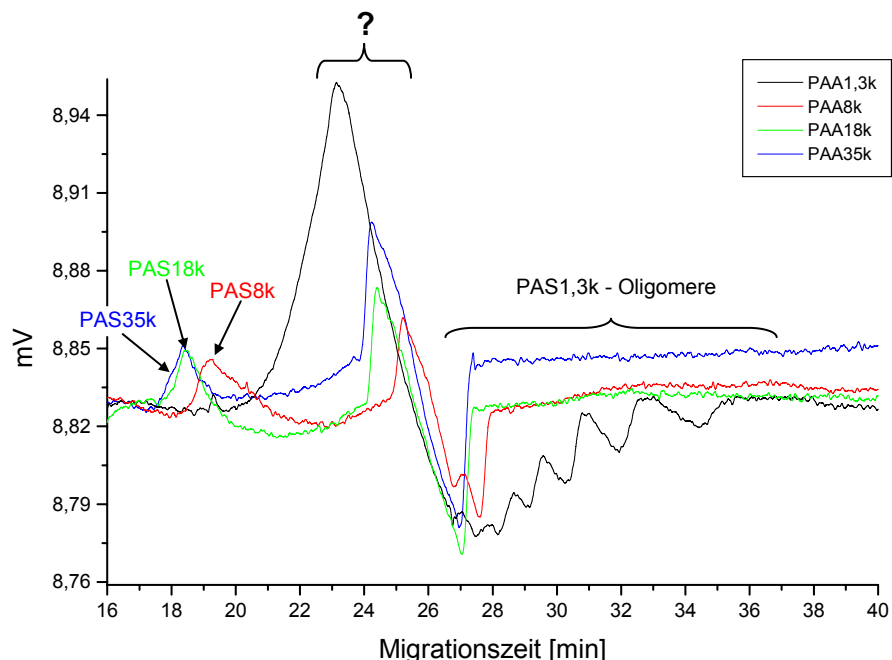


Abb. 37: Elektropherogramme der Proben PAS1,3k (schwarz), PAS8k (rot), PAS18k (grün) und PAS35k (blau)  
*Kapillare:* 60 cm L x 75 µm ID, unbeschichtet;  
*Puffer:* 16 mM Arginin / 8 mM Sorbinsäure; pH 9;  
*U:* 15 kV, *Inj:* 5s x 0,3 psi; *T:* 20°C

Die Peakmaxima der höhermolekularen Proben liegen im Bereich von 18 min (PAS18k und PAS35k) bis 19 min (PAS8k). Die Proben PAS18k und PAS35k weisen identische Migrationszeiten auf. Eine weitere Auftrennung dieser Proben ist ohne Zusatz eines Gelbildners nicht mehr möglich. Wie in Abschnitt 2.5.1 theoretisch vorhergesagt, befindet man sich hier in einem Molmassenbereich nahezu konstanter Oberflächenladung-zu-Radius-Verhältnisse und damit nahezu konstanter Mobilitäten. Für die Kurven der Proben PAS8k, 18k und 35k erkennt man einen intensiven Peak bei ca. 24 min. Die Migrationszeit lässt darauf schliessen, dass es sich hierbei um ein relativ kleines Molekül handelt. Es konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um das Monomere oder um ein bisher nicht zu identifizierendes weiteres Anion handelt. Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen vom Puffer generierten Peak handelt, wurde eine Messung durchgeführt, bei der eine Arginin/Sorbinsäure-Probe AS37 (37,5 mM Arginin/18,75 mM Sorbinsäure) für 5 s bei einem Druck von 0,3 psi injiziert wurde. In Abb. 38 ist das Elektropherogramm der AS37-Probe dargestellt. Man erkennt, dass die AS37-Probe ein negatives Signal bei ca. 27 min erzeugt. Dieser negative Peak ist auch bei allen anderen Messungen in Abb. 37 zu sehen. Da in der Messung der AS37-Probe kein positives Signal zu erkennen ist, handelt es sich bei den in Abb. 37 auftretenden Signalen bei einer Migrationszeit von 24 min offensichtlich um einen von den PAS-Na-Proben generierten Peak. Für die Probe PAS1,3k erkennt man, dass dieser Peak (23 min) deutlich breiter und intensiver ist als für die höhermolekularen Proben. Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass dieser breite intensive Peak eine weitere Oligomerenverteilung aufweist, die jedoch erst bei höher konzentrierten Puffern aufgetrennt werden kann. Die Intensität des bei PAS1,3k auftretenden Peaks lässt darauf schliessen, dass es hier zu einer Überlagerung des unbekanntes Probenpeaks mit der zusätzlichen Oligomerenverteilung kommt.

In Abb 6, Abschnitt 2.5.1, ist der Verlauf der elektrophoretischen Mobilität von Polyionen in Abhängigkeit von der Anzahl an Wiederholungseinheiten dargestellt. Man erkennt, dass im Bereich der Stäbchenkonformation die elektrophoretische Mobilität linear mit der Anzahl an Wiederholungseinheiten zunimmt, bis sie ein Maximum durchläuft, um danach einen konstanten Wert

anzunehmen. Mit den Messungen in Abb. 37 konnte dieser theoretische Verlauf auch für Polyacrylsäuren experimentell nachgewiesen werden. Für die hier untersuchten Polyacrylsäuresalze liegt der Konversionspunkt der elektrophoretischen Mobilität im Bereich von ca. 2000 g/mol.

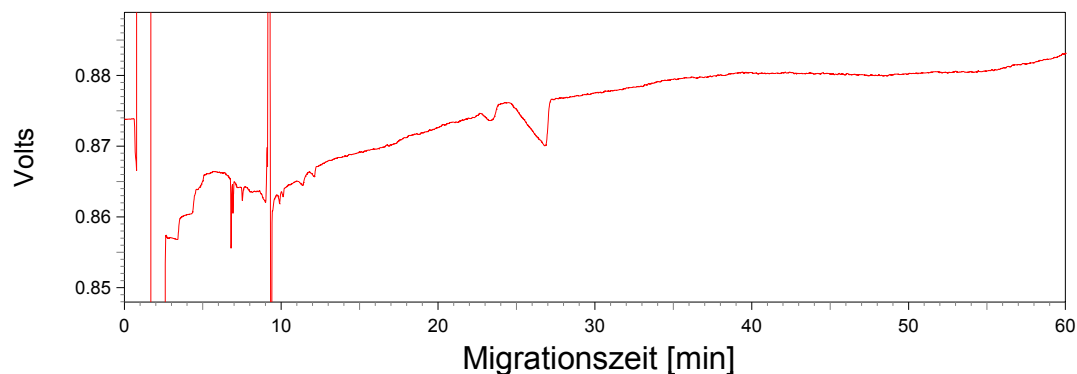


Abb. 38: Elektropherogramm der Probe AS37 (37,5 mM Arginin/18,75 mM Sorbinsäure)  
*Kapillare:* 60 cm L x 75 µm ID, unbeschichtet;  
*Puffer:* 16 mM Arginin / 8 mM Sorbinsäure; *pH* 9;  
*U:* 15 kV, *Inj:* 5s x 0,3 psi; *T:* 20°C

### 3.2.2 Indirekte UV-Detektion (IUUV)

Neben der im vorigen Abschnitt entwickelten Leitfähigkeitsdetektion stellt die indirekte UV-Detektion eine weitere mögliche Methode zur Detektion UV-transparenter Polyelektrolyte dar. Bei der IUUV wird dem Puffersystem ein UV-absorbierendes Co-Ion zugegeben. Die Verdrängung des Co-Ions durch die Analytionen macht sich im Detektor durch eine Abnahme der Extinktion und damit verbunden in einem negativen Signal bemerkbar. Ziel dieser Arbeit war es, Puffersysteme zu finden und zu testen, die eine gute Trennung für PAS und PMAS aufweisen und dabei eine hohe Detektionsempfindlichkeit besitzen.

Es hat sich herausgestellt, dass sich die für die Leitfähigkeitsdetektion entwickelten organischen Puffersysteme bestehend aus Arginin/Sorbinsäure oder Histidin/Sorbinsäure ebenfalls für die indirekte UV-Detektion eignen. Die besten Signalintensitäten wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm erreicht.

Um die organischen Puffersysteme hinsichtlich ihrer Eignung als Elektrolyte für die indirekte UV-Detektion zu testen, wurde die Probe PAS1,3k jeweils mit dem HS12- und dem AS12-Puffer gemessen. In Abb. 39 ist das Elektropherogramm der Probe PAS1,3k für den HS12-Puffer dargestellt. Die Oligomerenverteilung weist scharfe und intensive Signale auf. Die Signale sind jedoch nicht basisliniengetrennt.

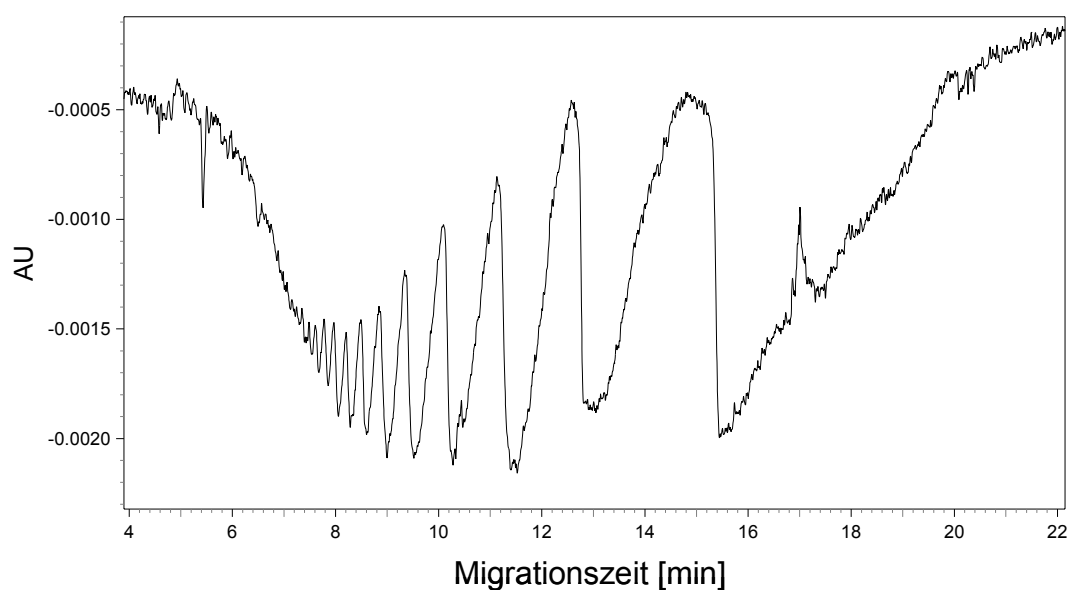


Abb. 39: Oligomerenverteilung der Probe PAS1,3k in HS12  
*Puffer:* 12 mM Histidin/ 6 mM Sorbinsäure; pH 5,5  
*Kapillare:* 31 cm L x 50 µm ID, unbeschichtet  
*U:* 10kV; *Inj:* 10s x 0,5psi; *T:* 23°C

In Abb. 40 ist der Oligomerenbereich der Probe für den AS12-Puffer dargestellt. Die Oligomerenverteilung weist ebenfalls scharfe und intensive Peaks auf. Obwohl die Trennung im AS-Puffersystem deutlich schneller abläuft als im vergleichbaren HS-Puffersystem, erhält man eine deutlich bessere Auftrennung mit teilweise basisliniengetrennten Signalen. Der Oligomerenbereich wird im AS-Puffer innerhalb von 9 min, im HS-Puffer in 14 min aufgetrennt.

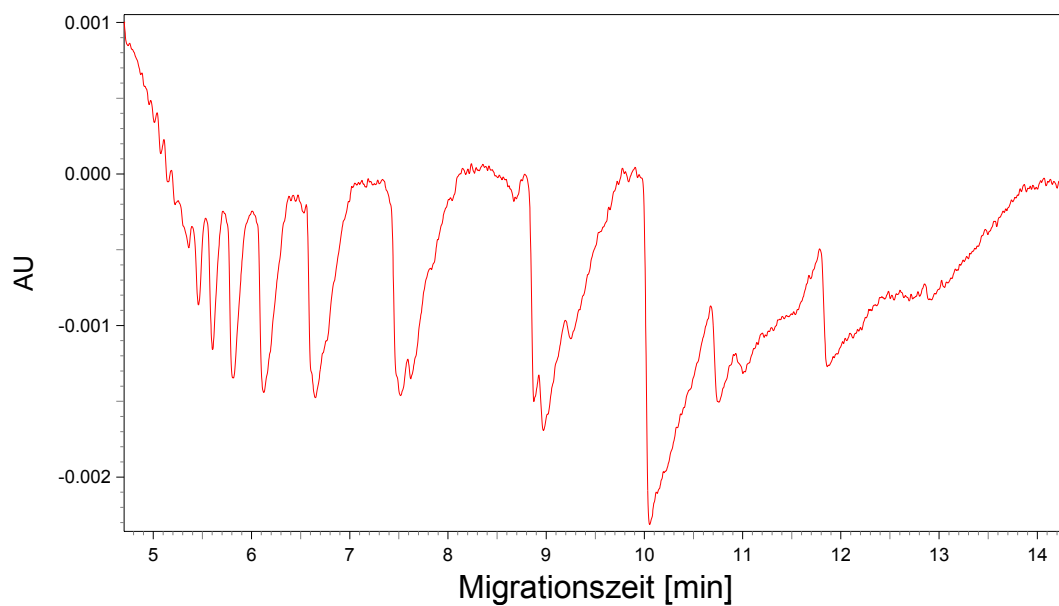


Abb. 40: Oligomerenverteilung der Probe PAS1,3k in AS12  
*Puffer:* 12 mM Arginin/ 6 mM Sorbinsäure; pH 9  
*Kapillare:* 31 cm L x 50 µm ID, unbeschichtet  
*U:* 10kV; *Inj:* 10s x 0,5psi; *T:* 23°C; *UV:* 254nm

Die Abhängigkeit der Trenneffizienz von der Pufferkonzentration wurde anhand verschieden konzentrierter AS-Puffer im IUV-Modus untersucht. Es wurden die Puffer AS3, AS6 und AS12 eingesetzt, deren Zusammensetzung aus Tabelle 3 zu entnehmen ist. Als Probe kam wiederum PAS1,3k zum Einsatz. Die Elektropherogramme für die verschiedenen Puffer sind in Abb. 41 zusammengestellt. Die verbesserte Trenneffizienz mit Zunahme der Pufferkonzentration wird anhand zweier farblich (rot und blau) gekennzeichneten Peaks verdeutlicht. Während es bei dem AS3-Puffer zu einer Überlagerung der beiden gekennzeichneten Peaks kommt, werden diese mit zunehmender Pufferkonzentration deutlich besser voneinander getrennt. Für den AS12-Puffer erhält man basisliniengetrennte Signale. Mit zunehmender Pufferkonzentration spaltet der rot gekennzeichnete Peak in mehrere Einzelpeaks auf. Ursache für das Auftreten mehrerer Peaks könnten wiederum Strukturisomere sein.

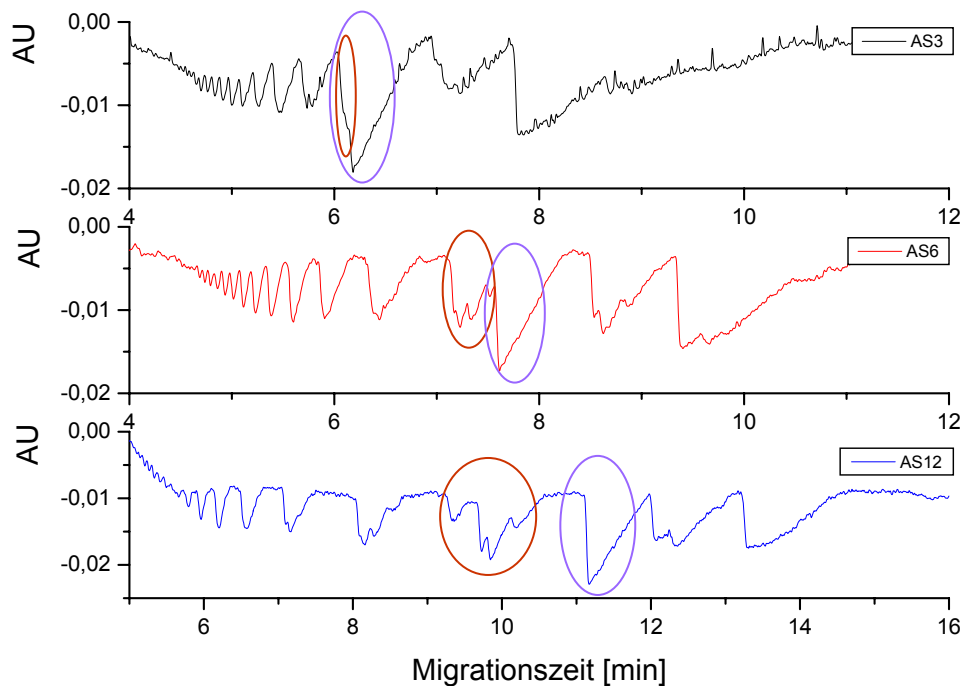


Abb. 41: Abhängigkeit der Trenneffizienz von der Pufferkonzentration  
*Kapillare:* 31cm L x 50 $\mu$ m ID; unbeschichtet  
*U:* 10kV; *Inj:* 3s x 0,5psi; *T:* 23°C; *C<sub>PAS1,3k</sub>:* 0,5 mg/ml; *UV:* 254nm

### 3.2.3 Vergleich zwischen CCD und IUV für die Trennung von PAS1,3k mit dem Arginin/Sorbinsäure-Puffer AS6

Die Arginin/Sorbinsäure- bzw Histidin/Sorbinsäure-Puffer haben sich als sehr effektive Elektrolytsysteme zur Trennung von Polyacrylsäuresalzen erwiesen. Sie können sowohl in der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion als auch in der indirekten UV-Detektion eingesetzt werden. Für beide Detektionsmodi liefern sie hervorragende Ergebnisse. Da der kontaktlose Leitfähigkeitsdetektor (C<sup>4</sup>D-Detektor) „on-column“ vor dem UV-Detektor angebracht wurde, können durch die Verwendung dieser Puffersysteme beide Detektorsignale innerhalb einer elektrophoretischen Trennung gleichzeitig aufgezeichnet werden. Zum Vergleich der beiden Detektorsignale wurde die elektrophoretische Trennung der Probe PAS1,3k mit dem AS6-Puffer in einer unbeschichteten Quarzglaskapillare mit einer Gesamtlänge von 31 cm und einem Innendurchmesser von 50  $\mu$ m bei einer angelegten Spannung von 10 kV durchgeführt.

In Abb. 42 sind die die Detektorsignale dieser Trennung dargestellt.

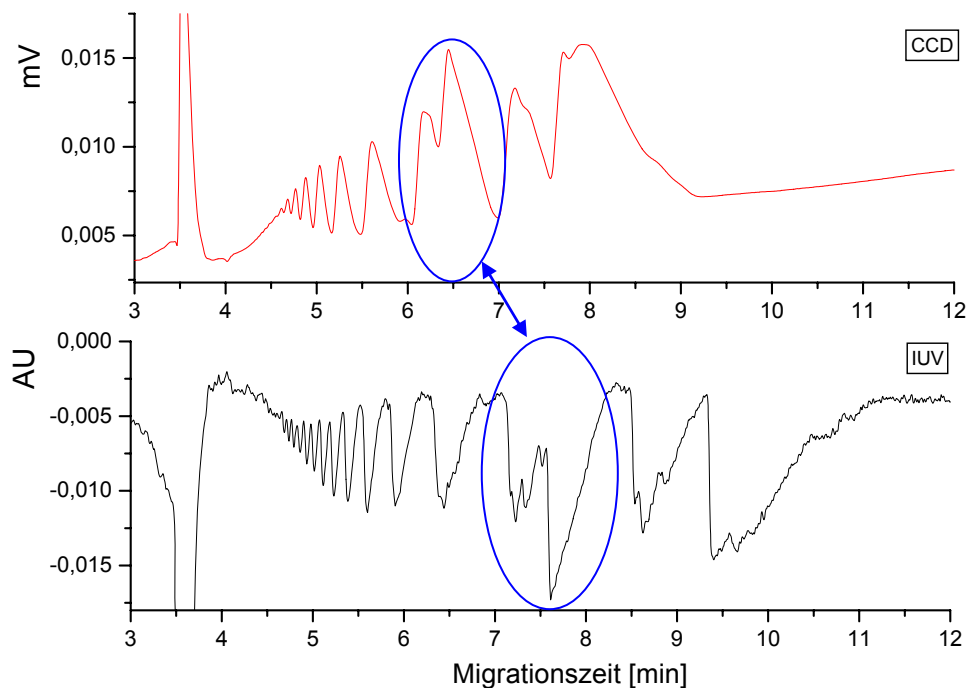


Abb. 42: Elektropherogramme der Probe PAS1,3k  
 Rot: Leitfähigkeitsdetektion (CCD); schwarz: Indirekte UV-Detektion (IUUV)

Man erkennt, dass die Peakintensitäten für beide Detektionsmodi annähernd gleich sind. Die offensichtlich besser getrennten Signale in der indirekten UV-Detektion lassen sich dadurch erklären, dass der UV-Detektor ca. 4 cm hinter dem CCD angeordnet ist. Bei einer Kapillarlänge von 31cm macht dies eine ca. 12% längere Trennstrecke aus, die der indirekten UV-Detektion zur Verfügung steht. Diese zusätzliche Trennstrecke ist der Grund für die besser getrennten Peaks in der indirekten UV-Detektion. Konstruktionsbedingt ist es bei den verwendeten Elektrophoresegeräten nicht möglich, die Reihenfolge der Detektoren umzukehren.

### 3.2.4 Vergleich der elektrophoretischen Trennung von PAS1,3k und PMAS1,2k

In der folgenden Untersuchung wurden die elektrophoretischen Trennungen von PAS1,3k und PMAS1,2k miteinander verglichen. Aufgrund der Methylgruppen in Polymethacrylsäuresalzen, ergibt sich ein anderes Ladungs-zu-Radius-Verhältnis gegenüber den Polyacrylsäuresalzen. Die Trennungen sollten daher unterschiedlich ausfallen. Die Messungen wurden in einer unbeschichteten Quarzglas Kapillare mit einer Gesamtlänge von 60 cm und einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  bei einer angelegten Spannung von 7 kV durchgeführt. Als Elektrolyt wurde ein AS30-Puffer verwendet. Es wurden pro Messung sowohl das Leitfähigkeitssignal als auch das indirekte UV-Signal aufgenommen. In den Abb. 43 und 44 sind die Elektropherogramme von PAS1,3k (schwarz) und PMAS1,2k (rot) dargestellt. Für die PAS-Probe erhält man die zu erwartende Oligomerenauftrennung mit scharfen und teilweise basisliniengetrennten Signalen. Im Vergleich hierzu kommt es bei der PMAS-Probe zu keiner nennenswerten Auftrennung. Die zu erwartenden Oligomeren signale sind nur sehr schwach ausgeprägt. Der zusätzlich auftretende Peak bei 48 min kann bisher nicht zugeordnet werden. In Abb. 45 ist der Oligomerenbereich der beiden Proben nochmals vergrößert dargestellt.

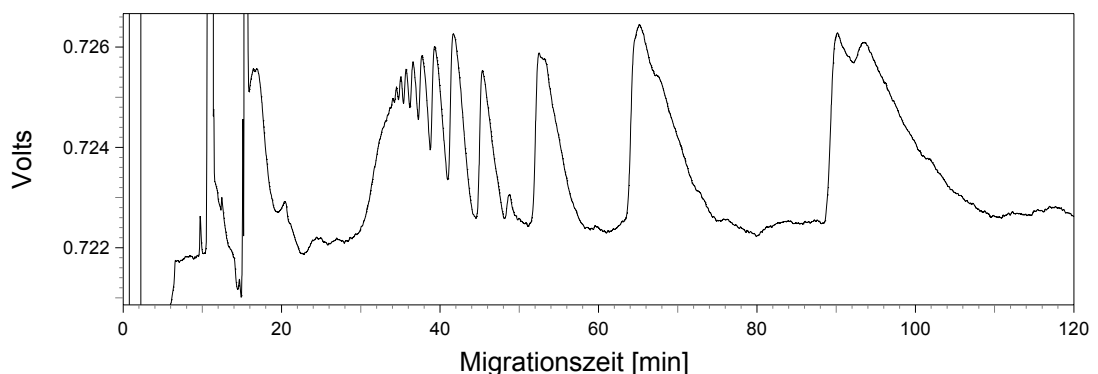


Abb. 43: Elektropherogramm der Probe PAS1,3k (schwarz); Leitfähigkeitsdetektor

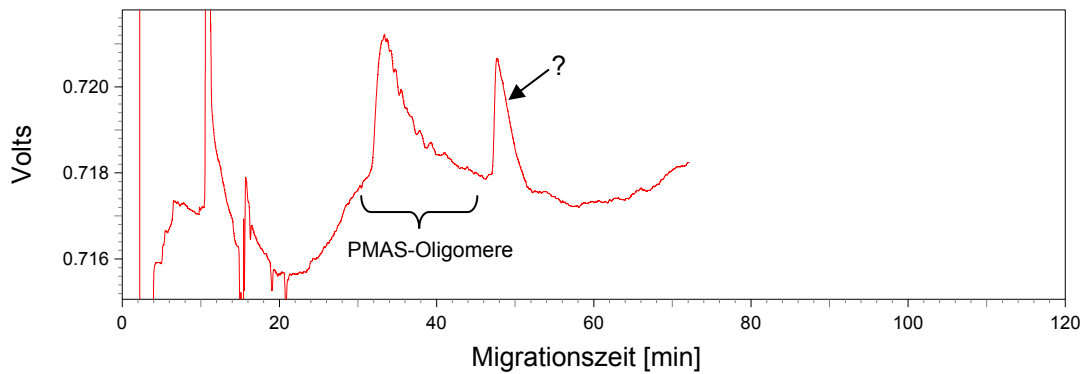


Abb. 44: Elektropherogramm der Probe PMAS1,2k (rot); Leitfähigkeitsdetektor

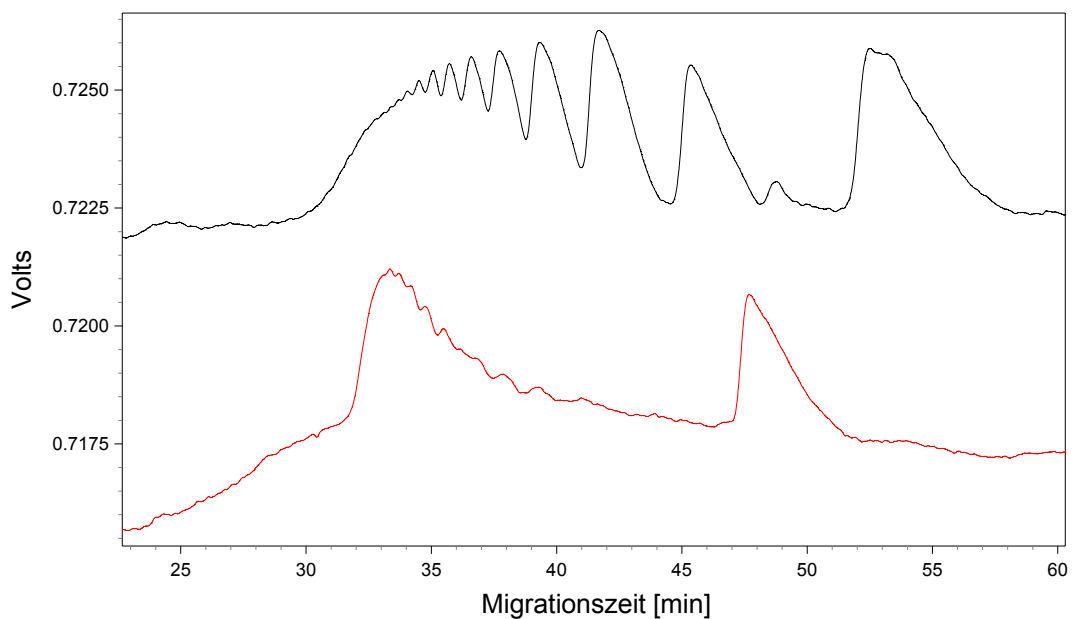


Abb. 45: Vergrößerte Darstellung des Oligomerenbereichs der Proben PAS1,3k (schwarz) und PMAS1,2k (rot)

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, erkennt man aufgrund der Detektoranordnung eine verbesserte Auftrennung im IUV-Detektor. Hierzu sind in den Abb. 46 und 47 die mit der IUV aufgezeichneten Elektropherogramme der beiden Proben dargestellt. In Abb. 48 ist der Oligomerenbereich ebenfalls vergrößert dargestellt. Für PMAS1,2k erkennt man jetzt ebenfalls eine Oligomerauftrennung. Die Peaks liegen wesentlich enger zusammen und sind nicht basisliniengetrennt. Der im IUV-Signal zusätzlich auftretende Peak bei einer Migrationszeit von 30 min weist auf einen höhermolekularen PMAS-Anteil hin, der erst aufgrund der längeren Trennstrecke von der PMAS-Hauptverteilung separiert werden konnte.

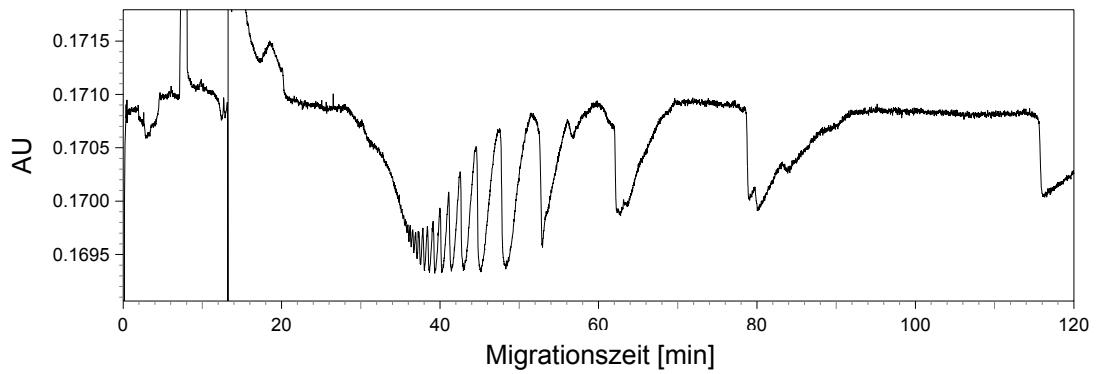


Abb. 46: Elektropherogramm der Probe PAS1,3k (schwarz); indirekte UV-Detektion

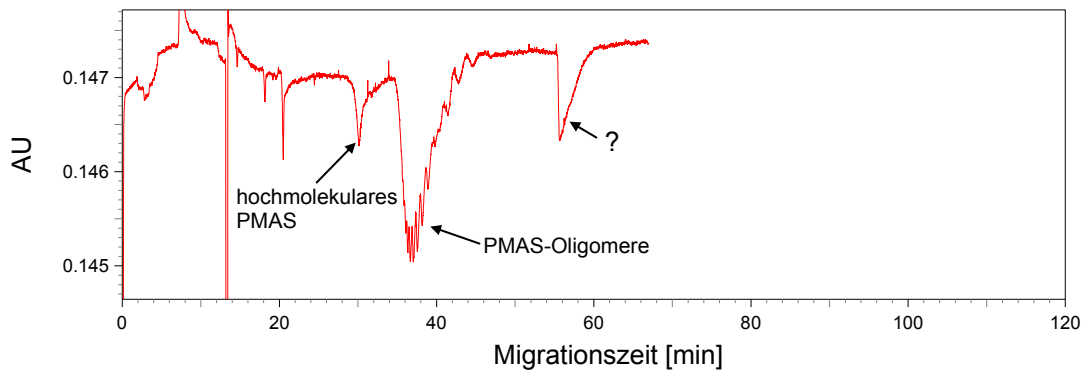


Abb. 47: Elektropherogramm der Probe PMAS1,2k (rot); indirekte UV-Detektion

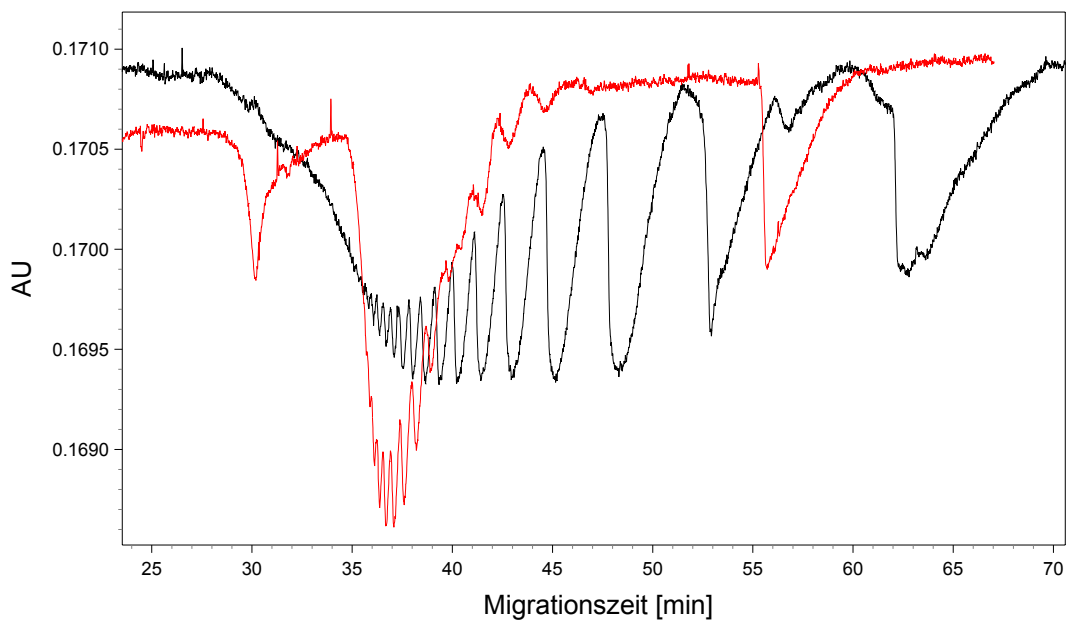


Abb. 48: Vergrößerte Darstellung des Oligomerenbereichs der Proben PAS1,3k (schwarz) und PMAS1,2k (rot)

Aufgrund der nur geringen Unterschiede der pKa-Werte für PMAS (4,26 bei 20°C) und PAS (4,65 bei 20°C) liegen die Proben in dem verwendeten AS-Puffer mit einem pH-Wert von 9 nahezu vollständig dissoziiert vor und weisen somit eine vergleichbare Ladungsdichte auf. Hieraus kann gefolgert werden, dass der Unterschied in den Auftrennungen der PMAS-Probe und der PAS-Probe nicht durch die pKa-Werte der Proben verursacht wird. Für PMAS ergibt sich aufgrund der Methylgruppe ein im Vergleich zu PAS unterschiedliches Ladung-zu-Radius-Verhältnis und folglich eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität.

### 3.2.5 Untersuchung verschiedener Polyacrylsäure-Na-Salze mit der indirekten UV-Detektion

Mit der Untersuchung verschiedener PAS-Proben unterschiedlichen Molekulargewichts sollte der in Abschnitt 2.5.1 beschriebene theoretische Mobilitätsverlauf in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad überprüft werden. Hierzu wurden 7 Standards mit Molekulargewichten von 2.000 g/mol bis zu 585.000 g/mol mit dem AS30-Puffer in einer unbeschichteten Quarzglaskapillare mit einer Gesamtlänge von 60 cm und einem Innendurchmesser von 75 µm bei einer angelegten Spannung von 7 kV analysiert. In den Abb. 49 bis 55 sind die Elektropherogramme der Proben gezeigt.

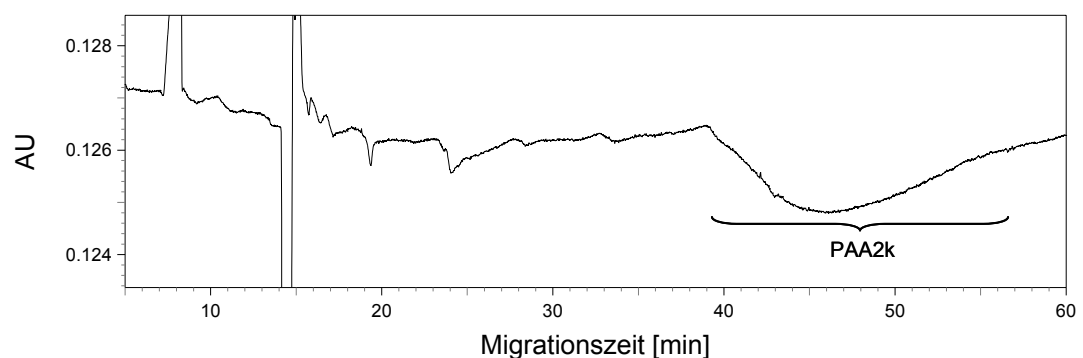


Abb. 49: Elektropherogramm der Probe PAS2k  
Puffer: AS30; U: 7kV; Inj: 5 x 0,3psi; c=1,5 mg/ml

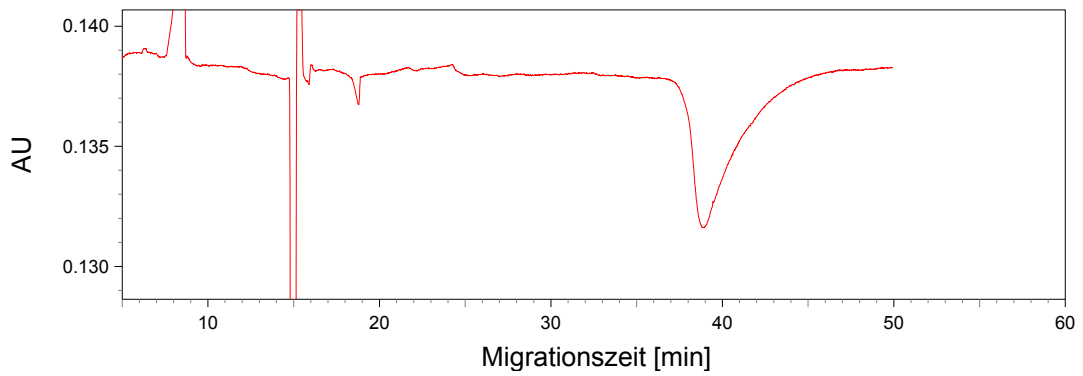


Abb. 50: Elektropherogramm der Probe PAS8k  
Puffer: AS30; U: 7kV; Inj: 5 x 0,3psi; c=1,5 mg/ml

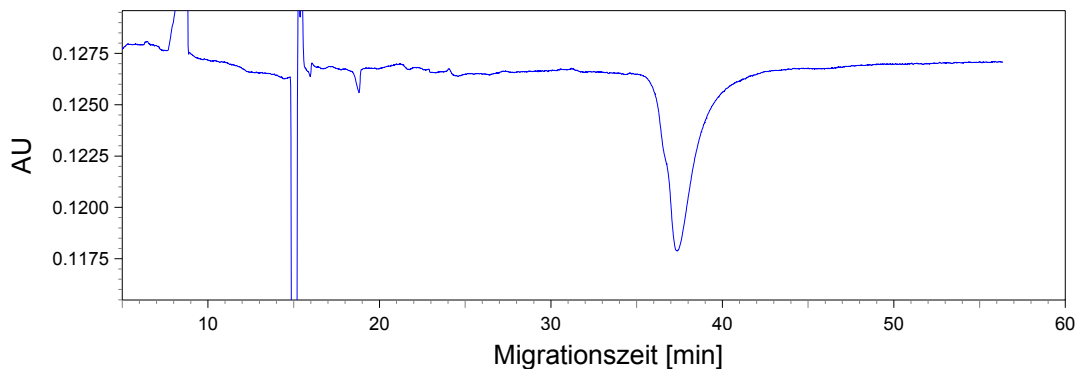


Abb. 51: Elektropherogramm der Probe PAS18k  
Puffer: AS30; U: 7kV; Inj: 5 x 0,3psi; c=1,5 mg/ml

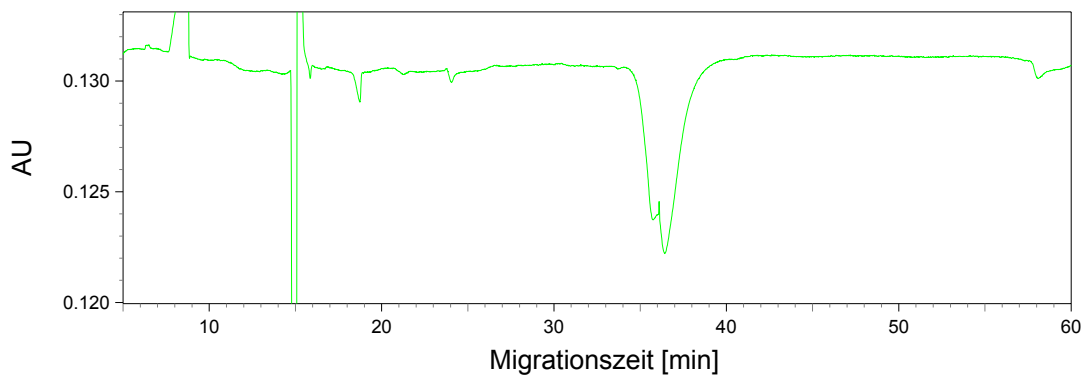


Abb. 52: Elektropherogramm der Probe PAS35k  
Puffer: AS30; U: 7kV; Inj: 5 x 0,3psi; c=1,5 mg/ml

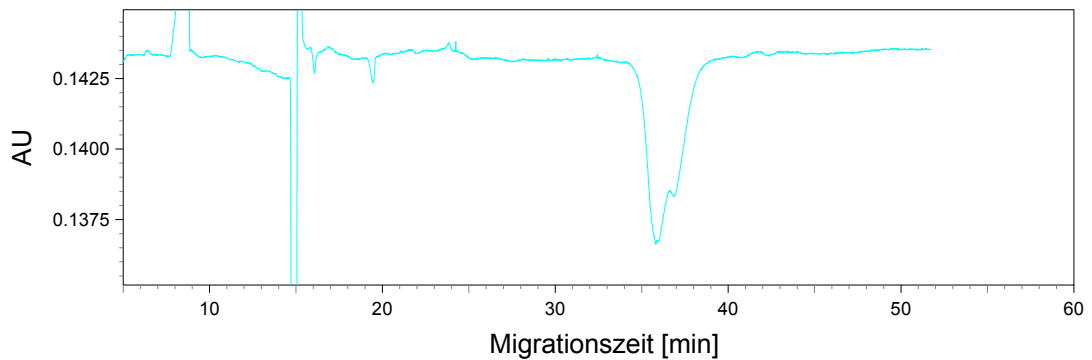


Abb. 53: Elektropherogramm der Probe PAS85k  
Puffer: AS30; U: 7kV; Inj: 5 x 0,3psi; c=1,5 mg/ml

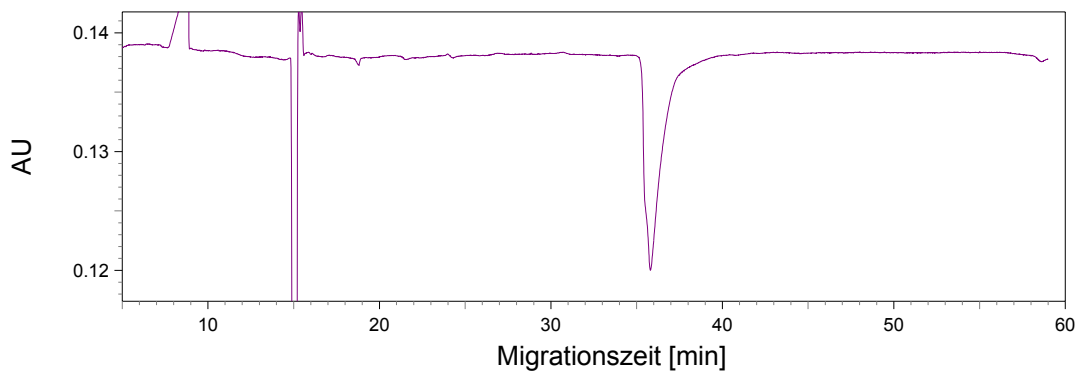


Abb. 54: Elektropherogramm der Probe PAS245k  
Puffer: AS30; U: 7kV; Inj: 5 x 0,3psi; c=1,5 mg/ml

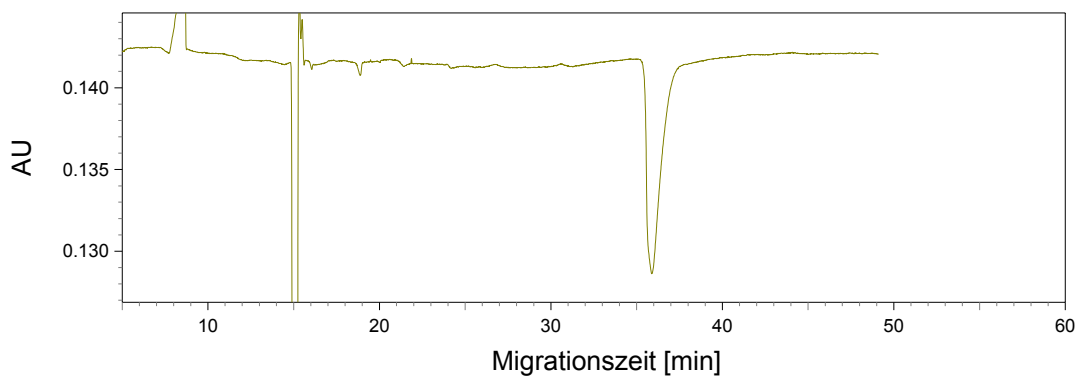


Abb. 55: Elektropherogramm der Probe PAS585k  
Puffer: AS30; U: 7kV; Inj: 5 x 0,3psi; c=1,5 mg/ml

Man erkennt, dass die Proben PAS35k und PAS85k bimodale Verteilungen aufweisen. Die Proben spalten in zwei unterschiedliche Molekulargewichtsbereiche auf. Auch die Probe PAS18k weist eine schwache Schulter auf. Diese lässt ebenfalls auf eine bimodale Verteilung schließen. Dies erschwert im Weiteren die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilitäten, da eine

exakte Molmassenbestimmung der Peakmaxima der bimodalen Verteilungen aus den CE-Experimenten nicht möglich ist. Zur Auswertung der elektrophoretischen Mobilitäten wurden jeweils die Peakmaxima der Hauptverteilung herangezogen. Die Peakform der einzelnen PAS-Standards lässt sich mit der in Abschnitt 2.5.1, Abb. 6 dargestellten Mobilitätskurve korrelieren. So erwartet man für kleine Molmassen relativ breite und schwache Peaks wie dies für die Probe PAS2k zu beobachten ist. Für kleine Molmassen befindet man sich im Bereich der Stäbchenkonformation. Hier macht sich eine Änderung des Ladung-zu-Radius-Verhältnisses mit Zunahme der Anzahl an Wiederholungseinheiten deutlich bemerkbar. Es kommt zur Auftrennung der einzelnen Oligomere. Dies konnte anhand der Probe PAS1,3k verdeutlicht werden. Für die Probe PAS2k (Abb. 49) erhält man zwar keine Oligomerenauftrennung mehr, jedoch kommt es aufgrund der unterschiedlichen Mobilitäten der einzelnen Polymerketten zu dem beobachteten breiten Signal mit einem Peakmaximum bei 46 min. Mit zunehmendem Molekulargewicht gehen die Makromoleküle von der Stäbchenkonformation in die Knäuelkonformation über. Hier ist der Unterschied in den Mobilitäten in Abhängigkeit von der Anzahl an Wiederholungseinheiten innerhalb eines PAS-Standards nur noch gering. Die Peaks werden immer schmaler und intensiver. Dieser Trend ist bei den Proben PAS8k bis PAS585k deutlich zu erkennen und stimmt soweit mit der theoretischen Betrachtung überein. Betrachtet man die Migrationszeiten im Peakmaximum, erkennt man, dass für die Proben PAS1,3k bis PAS85k die Migrationszeiten bzw. die elektrophoretischen Mobilitäten mit der in Abschnitt 2.5.1 diskutierten Theorie übereinstimmen. Im Bereich der Oligomere erhält man einen Anstieg der Mobilität in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad. Hierbei durchläuft die Mobilitätskurve ein Maximum bei einem Polymerisationsgrad von ca.  $N=15$ . Für den Bereich der Polymerisationsgrade von  $N=15 - 900$  erhält man eine exponentielle Abnahme der Mobilität. Für Polymerisationsgrade größer  $N=900$  wird der Wert für die Mobilität konstant. In Abb. 56 sind die Elektropherogramme nochmals in einer Overlay-Darstellung zur besseren Verdeutlichung dieses Effektes gezeigt. In Abb. 57 sind die experimentell ermittelten Migrationszeiten in graphischer Form dargestellt.

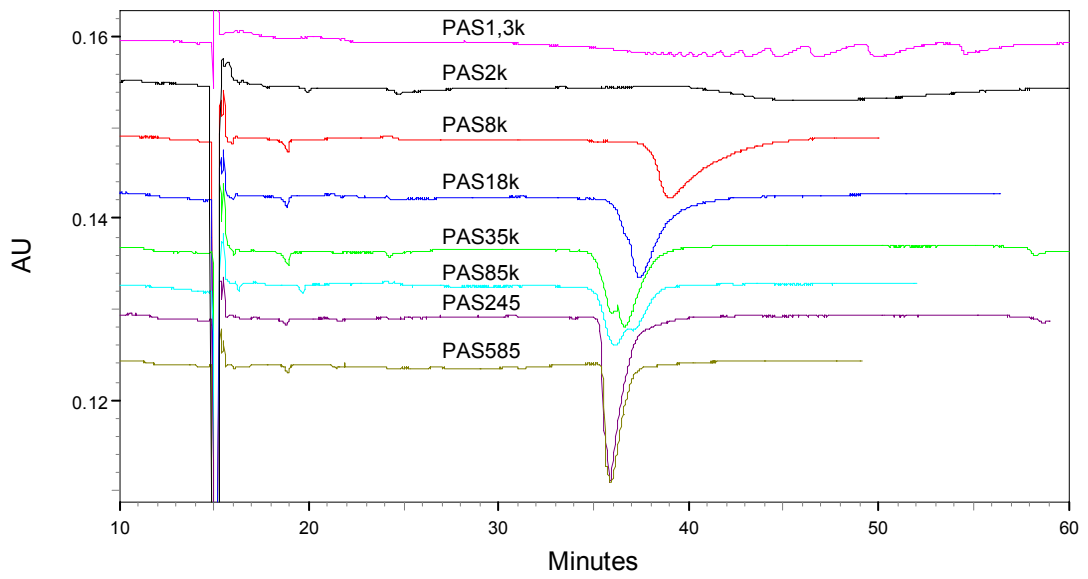


Abb. 56: Overlay der 8 PAS-Standards  
 PAS1,3k(rosa), PAS2k (schwarz), PAS8k (rot), PAS18k (blau), PAS35k (grün),  
 PAS85k (türkis), PAS245k (violett) und PAS585k (braun)

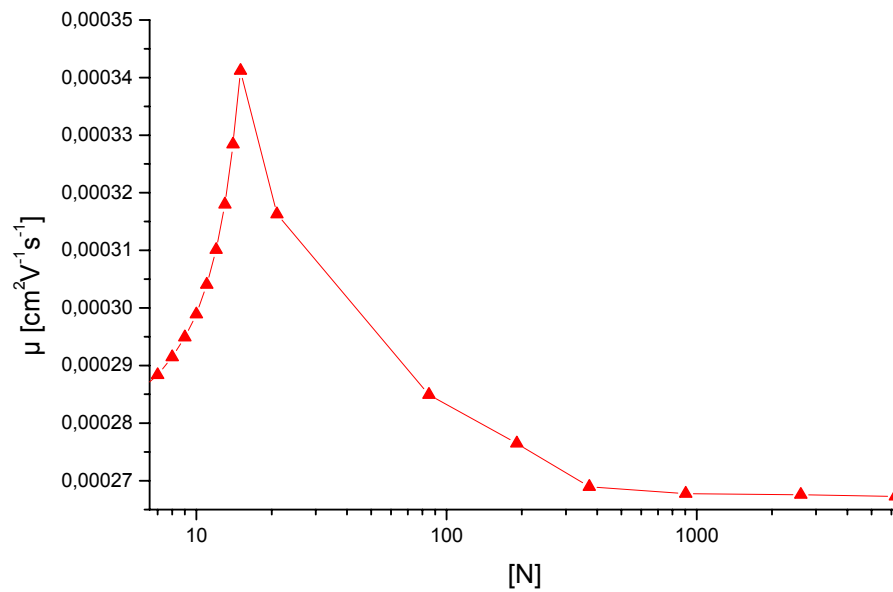


Abb. 57: Verlauf der elektrophoretischen Mobilität in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad

### 3.2.6 Bestimmung der Nachweisgrenze der indirekten UV-Detektion

Im Folgenden wurde versucht, die experimentelle Nachweisgrenze bei der Trennung und Detektion von Polyacrylsäuresalzen für die indirekte UV-Detektion in Abhängigkeit von der injizierten Probenmenge zu bestimmen. Es wurden verschiedene Konzentrationen eines hochmolekularen Polyacrylsäure-Na-Salzes in einem Histidin/Sorbinsäure-Puffer (HS15) untersucht. Die Trennungen wurden in einer unbeschichteten Quarzglaskapillare mit einer Länge von 42 cm und einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  bei einer Spannung von 15 kV durchgeführt. Das indirekte UV-Signal wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgezeichnet. Als Probe kam ein Polyacrylsäuresalz mit einem mittleren Molekulargewicht von 245.000 g/mol (PAS245k) zum Einsatz. Die aufgegebenen Probenvolumina wurden nach folgender Formel bestimmt:

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L_{\text{ges}}} \quad (3.1)$$

mit:  $\Delta P$  = Druckdifferenz entlang der Kapillare [Pa]  
 $d$  = Kapillarinne Durchmesser [m]  
 $t$  = Injektionszeit [s]  
 $\eta$  = Viskosität des Puffers [Pa\*s]  
 $L_{\text{ges}}$  = Gesamtkapillarlänge [m]

Über das injizierte Probenvolumen ( $V$ ) wurde dann die aufgegebene Probenmenge in Nanogramm berechnet. In Tabelle 4 sind die eingesetzten Konzentrationen, die Druckdifferenz, die Injektionszeit, das injizierte Probenvolumen und die aufgegebenen Probenmengen gezeigt.

<b>c</b> <b>[mg/ml]</b>	<b><math>\Delta P</math></b> <b>[psi]</b>	<b>t</b> <b>[s]</b>	<b>V</b> <b>[nl]</b>	<b>Probenmenge</b> <b>[ng]</b>
0,8	0,5	5	1,3	5,2
0,4	0,5	5	1,3	2,6
0,2	0,5	5	1,3	1,3
0,1	0,5	5	1,3	0,65

Tab. 4: Konzentrationen (c), Druckdifferenz ( $\Delta P$ ), Injektionszeiten (t), injiziertes Volumen (V) und Probenmengen für PAS245k

In Abb. 58 sind die Elektropherogramme für die verschiedenen Probenmengen dargestellt.

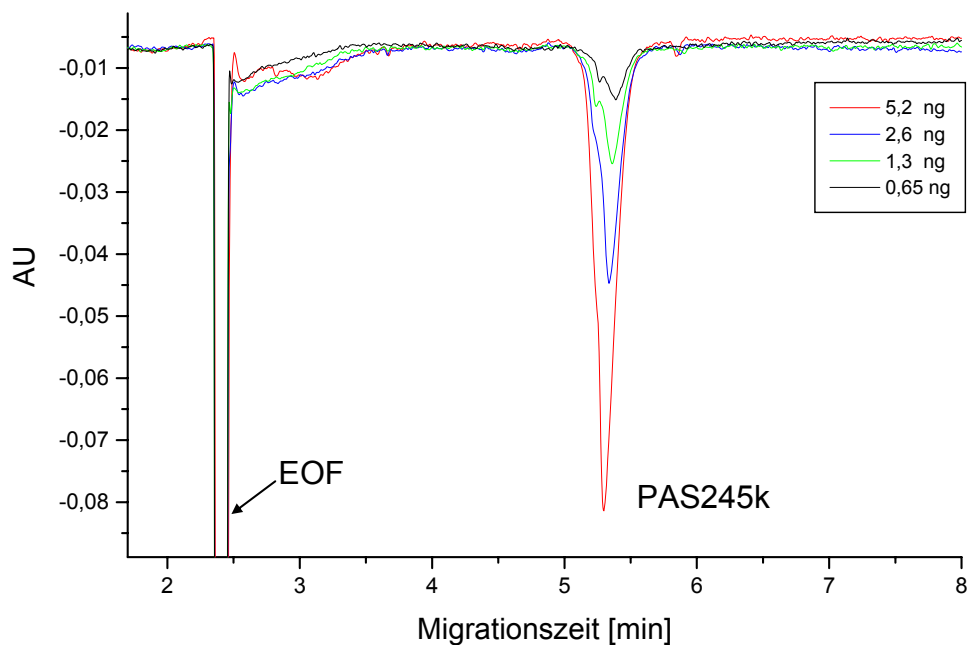


Abb. 58: Elektropherogramme der Probe PAS245k in Abhängigkeit von der aufgegebenen Probenmenge

**Rot:** 5,2 ng; **blau:** 2,6 ng; **grün:** 1,3 ng und **schwarz:** 0,65 ng

*Kapillare:* 35/42 cm L x 50 µm ID, unbeschichtet

*Puffer:* 15 mM Histidin / 7,5 mM Sorbinsäure; pH 5,5

*U:* 15 kV; *Inj:* 5 x 0,5psi; *UV:* 254nm; *T:* 23°C

In Abb. 58 ist die Abnahme der Peakintensität mit abnehmender Probenmenge deutlich zu sehen. Man erkennt, dass eine injizierte Substanzmenge von 650 pg noch ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist. Der Probenpeak weist bei einer injizierten Menge von 5,2 ng eine symmetrische Form auf. Mit abnehmender Probenmenge wird jedoch ein zweiter Peak sichtbar, der auf eine bimodale Verteilung der Probe schließen lässt. Man erkennt anhand der Auftrennung der bimodalen Verteilung, dass für abnehmende Probenmengen die Trenneffizienz zunimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass es für das vorliegende Trennsystem bei injizierten Probenmengen von mehr als 1,3 ng zur Überladung der Kapillarsäule und damit zur Herabsetzung der Trenneffizienz kommt.

### 3.3 Methodenentwicklung zur Charakterisierung und Detektion UV-transparenter segmentierter Copolymerer

#### 3.3.1 Indirekte UV-Detektion von segmentierten Copolymeren

##### a) Copolymerer aus Methacrylsäure und PEG-Makromonomer

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Trennung, Detektion und Charakterisierung segmentierter Copolymerer entwickelt werden. Hierbei handelt es sich um Copolymerer aus Methacrylsäure und MPEG-Makromonomeren (MAS-MPEG). Das Makromonomer wird durch Veresterung des Polyethylenglycol-Monomethylethers (MPEG) mit Methacrylsäure hergestellt. In Abb. 59 ist die mittlere chemische Struktur dieser Copolymerer dargestellt.

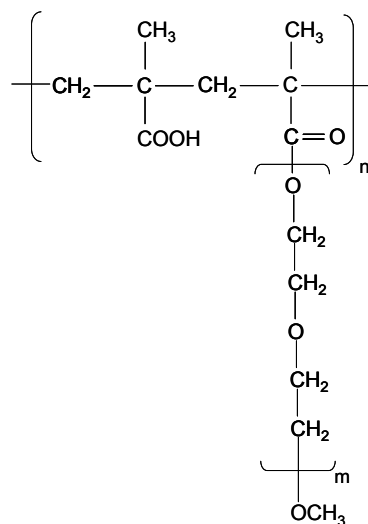


Abb. 59: Mittlere chemische Struktur der Copolymerer 1-3

Die Molmasse des Makromonomeren beträgt ca. 1000 g/mol, die Copolymerisation mit Methacrylsäure erfolgt in den Massenverhältnissen 90 % MPEG:10 % MAS, 80 % MPEG:20 % MAS und 70 % MPEG:30 % MAS. Für die Untersuchungen standen die Proben **1** (90:10), **2** (80:20) und **3** (70:30) der BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland, zur Verfügung.

Da sich die Pufferkombination aus Sorbinsäure und Arginin zur Trennung und Detektion der Polyacrylsäure im IUV-Modus als sehr effektiv erwiesen hat, wurde dieser Puffer zur Analyse der Copolymerer eingesetzt. In Abb. 60

sind die Elektropherogramme der drei Copolymere gezeigt. Die Copolymere eluieren im Bereich von 4 – 6 min. Man erkennt, dass die Trennung entsprechend den unterschiedlichen Anteilen an Methacrylsäure erfolgt. Die Ladungsdichte nimmt mit wachsendem MAS-Anteil zu. Die effektive Wanderungsgeschwindigkeit der Analytionen setzt sich aus der Vektoraddition der absoluten Wanderungsgeschwindigkeit des Analytions und der Geschwindigkeit des EOF zusammen. Da im vorliegenden Trennmodus die Geschwindigkeitsvektoren der Analytionen und des EOF entgegengesetzt sind, eluiert die Probe mit der geringsten Ladungsdichte (**1**) zuerst. Im Migrationsbereich von 10 – 15 min ist eine weitere Peakverteilung zu sehen, deren Hauptpeak bei ca. 13 min liegt. Die Intensität dieser Peaks nimmt mit zunehmendem Methacrylsäuregehalt der Copolymere zu. Dies lässt vermuten, dass es sich hierbei um Methacrylsäure-Homopolymere handelt. Eventuell nicht umgesetztes MPEG wird zusammen mit allen anderen ungeladenen Komponenten mit dem EOF bei 2,6 min eluiert.

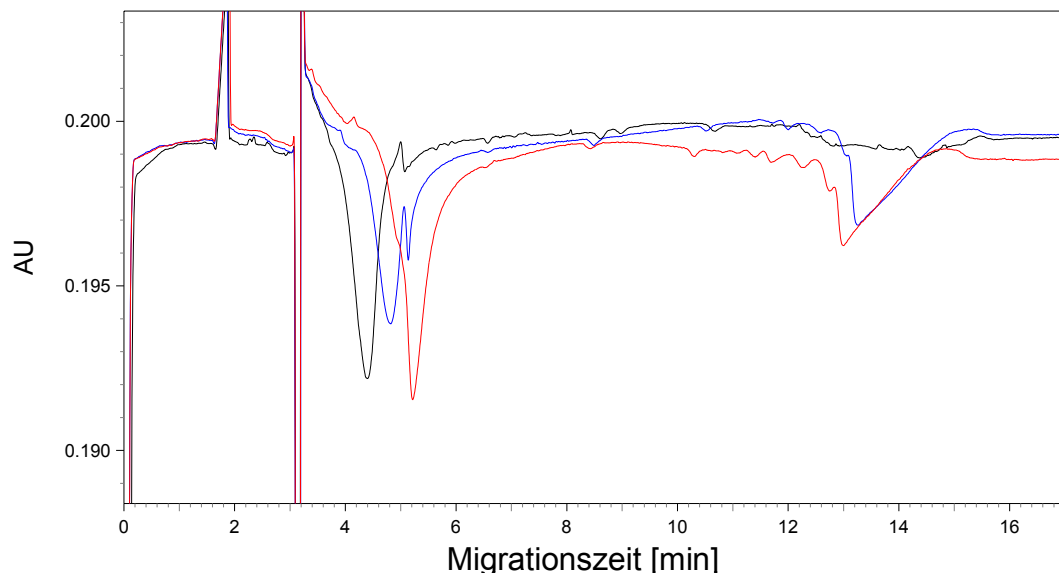


Abb. 60: Elektropherogramme der Proben **1** (schwarz), **2** (blau) und **3** (rot)  
*Kapillare:* L:30 cm, ID: 50  $\mu$ m; unbeschichtet  
*Puffer:* 12 mM Sorbinsäure / 24 mM Arginin, pH: 9  
*U:* 10 kV; *Inj:* 10s x 0,3 psi; *UV:* 254 nm; *T:* 20°C

## b) PEG-g-MAS - Pfropfcopolymere

In einer weiteren Messreihe wurde das obige Trennsystem auf PEG-g-MAS - Pfropfcopolymere angewendet. Diese werden durch radikalische Pfropfung von Methacrylsäure (MAS) auf Polyethylenglycol hergestellt. In Abb. 61 ist die mittlere chemische Struktur dieser Copolymere dargestellt.

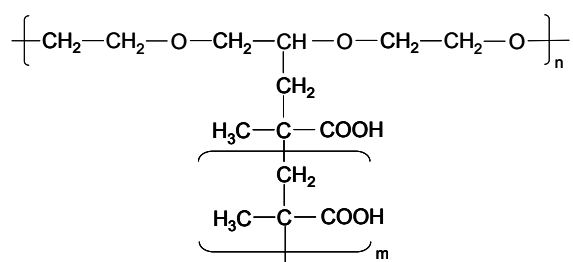


Abb. 60: Mittlere chemische Struktur der Pfropfcopolymere 4-7

Bei den Polyethylenglycolen **P1** - **P4** handelt es sich um Proben mit Molmassen von  $M_w=600$  g/mol (**P1**),  $M_w=1500$  g/mol (**P2**),  $M_w=4000$  g/mol (**P3**) und  $M_w=6000$  g/mol (**P4**) der Firma BASF, Ludwigshafen, Deutschland. Die Massenverhältnisse bei der Pfropfung betragen MAS/PEG 30:70. Bei den eingesetzten Proben handelt es sich um die Copolymere **4** - **7**. Die Bezeichnung und die Zusammensetzung dieser Proben werden in Tabelle 5 gezeigt.

Probe	4	5	6	7
MAS/PEG	MAS/P1	MAS/P2	MAS/P3	MAS/P4
[%w/w]	30/70	30/70	30/70	30/70

Tab. 5: Zusammensetzung und Bezeichnung der Copolymere

Hier sollte die Trennung nach der Molmasse der Copolymeren erfolgen. Da das Verhältnis von PEG zu MAS für die vier Copolymerproben gleich ist, sollten die Ladungsdichten ähnlich groß sein. Aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der eingesetzten PEG erhält man unterschiedliche Molekülradien für die Copolymere. Da die elektrophoretische Mobilität durch das Verhältnis von Ladung-zu-Radius bestimmt wird, sollte es möglich sein, diese vier Copolymere in der CE zu trennen.

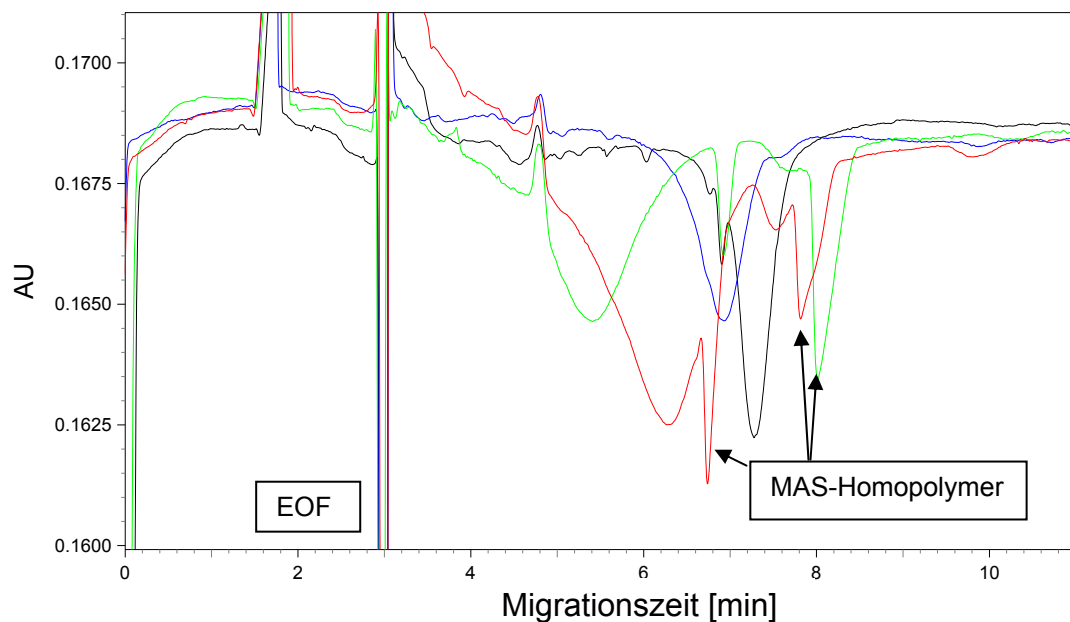


Abb. 62: Migrationsreihenfolge der Copolymere **7** (grün), **6** (rot), **5** (blau) und **4** (schwarz)  
*Kapillare:* L:30 cm, ID: 50  $\mu$ m; unbeschichtet  
*Puffer:* 12 mM Sorbinsäure / 24 mM Arginin, pH: 9  
*U:* 10 kV; *Inj:* 10s x 0,3 psi; *UV:* 254 nm; *T:* 20°C

Die in Abb. 62 dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass die Trennung mit dem Molekulargewicht des eingesetzten ungeladenen PEG korreliert. Man erkennt, dass die Migrationszeiten mit abnehmendem Molekulargewicht des eingesetzten PEG zunehmen. Die elektrophoretischen Mobilitäten der Copolymere nehmen, wie zu erwarten, mit zunehmendem Molekulargewicht ab. Es eluiert die Probe **7** zuerst. Diese Probe weist aufgrund des Molekulargewichts des eingesetzten PEG (**P4**,  $M_w=6000$  g/mol) den größten Molekülradius und damit die niedrigste Mobilität auf. Die Probe **6** weist eine bimodale Verteilung mit den Peakmaxima bei 6,2 min und 7,5 min auf. Dies

weist auf zwei unterschiedliche Copolymerzusammensetzungen hin. Ursache hierfür kann zum einen ein unterschiedliches Molekulargewicht des eingesetzten PEG bei gleicher Ladungsdichte, zum anderen eine bei gleichem PEG-Molekulargewicht deutlich unterschiedliche Ladungsdichte sein. Die genaue Ursache dieser bimodalen Verteilung der Probe **6** konnte bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden. Bei den relativ schmalen und intensiven Peaks bei 6,8 min und 7,8 min handelt es sich um Methacrylsäure-Homopolymere unterschiedlichen Molekulargewichts.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die indirekte UV-Detektion mit den aus Sorbinsäure, Arginin und Histidin bestehenden Puffern eine vielversprechende Methode zur Charakterisierung segmentierter Copolymere auf Basis von PEG und MAS darstellt.

### **3.3.2 Leitfähigkeitsdetektion von segmentierten Copolymeren**

Neben der IUV bietet auch die kontaktlose Leitfähigkeitsmessung die Möglichkeit zur Detektion UV-transparenter Copolymere. Die Trennungen wurden in einer unbeschichteten Quarzglaskapillare mit einer Länge von 57 cm und einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  bei einer Spannung von 7 kV durchgeführt. Der Detektor wurde in einem Abstand von 15 cm vor dem Kapillarende angebracht. Die für die CCD-Detektion effektive Trennstrecke betrug somit 42 cm. Der UV-Detektor befindet sich 10 cm vor dem Kapillarende. Für die UV-Detektion erhält man somit eine um 5 cm verlängerte Trennstrecke gegenüber dem CCD-Detektor. Als Elektrolyt wurde ein Puffer aus 30 mM Arginin und 15 mM Sorbinsäure mit einem pH-Wert von 9 eingesetzt. In Abb. 63 ist das Elektropherogramm des MAS-g-MPEG-Copolymers **3** dargestellt.

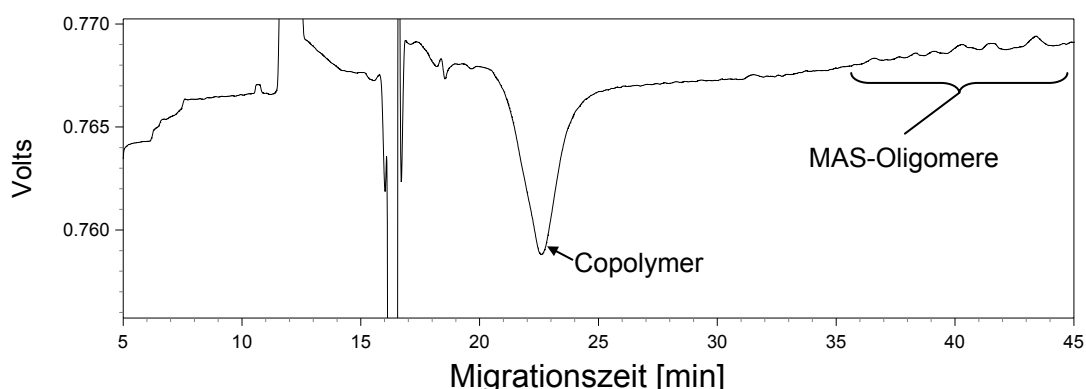


Abb. 63: CCD-Elektropherogramm der Probe 3  
 Puffer: 30 mM Arginin/15 mM Sorbinsäure; pH 9  
 Kapillare: 57 cm L x 75 µm ID, unbeschichtet  
 U: 7 kV; Inj: 10 s x 0,3 psi; T: 20°C

In Abb. 63 ist der breite und intensive negative Copolymerpeak deutlich bei ca. 23 min zu sehen. Die Probe weist eine weitere Peakserie ab 35 min auf. Dieser Bereich ist in Abb. 64 vergrößert dargestellt. Die Peakintensitäten sind relativ schwach, was auf eine sehr geringe Konzentration in der Probe zurückzuführen ist. Hierbei handelt es sich offensichtlich um bei der Reaktion auftretende Nebenprodukte. Zusätzlich zu den Peakintensitäten kann vor allem die Signalrichtung Hinweise auf die Art der Analytionen liefern. Im Gegensatz zum negativen Copolymerpeak weisen die Signale dieser Peakserie eine positive Richtung auf.

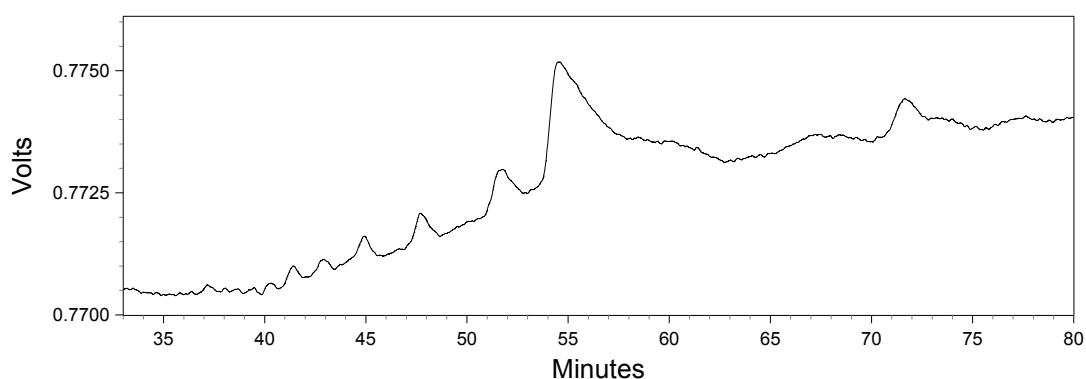


Abb. 64: Vergrößerte Darstellung der Peakserie im Migrationsbereich von 35 - 65 min

In der Leitfähigkeitsdetektion wird die Änderung des Widerstandes innerhalb der Detektorzelle bei Durchgang der Analytionen gemessen. Dies beruht auf einem Verdrängungsmechanismus der Elektrolytionen durch die Analytionen.

Das negative Peaksignal des Copolymerpeaks lässt sich damit erklären, dass das Copolymer zu 70 % aus ungeladenem PEG besteht. Durch die Größe des Copolymermoleküls werden nun pro Volumeneinheit mehr Ladungsträger des Elektrolyten verdrängt, als durch das überwiegend ungeladene Probenmolekül ersetzt werden. Es kommt zu einer Absenkung der Leitfähigkeit, die sich in einem negativen Signal äußert. Die positive Peakrichtung wird hingegen durch eine Erhöhung der Leitfähigkeit hervorgerufen. Dieser Effekt weist auf eine höhere Ladungsdichte pro Volumeneinheit hin. Unter Einbeziehung dieser Effekte und der Migrationszeit kann man davon ausgehen, dass es sich bei der ab 35 min auftretenden Peakserie um MAS-Oligomere handelt.

### 3.3.3 Trennung eines Blends aus MPEG-MAS-Copolymer und MAS-Homopolymer

Um die im vorhergehenden Abschnitt aufgestellten Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Peakrichtungen im CCD-Modus zu überprüfen, wurden Blends aus dem Copolymer **3** und einem Polymethacrylsäure-Na-Salz mit einem mittleren Molekulargewicht von 75.000 g/mol (PMAS75k) hergestellt und untersucht. Die Trennungen wurden wiederum im AS30-Puffersystem in einer Quarzglas Kapillare von 57 cm Länge und einem Innendurchmesser von 75 µm bei einer Spannung von 7 kV durchgeführt. Die Zusammensetzungen der Blends sind in Tabelle 6 gezeigt.

<b>Blend</b>	<b>3</b> Konzentration [g/l]	<b>PMAS75k</b> Konzentration [g/l]
1	4	--
2	4	0,75
3	4	1,5
4	4	2,25

Tab. 6: Zusammensetzung der Blends aus **3** und PMAS75k

In Abb. 65 sind die Elektropherogramme der Einzelmessungen gezeigt. Blend 1 (schwarze Kurve) zeigt den Copolymerpeak bei ca. 23 min sowie die MAS-Oligomerenverteilung ab 35 min. Bei den Kurven für Blend 2 (rot), Blend 3 (blau) und Blend 4 (grün) ist zusätzlich der PMAS75k-Peak bei 28 min zu erkennen. Der PMAS75k-Peak weist eine positive Peakrichtung auf. Die Signalintensitäten nehmen mit zunehmendem PMAS-Anteil im Blend ebenfalls zu. In dem vorliegenden Puffersystem werden das Copolymer und das Homopolymere basisliniengetrennt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass geladene Homopolymere die Leitfähigkeit im System erhöhen und es somit zu positiven Signalen kommt. Mit diesem Experiment konnten die im vorigen Abschnitt erhaltenen Resultate bestätigt werden.

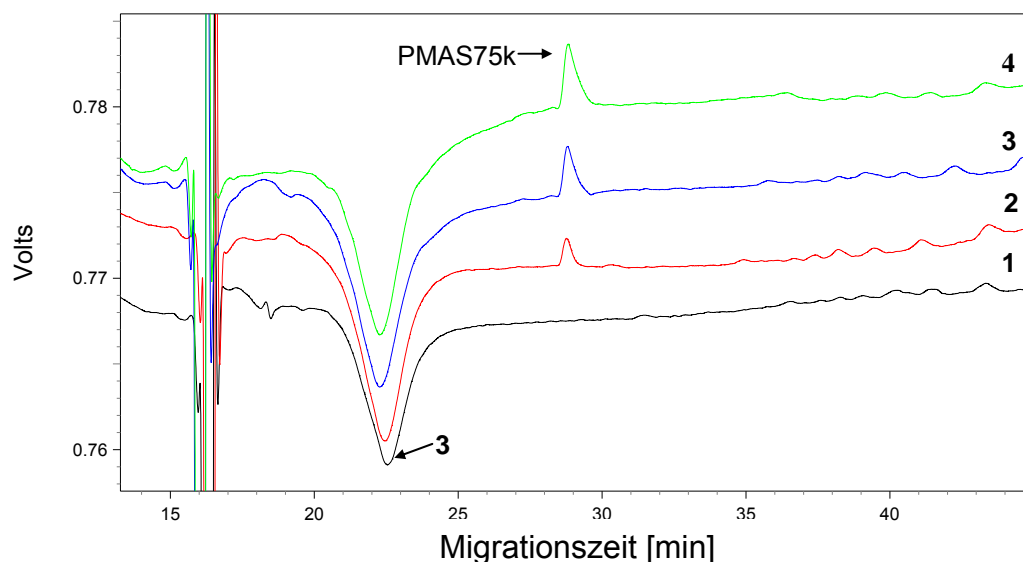


Abb. 65: CCD-Elektropherogramme der Blends 1-4 aus 3 und PMAS75k

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Blends 1-4 unter den gleichen experimentellen Bedingungen mit der indirekten UV-Detektion untersucht. In Abb. 66 sind die Elektropherogramme dieser Messungen dargestellt. In der IUV-Detektion erhält man im Gegensatz zur CCD-Detektion nur negative Peaks. Für Blend 1 (schwarze Kurve) sind dies der Copolymerpeak bei ca. 26 min und die MAS-Oligomerverteilung ab ca. 44 min. Die Elektropherogramme der Blends 2-4 weisen zusätzlich den ebenfalls negativen PMAS75k-Peak bei ca. 35 min auf. Auch hier nimmt die Peakintensität mit dem PMAS-Anteil zu.

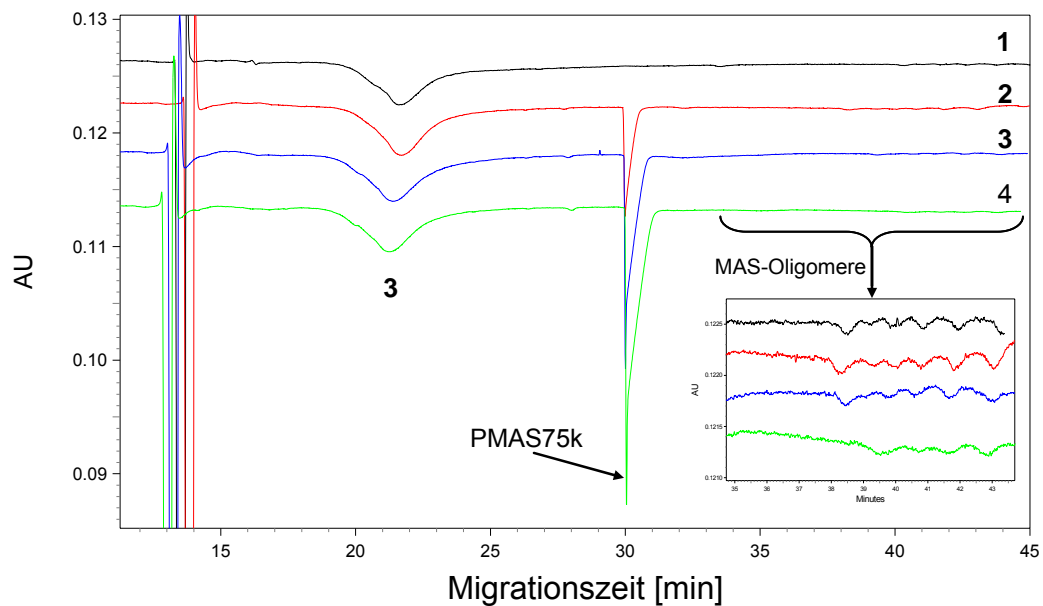


Abb. 66: IUV-Elektropherogramme der Blends 1-4 aus **3** und PMAS75k

Die Signale für das PMAS75k weisen in der IUV eine wesentlich höhere Peakintensität auf als in der CCD. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Unterschiede der Extinktionskoeffizienten des AS-Puffers und der PMAS-Probe wesentlich größer sind als die vergleichbaren Leitfähigkeiten. Da hier ein konzentrierter AS-Puffer mit einer dadurch bedingten relativ hohen Eigenleitfähigkeit verwendet wurde, fallen die Leitfähigkeitsunterschiede dementsprechend geringer aus.

Beide Detektionsverfahren bieten hervorragende Möglichkeiten zur Detektion UV-transparenter Copolymere und Homopolymere. Die CCD enthält durch die unterschiedlichen Peakrichtungen eine zusätzliche Information über die Art des Analyten. So ist bei der Auswertung eines CCD-Elektropherogrammes anhand der Peakrichtung eine Unterscheidung zwischen Copolymer, geladenem Homopolymer und den mit dem EOF eluierenden ungeladenen Bestandteilen möglich. Die IUV bietet aufgrund der größeren Unterschiede in den Extinktionskoeffizienten eine wesentlich empfindlichere Detektion, die es ermöglicht, auch Nebenprodukte in geringen Konzentrationen mit ausreichender Empfindlichkeit zu detektieren.

### 3.4 Methodenentwicklung zur Trennung hochmolekularer Polymethacrylsäure-Na-Salze

Wie in den Abschnitten 2.3.1 und 3.2.5 gezeigt, wird das Ladung-zu-Radius-Verhältnis für hochmolekulare Polyelektrolyte nahezu konstant. Die noch vorhandenen Unterschiede in den elektrophoretischen Mobilitäten sind so gering, dass eine Auftrennung hochmolekularer Proben in der CE nicht möglich ist. In Abb. 67 sind die Einzelmessungen von 7 PMAS-Standards unterschiedlichen Molekulargewichts gezeigt. Die Messungen wurden in einer unbeschichteten Quarzglas Kapillare mit einer Länge von 67 cm und einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  bei einer Spannung von 20 kV durchgeführt. Als Puffer wurde ein 80 mM Natriumboratpuffer mit einem pH-Wert von 9 verwendet. Anhand der Kurvenüberlagerungen erkennt man, dass eine Trennung von PMAS-Standards im CE-Modus oberhalb eines Molekulargewichts von ca. 15.000 g/mol nicht mehr möglich ist.

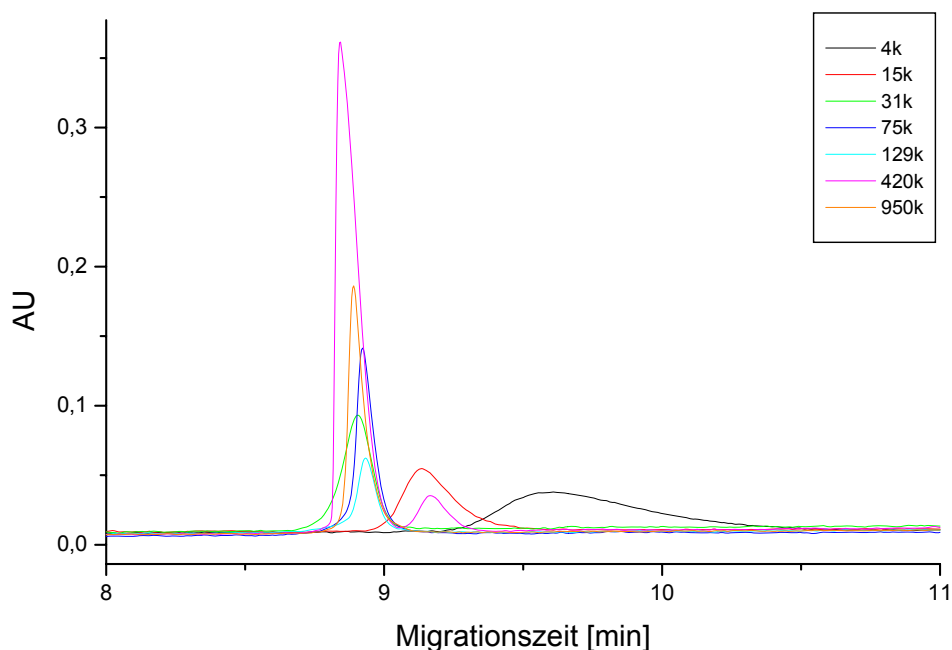


Abb. 67: Einzelmessungen der PMAS-Proben 4k,15k,31k,75k,129k,420k und 950k  
Puffer: 80 mM NaBorat, pH 9  
Kapillare: 67 cm L x 50  $\mu\text{m}$  ID, unbeschichtet  
U: 20 kV; Inj: 9s x 0,5 psi; T: 23°C; UV: 200 nm

Unter Anwendung der in Abschnitt 2.3 beschriebene Gel-Elektrophorese (CGE) sollte eine Auftrennung dieser 7 Komponenten möglich sein. Zur Entwicklung eines optimierten Trennsystems kamen verschieden konzentrierte Natriumborat- Natriumphosphat- und TRIS-Puffer zum Einsatz. Diesen Pufferlösungen wurden Gelbildner in unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 – 10 Gew.%) zugesetzt. Als Gelbildner standen Dextran ( $M_w = 585.000 \text{ g/mol}$ ), Pullulan ( $M_w = 100.000 \text{ g/mol}$ ) und Hydroxyethylcellulosen verschiedenen Molekulargewichts ( $M_w = 90.000 - 2.000.000 \text{ g/mol}$ ) zur Verfügung. Das beste Trennergebnis wurde mit einem 160 mM Natriumboratlösung erreicht, dem 1 Gew.% einer mittelviskosen ( $\sim 1500 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ) Hydroxyethylcellulose zugesetzt wurde. In Abb. 68 ist das Elektropherogramm des aus 7 verschiedenen PMAS-Standards mit Molekulargewichten von 4.000 – 950.000 g/mol zusammengesetzten Blends gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der PMAS-Blend innerhalb von 18 min in die sieben Komponenten aufgetrennt wurde. Im Molekulargewichtsbereich von 15.000 g/mol bis 130.000 g/mol erhält man sogar basisliniengetrennte Peaks. Dies verdeutlicht, dass das eingesetzte Gel in diesem Molekularbereich die beste Trenneffizienz aufweist. Die Trenneffizienz lässt sowohl für höhere als auch niedrige Molekulargewichte nach. Diese unterschiedliche Trenneffizienz wird durch die Maschengröße des Gels verursacht. Wie schon in Abschnitt 2.3 beschrieben, ist die Maschengröße abhängig von der Konzentration des Gelbildners. Die Maschendynamik wird sowohl durch die Konzentration vor allem jedoch durch das Molekulargewicht des Gelbildners bestimmt. Im vorliegenden Fall besagt dies, dass die Maschengröße für die hochmolekularen Proben etwas zu klein, während sie gleichzeitig für die kleinen Probenmoleküle geringfügig zu groß ist. Um nun den hochmolekularen Bereich besser aufzutrennen, wählt man eine geringere Konzentration eines hochmolekularen Gels. Für eine optimierte Trennung im niedermolekularen Bereich würde man hingegen eine konzentriertere Lösung eines niedermolekularen Gels wählen.

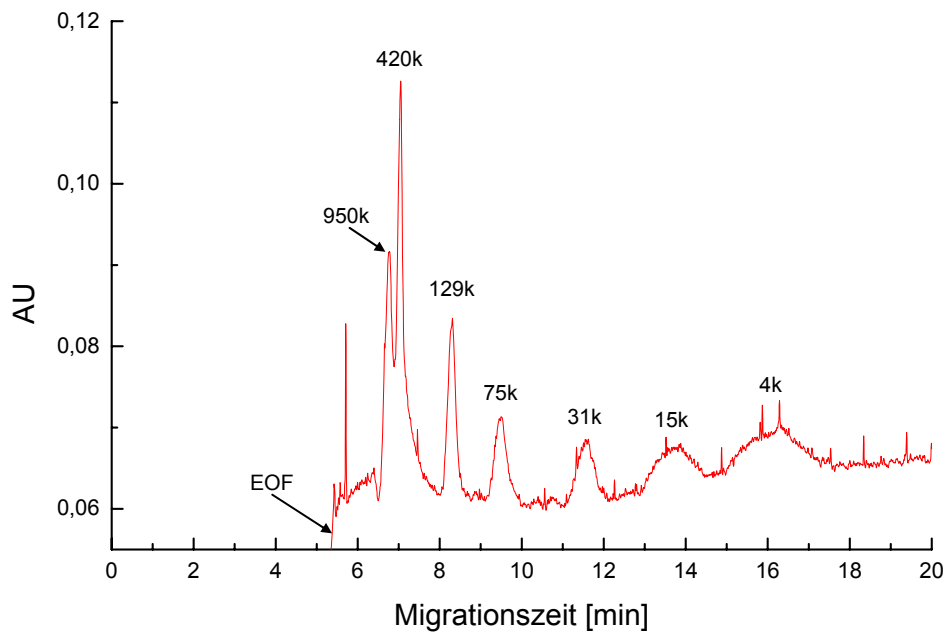


Abb. 68: Trennung von 7 PMAS-Standards mit der CGE  
*Kapillare:* 37 cm L x 75  $\mu$ m ID, unbeschichtet  
*Puffer:* 160 mM Borat + 1 Gew.% HEC<sub>mv</sub>  
*U:* 7 kV; *Inj:* 3 s x 0,5 psi; *T:* 23°C; *UV:* 200 nm

In Abb. 69 ist die Abhängigkeit der Trenneffizienz von der Konzentration des eingesetzten Gelbildners gezeigt. Die Trennungen wurden in einer Quarzglas Kapillare von 37 cm Länge und einem Innendurchmesser von 75  $\mu$ m bei einer Spannung von 7 kV durchgeführt. Als Puffer kam ein 160 mM Natriumboratpuffer mit 1 Gew.%, 0,5 Gew.% und 0,25 Gew.% 2-Hydroxyethylcellulose mit einem mittleren Molekulargewicht von 90.000 g/mol (2-HEC90k) zum Einsatz. Anhand der Auftrennung der hochmolekularen Proben PMAS950k und PMAS420k sowie der niedermolekularen Proben PMAS15k und PMAS4k erkennt man den Einfluss der Gelkonzentration auf die Trenneffizienz. Für den Puffer mit 1 Gew.% 2-HEC90k erhält man eine gute Trennung der beiden niedermolekularen Proben. Die Auftrennung der beiden hochmolekularen Proben ist ausreichend. Die Auftrennung sowohl der hochmolekularen wie auch der niedermolekularen Proben wird mit abnehmender Gelkonzentration deutlich schlechter. Für die Pufferlösung mit 0,25 Gew.% 2-HEC90k erfolgt keine Auftrennung der hochmolekularen sowie der niedermolekularen Proben mehr.

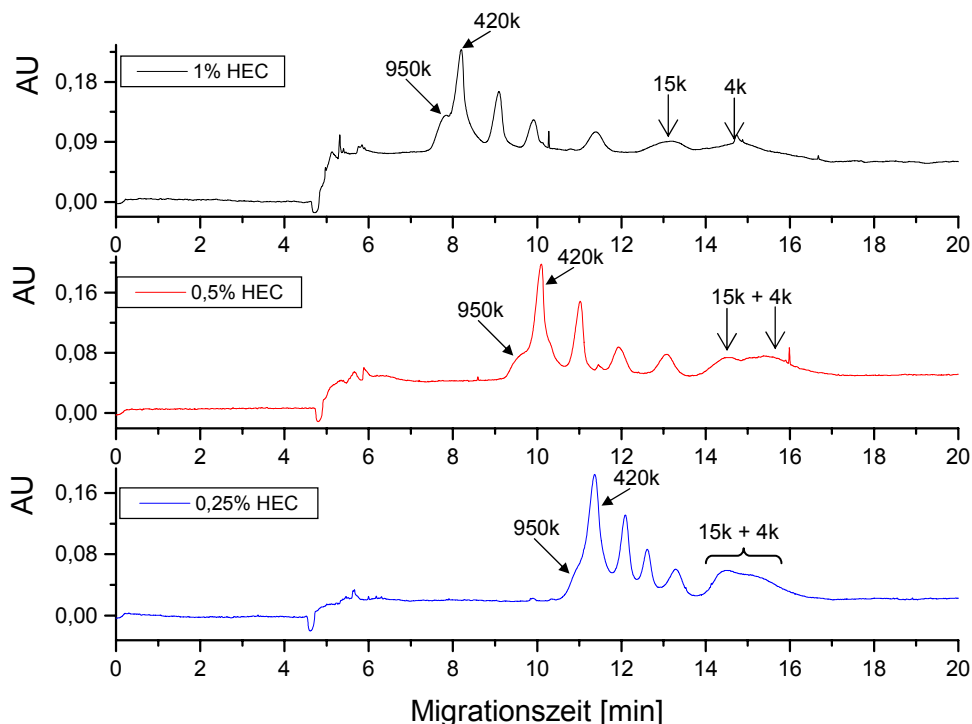


Abb. 69: Abhängigkeit der Trenneffizienz von der Konzentration des eingesetzten Gels  
*Kapillare:* 37 cm L x 75 µm ID, unbeschichtet  
*Puffer:* 160 mM Borat + 1%, 0,5% und 0,25 % 2-HEC90k  
*U:* 7 kV; *Inj:* 3 s x 0,5 psi; *T:* 23°C; *UV:* 200 nm

Wie bereits beschrieben, verringert sich die Trenneffizienz mit abnehmender Gelkonzentration. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Maschengröße mit abnehmender Konzentration zunimmt. Bei entsprechender Verdünnung würde der Siebeffekt des Gels komplett zum Erliegen kommen. Neben der Abnahme der Trenneffizienz beobachtet man eine Zunahme der Migrationszeiten mit abnehmender Konzentration. Das Netzwerk wandert mit der Geschwindigkeit des EOF durch die Kapillare. Aufgrund der größeren Maschenweiten für die geringer konzentrierten Gele können die Analytionen tiefer in das Netzwerk eindringen und werden somit später eluiert. Für den Fall, dass die Maschenweite deutlich kleiner als die Radien der Analytionen wäre, würden alle Moleküle mit dem EOF aus der Säule „geschoben“.

Um die Abhängigkeit der Trenneffizienz vom Molekulargewicht des eingesetzten Gels zu verdeutlichen, wurde ein 160 mM Natriumboratpuffer mit jeweils 1 Gew.% verschiedener HEC-Gele zur Trennung des PMAS-

Blends eingesetzt. Die Molekulargewichte der eingesetzten Hydroxyethylcellulosen betragen 90.000 g/mol (2-HEC90k) und 250.000 g/mol (HEC250k). Die Trennungen wurden ebenfalls in einer Quarzglaskapillare von 37 cm Länge und einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  bei einer Spannung von 7 kV durchgeführt. In Abb. 70 sind die Elektropherogramme in Abhängigkeit vom HEC-Molekulargewicht dargestellt. Man erkennt, dass es kaum einen Unterschied in der Trenneffizienz für den Molekulargewichtsbereich von 4000 g/mol bis 130.000 g/mol gibt. Für die beiden hochmolekularen Proben PMAS950k und PMAS420k erhält man jedoch eine deutlich bessere Trenneffizienz bei Zunahme des Gel-Molekulargewichts. Während für 2-HEC90k keine Trennung der beiden hochmolekularen Proben gelingt, sind die Peakmaxima dieser beiden Proben für das hochmolekulare Gel (HEC250k) deutlich voneinander getrennt. Hier macht sich vor allem die Maschendynamik bemerkbar, die sich in einer gewissen Stabilisierung der gebildeten Maschen aufgrund des höheren HEC-Molekulargewichts äußert.

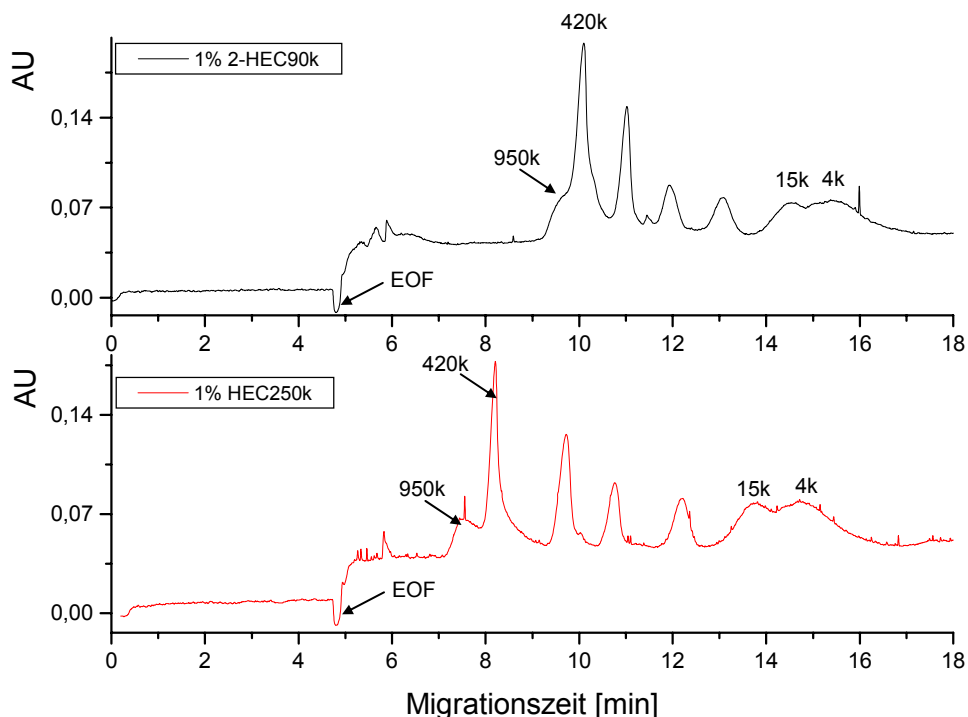


Abb. 70: Abhängigkeit der Trenneffizienz vom HEC-Molekulargewicht  
Kapillare: 37 cm L x 75  $\mu\text{m}$  ID, unbeschichtet  
Puffer: 160 mM Borat + 1% 2-HEC90k und 160 mM Borat + 1% HEC250k  
U: 7 kV; Inj: 3 s x 0,5 psi; T: 23°C; UV: 200 nm

### 3.5 Vergleich zwischen der Trenneffizienz der CE und der CGE bei der Trennung eines Blends aus verschiedenen PMAS- und PSS-Standards

Nach der im Abschnitt 2.5.1 diskutierten Theorie wird die elektrophoretische Mobilität beim Übergang von der Stäbchenkonformation zur Knäuelkonformation unabhängig vom Polymerisationsgrad und hat einen konstanten Wert. Hierbei wird die Mobilität nicht mehr durch das Verhältnis von Ladung-zu-Radius sondern von dem Verhältnis Oberflächenladung-zu-Radius bestimmt. Bei einem Knäuelmolekül werden die innerhalb des Knäuels liegenden Ladungen stark abgeschirmt, so dass sie keinen nennenswerten Beitrag zur elektrophoretischen Mobilität liefern. Hier stellt sich die Frage, ob die elektrophoretische Mobilität für unterschiedliche Polyelektrolyte gleichen Molekulargewichts den gleichen Wert ergibt oder aber die unterschiedliche chemische Struktur der Polyelektrolyte, trotz gleichen Molekulargewichts, zu unterschiedlichen Mobilitäten führt.

Anhand eines Blends aus je 2 PMAS- und PSS-Standards sollte diese Fragestellung mit Hilfe der CE und der CGE untersucht werden. Es wurde ein Blend aus PMAS75k, PMAS420k, PSS80k und PSS333k hergestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Standards betragen je 0,42 mg/ml.

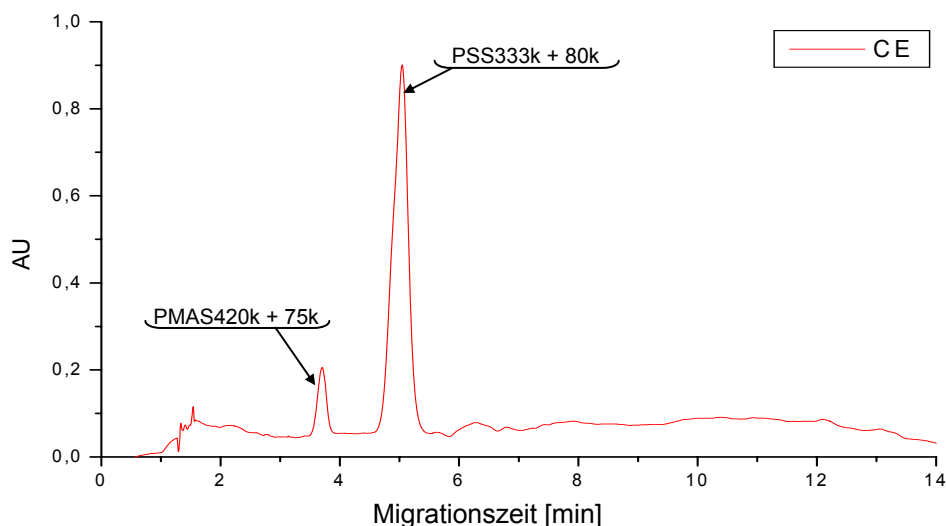


Abb. 71: **CE**-Experiment des Blends aus PMAS420k, PMAS75k, PSS333k und PSS80k  
*Kapillare:* 37 cm L x 75 mm ID, unbeschichtet  
*Puffer:* 160 mM Natriumborat  
*U:* 12,5 kV; *Inj:* 3s x 0,5 psi; *T:* 23°C; *UV:* 200 nm

Zuerst wurde die Probe mit der CE untersucht. Für eine von der chemischen Struktur der Proben unabhängige konstante Mobilität sollte man einen Peak erwarten. In Abb. 71 sind jedoch zwei deutlich voneinander getrennte Peaks zu erkennen. Aufgrund der großen Intensitätsunterschiede können die beiden Signale eindeutig zugeordnet werden. Der vordere kleine Peak bei 3,7 min ist das Signal der beiden nicht getrennten PMAS-Standards. Der intensive Peak bei 5 min wird durch die beiden PSS-Standards erzeugt. Der Unterschied in den Peakintensitäten ist auf die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der beiden Spezies zurückzuführen. Man erkennt, dass es möglich ist, Polyelektrolyte gleichen Molekulargewichts aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Strukturen in der CE zu trennen. Betrachtet man die Molekülradien der beiden Monomere Methacrylsäure-Na-Salz und Natrium-Styrolsulfonat, sollte das Natrium-Polystyrolsulfonat-Makromolekül einen deutlich größeren Radius aufweisen als das entsprechende Polymethacrylsäure-Na-Salz-Makromolekül. Dies wiederum sollte sich in einer niedrigeren elektropheretischen Mobilität des PSS bemerkbar machen. Die PSS-Proben sollten vor den PMAS-Proben eluieren. Das Experiment weist jedoch eine umgekehrte Elutionsreihenfolge auf. Eine Ursache hierfür kann darin liegen, dass es im PSS aufgrund der aromatischen  $\pi$ -Elektronen zu einer partiellen Erhöhung der Ladungsdichte und damit einer größeren Mobilität kommt. Das Ergebnis in Abb.71 zeigt, dass es möglich ist, in der CE hochmolekulare Moleküle nach unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung, nicht aber nach dem Molekulargewicht, zu trennen. Um nun eine Trennung nach dem Molekulargewicht solch hochmolekularer Proben zu erhalten, muss man ein CGE-Experiment durchführen. In Abb. 72 ist das Elektropherogramm des CGE-Experiments dargestellt.

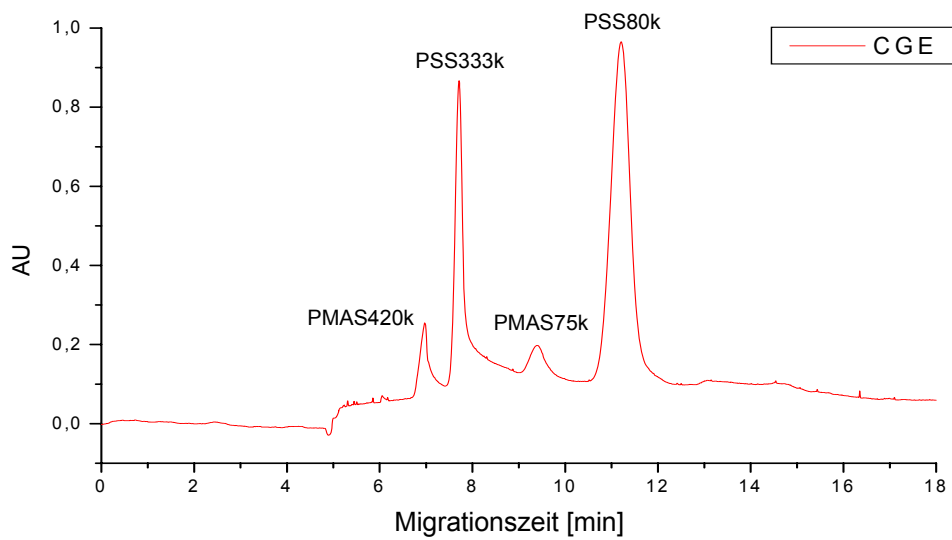


Abb. 72: **CGE**-Experiment des Blends aus PMAS420k, PMAS75k, PSS333k und PSS80k  
*Puffer:* 160 mM Borat + 1% 2-HEC90k  
*U:* 7 kV; *Inj:* 3 s x 0,5 psi; *T:* 23°C; *UV:* 200 nm

In Abb. 72 ist das Ergebnis des CGE-Experiments gezeigt. Man erkennt vier separate Peaks, die aufgrund der Peakintensitäten sowie der Migrationsreihenfolge den einzelnen Proben eindeutig zugeordnet werden können. Die Peakreihenfolge ist PMAS420k, PSS333k, PMAS75k und PSS80k. Man erhält in der CGE eine zusätzliche Trennung nach der Molmasse bzw. dem Molekülradius.

## **4. Experimentelle Bedingungen**

### **4.1 Apparaturen**

Die CE-Messungen wurden auf einem Kapillarelektrophoresesystem P/ACE-MDQ, ausgestattet mit einem Dioden-Array-Detektor, der Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland, durchgeführt.

Die Experimente zur Gelelektrophorese wurden auf einer P/ACE 2100-Apparatur, ausgestattet mit UV-Detektor, der Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland, durchgeführt.

Die MALDI-TOF-MS-Messungen wurden in einem Kratos Kompact MALDI IV Flugzeitmassenspektrometer der Fa. Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland, durchgeführt.

### **4.2 Verwendete Software**

Die Software 32 Karat 7.0 der Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland, wurde zur Steuerung der P/ACE-MDQ-Apparatur, der Datenaufnahme und Auswertung der Elektropherogramme verwendet.

Die Steuerung der P/ACE 2100-Apparatur sowie die Datenaufnahme und Auswertung wurde mit der P/ACE Station Version 1.0 Software der Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland, durchgeführt.

Die Steuerung des MALDI-TOF-Massenspektrometers sowie die Datenaufzeichnung erfolgte mit der Sun SPARCstation Software der Fa. Sun Microsystems, Inc., Mountain View, CA, USA.

Die Darstellung der Elektropherogramme wurden mit Microcal Origin, Version 5.0, erzeugt.

### 4.3 Leitfähigkeitsdetektor

Die Leitfähigkeitsdetektion wurde mit dem TraceDec-kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektor der Fa. Innovative Sensor Technologies GmbH, Strasshof, Österreich, durchgeführt.

### 4.4 Kapillarmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unbeschichtete Quarzglaskapillaren der Fa. CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland, verwendet.

### 4.5 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in kommerziell erhältlicher reinst- Qualität eingesetzt. Lösungsmittel wurden in HPLC-Qualität verwendet.

- *Puffer:*

- di-Natriumtetraborat-Decahydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland.
- L(+)-Arginin, L-Histidin, MES-Hydrat, Sorbinsäure, Acros Organics, Geel, Belgien.

- *Gele:*

- Hydroxyethylcellulose (mittelviskos), Hydroxyethylcellulose (hochviskos), Fluka, Buchs, Schweiz.
- Hydroxyethylcellulose (Mw~250.000 g/mol), 2-Hydroxyethylcellulose (Mw~90.000 g/mol), 2-Hydroxyethylcellulose (Mw~1.300.000 g/mol), Aldrich, Steinheim, Deutschland.

- *Sonstige:*

- 1n Natronlauge, Merck, Darmstadt, Deutschland.
- Harmin, Acros Organics, Geel, Belgien.

- *Lösungsmittel:*

- Acetonitril, VWR International, Fontenay sous Bois, Frankreich.
- Isopropanol, Ethanol, Acros Organics, Geel, Belgien.

#### **4.6 Proben und Standards**

Die verwendeten PSS-, PAS- und PMAS-Standards wurden von der Fa. Polymer Standards Service, Mainz, Deutschland, bezogen.

Die untersuchten PEO/PMAS-Copolymere stammten von der Fa. BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland.

#### **4.7 Ansetzen der Pufferlösungen**

Das entionisierte Wasser für alle Proben- und Pufferlösungen wurde mit einer Millipore Simplicity 185 Apparatur der Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland, hergestellt.

Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde an einer Glaselektrode der Fa. WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland, eingestellt.

Die Gellösungen wurden durch langsame Zugabe des Gelpolymers zum Puffer unter Rühren bei 70°C hergestellt.

#### **4.8 CE-Bedingungen**

Neue Kapillaren wurden wie folgt konditioniert:

- 10 min 1n NaOH
- 10 min 0,1n NaOH
- 5 min H<sub>2</sub>O

Vor jeder Messung wurde die Kapillare mit einem Druck von 20 psi wie folgt gespült:

- 5 min 0,1 n NaOH
- 2 min H<sub>2</sub>O
- 3 min Trennpuffer

Die Messungen wurden bei verschiedenen Temperaturen im Bereich von 20° - 25°C durchgeführt.

#### **4.9 MALDI-TOF-MS-Messungen**

Die CE-Fractionen wurden mit der Matrixlösung aus 5 mg Harmin in 1 ml THF vermischt, auf den MALDI-Träger aufgebracht und getrocknet. Die Messungen wurden mit einem 337 nm Stickstoff-Laser mit einer Pulsdauer von 3 ns und einer Beschleunigungsspannung von 20 kV durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Polystyrolsulfonsäure-Standard ( $M_w=1.200$  g/mol).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Leistungsfähigkeit der CE für die Analytik synthetischer Polyelektrolyte zu untersuchen. Es sollten Methoden für die verbesserte Trennung niedermolekularer Polyelektrolyte entwickelt werden. Die Kopplung der CE mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie sollte für eine umfassende Trennung und Charakterisierung synthetischer Polyelektrolyte eingesetzt werden. Für die Analyse UV-transparenter Polyelektrolyte wie z.B. Polyacrylsäure (PAS), Polymethacrylsäure (PMAS) oder Copolymere aus Polyethylenoxid (PEO) und Polymethacrylsäure bzw. Polyacrylsäure mit der CE sollten neue Trenn- und Detektionsverfahren entwickelt und getestet werden. Des Weiteren sollten Methoden der Kapillargelelektrophorese (CGE) entwickelt werden, mit denen hochmolekulare Polyelektrolyte nach unterschiedlicher chemischer Struktur und unterschiedlichem Molekulargewicht getrennt werden können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Durch die Kopplung der CE mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ist es erstmals gelungen, niedermolekulare synthetische Polyelektrolyte umfassend zu separieren und zu charakterisieren. Mit Hilfe der CE-MALDI-TOF-MS-Kopplung konnte für das Oligostyrolsulfonat gezeigt werden, dass die Feinaufspaltung der Oligomerpeaks durch Strukturisomere und unterschiedliche Substitutionen der Sulfonatgruppe am aromatischen Ring verursacht wird.
2. Durch die Verwendung hochkonzentrierter Natriumborat-Puffer wurde eine deutlich verbesserte Oligomerenaufftrennung für niedermolekulares Polystyrolsulfonat erzielt. Hierdurch wurde zusätzlich eine Trennung der Stereoisomeren sowie eine Separation nach der Art der unterschiedlichen Substitutionsmuster am aromatischen Ring erreicht. Durch die hierbei auftretenden hohen Ströme können solche

Puffersysteme jedoch nur in Kapillaren mit geringen Innendurchmessern verwendet werden.

3. Durch den Einsatz niedermolekularer Alkohole als Pufferzusätze wurden Elektrolytsysteme entwickelt, mit denen ebenfalls Isomerentrennungen erzielt wurden. Mit den so modifizierten Puffersystemen können, aufgrund der reduzierten Strom- und Wärmeentwicklung innerhalb der Kapillare, elektrophoretische Trennungen in Kapillaren mit größeren Innendurchmessern durchgeführt werden. Durch die Verwendung von Kapillaren mit größerem Innendurchmesser erhält man automatisch auch eine größere UV-Detektorzelle. Hiermit können nun auch Proben mit geringer UV-Aktivität analysiert und detektiert werden.
4. Für die Trennung und die Detektion von UV-transparenten Polyelektrolyten kam ein neuartiger Leitfähigkeitsdetektor zum Einsatz. Der kontaktlos arbeitende Detektor ermöglichte eine sehr flexible Anordnung entlang der Kapillare. In den verwendeten organischen Puffern aus Sorbinsäure und Arginin bzw. Histidin gelang es, Oligoacrylsäure-Na-Salz und Oligomethacrylsäure-Na-Salz in die Oligomere aufzutrennen. Durch die geringe Eigenleitfähigkeit dieser Puffer und dem damit verbundenen ausreichenden Leitfähigkeitsunterschied zum Analyten konnten die Proben mit sehr guter Empfindlichkeit detektiert werden.
5. Die für die kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion verwendeten organischen Puffer erwiesen sich als ideale Puffer für die indirekte UV-Detektion (IUV). Mit der IUV wurde eine Detektionsmethode entwickelt, mit der UV-transparente Polyelektrolyte sehr empfindlich detektiert werden können. Anhand der Bestimmung der elektrophoretischen Mobilitäten verschiedener PAS-Standards mit Molekulargewichten von ca. 1.000 – 600.000 g/mol in der IUV konnte der theoretische Verlauf der elektrophoretischen Mobilität in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad experimentell bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass in der

IUV hochmolekulare PAS-Proben noch im Picogramm-Bereich detektiert werden können.

6. Es wurden Methoden entwickelt, mit denen Copolymere aus Polyethylenoxid (PEO) und Polymethacrylsäure (PMAS) nach der Ladungsdichte und dem Molekulargewicht getrennt und detektiert werden können. Hierbei wurden Methoden für die kontaktlose Leitfähigkeits- und die indirekte UV-Detektion entwickelt. Beide Detektionsverfahren bieten hervorragende Möglichkeiten zur Detektion UV-transparenter Copolymere und Homopolymere. Die CCD enthält durch die unterschiedlichen Peakrichtungen eine zusätzliche Information über die Art des Analyten. So ist bei der Auswertung eines CCD-Elektropherogrammes anhand der Peakrichtung eine Unterscheidung zwischen Copolymer, geladenem Homopolymer und den mit dem EOF eluierenden ungeladenen Bestandteilen möglich. Die IUV bietet aufgrund der größeren Unterschiede in den Extinktionskoeffizienten eine wesentlich empfindlichere Detektion, die es ermöglicht, auch Nebenprodukte in geringen Konzentrationen mit ausreichender Empfindlichkeit zu detektieren.
  
7. Da in der CE hochmolekulare Polyelektrolyte nicht mehr aufgetrennt werden können, wurde eine Methode für die Kapillargelelektrophorese (CGE) zur Trennung von hochmolekularen PMAS-Proben nach dem Molekulargewicht entwickelt. Hierbei wurde insbesondere der Einfluss des Molekulargewichts und der Konzentration der eingesetzten Gele auf die Trennung der Proben untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es mit einem optimierten Puffer/Gel-System möglich ist, einen Blend aus 7 PMAS-Standards mit Molekulargewichten von ca. 4.000 – 1.000.000 g/mol innerhalb von 18 min zu trennen. Des Weiteren wurde eine Methode zur Trennung hochmolekularer Polyelektrolyte nach der chemischen Struktur und dem Molekulargewicht anhand verschiedener PMAS- und PSS-Proben entwickelt.

Für zukünftige Arbeiten wäre die Anwendung der kontaktlosen Leitfähigkeitsdetektion und der indirekten UV-Detektion für die Gelelektrophorese zur Trennung hochmolekularer UV-transparenter Polyelektrolyte von großem Interesse. Des Weiteren sollten Methoden der CGE für die Trennung hochmolekularer Copolymere entwickelt werden. Weitere Arbeiten sollten sich mit CGE-Methodenentwicklungen beschäftigen, mit denen, in Analogie zur Chromatographie, Kalibrationskurven zur Bestimmung des Molekulargewichts erstellt werden können. Mit dem Einsatz beschichteter Kapillaren, bei denen der EOF unterdrückt wird, kann der Einsatzbereich der CE-Methoden vergrößert werden. Durch den Einsatz nichtwässriger Trennsysteme könnte die Kapillarelektrophorese auch auf die Trennung wasserunlöslicher Polymere und Copolymere erweitert werden.

## 6. Verwendete Abkürzungen und Symbole

A	Absorption
A	Fläche der Messzelle
a	Monomerdimensionen
ACN	Acetonitril
AS	Arginin/Sorbinsäure-Puffer
$b_{0,5}$	Peakbreite in halber Höhe
B80	80 mM Natriumboratpuffer
B160	160 mM Natriumboratpuffer
B240	240 mM Natriumboratpuffer
B320	320 mM Natriumboratpuffer
BGE	Hintergrundelektrolyt ( <u>B</u> ack <u>G</u> round <u>E</u> lectrolyte)
c	Konzentration
C*	Überlappungskonzentration
C <sup>4</sup> D	kapazitiv gekoppelte kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion
CCD	Kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion
CE	Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis)
CGE	Kapillargelelektrophorese (Capillary Gel Electrophoresis)
D	Diffusionskoeffizient der Probe
d	Innendurchmesser der Kapillare
d	Abstand zweier Ladungen auf der Kette
Da	Dalton
DEPT	<u>D</u> istortionless <u>E</u> nhancement by <u>P</u> olarisation <u>T</u> ransfer
E	Elektrische Feldstärke
$E_A$	Aktivierungsenergie
$E_{kin}$	Kinetische Energie
$e_0$	Elementarladung
EOF	Elektroosmotischer Fluß
EtOH	Ethanol
f	Faktor, der die effektive Ladung der Kette berücksichtigt
$F_E$	Elektrische Beschleunigungskraft
$F_R$	Reibungskraft
H	Höhe eines theoretischen Bodens

HEC	Hydroxyethylcellulose
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HS	Histidin/Sorbinsäure-Puffer
I	Ionenstärke des Elektrolyten
i	Stromstärke
$I_0$	Intensität des eingestrahlten Lichts
$I_d$	Intensität des durchgehenden Lichts
ID	Kapillarinne Durchmesser
Inj	Injektionszeit
Iso	Isopropanol
IUV	Indirekte UV-Detektion
k	Boltzmannkonstante
$k_b$	Wärmeleitfähigkeit des Puffers
L	Länge
L	Länge der Messzelle
$L_{ges}$	Gesamte Kapillarlänge
$L_{eff}$	Effektive Kapillarlänge (Länge bis zum Detektor)
$l_b$	Bjerrum-Länge
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion
$M_w$	Mittleres Molekulargewicht
$M_0$	Masse der Monomereinheit
MA	Morpholinoethansulfonsäure/Arginin-Puffer
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations- Flugzeit-Massenspektrometrie
MAS	Methacrylsäure
MPEG	Polyethylenglycol-Monomethylether
N	Bodenzahl
N	Anzahl an Monomereinheiten pro Polymerkette
$N_A$	Avogadrokonstante
NMR	Kernresonanzspektroskopie
P	Elektrische Leistung
P	Persistenzlänge
$P_0$	Intrinsische Persistenzlänge

## Verwendete Abkürzungen und Symbole

---

$P_{el}$	Elektrostatische Persistenzlänge
$\Delta P$	Druckdifferenz entlang der Kapillaren
PAS	Polyacrylsäure-Na-Salz
PEG	Polyethylenglycol
PMAS	Polymethacrylsäure-Na-Salz
PSS	Natriumpolystyrolsulfonat
Q	Wärmemenge pro Volumeneinheit
r	Radius
R	Gaskonstante
R	Auflösung
$R_g$	Trägheitsradius
s	Flugstrecke
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography)
T	Absolute Temperatur
$T_i$	Temperatur in der Kapillarmitte
$T_w$	Temperatur an der Kapillareninnenwand
$\Delta T$	Temperaturänderung in der Kapillare
t	Zeit
$t_i$	Migrationszeit
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung
v	Geschwindigkeit
$v_{EOF}$	Geschwindigkeit des EOF
$v_i$	Geschwindigkeit des Ions i
V	Volumen
Z	Ladungszahl
$\epsilon_r$	Relative Dielektrizitätskonstante
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante im Vakuum
$\eta$	Dynamische Viskosität
$\eta_{BGE}$	Dynamische Viskosität des „ <u>B</u> ack <u>G</u> round <u>E</u> lectrolyte“
$\kappa$	Spezifische Leitfähigkeit

## Verwendete Abkürzungen und Symbole

---

$\kappa$	Abschirmkonstante
$\lambda$	Molare Leitfähigkeit
$\Lambda_0$	Grenzleitfähigkeit bei unendlicher Verdünnung
$\mu$	Elektrophoretische Mobilität
$\phi$	Flory-Viskositätskonstante
$\rho$	spezifischer Widerstand
$\sigma^2$	Varianz
$\xi$	Abschirmlänge
$\xi$	Ladungsdichte
$\xi_b$	Maschenweite
$\zeta$	Zetapotential

## 7. Literatur

- 1 J.W. Jorgensen, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **53**, **1981**, 1298
- 2 P.G. Righetti, *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1996**
- 3 J.P. Landers, *Handbook of Capillary Electrophoresis (2<sup>nd</sup> ed.)*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1997**
- 4 P. Camillieri, *Capillary Electrophoresis Theory and Practice*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1998**
- 5 M.G. Khaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley, New York, **1998**
- 6 P.D. Grossmann, D.S. Soane, *Anal. Chem.*, **62**, **1990**, 1592
- 7 J. Bullock, *J. Chromatogr. A*, **645**, **1993**, 169
- 8 R.A. Wallingford, *Anal. Chem.*, **68**, **1996**, 2541
- 9 D.A. Hoagland, D.L. Smisek, D.Y. Chen, *Electrophoresis*, **17**, **1996**, 1151
- 10 D.A. Hoagland, E. Arvanitidou, C. Welch, *Macromol.*, **32**, **1996**, 6180
- 11 H. Cottet, P. Gareil, O. Theodoly, C. E. Williams, *Electrophoresis*, **21**, **2000**, 3529
- 12 J.B. Poli, M.R. Schure, *Anal. Chem.*, **64**, **1992**, 896
- 13 H.N. Clos, H. Engelhardt, *J. Chromatogr. A*, **802**, **1998**, 149
- 14 M. Minarik, B. Gas, E. Kenndler, *Electrophoresis*, **18**, **1997**, 98
- 15 H. Cottet, P. Gareil, *J. Chromatogr. A*, **772**, **1997**, 369
- 16 H. Cottet, P. Gareil, J.L. Viovy, *Electrophoresis*, **19**, **1998**, 2151
- 17 H. Cottet, P. Gareil, *Electrophoresis*, **23**, **2002**, 2788
- 18 S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.*, **9**, **1967**, 122
- 19 S. Hjerten, *Elektrophoresis*, **11**, **1990**, 665
- 20 R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis – Principle and Practice*, Springer-Verlag, Berlin, **1993**
- 21 G. Kortüm, *Lehrbuch der Elektrochemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 3. Aufl. **1962**
- 22 A.W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces (4<sup>th</sup> Ed.)*, Wiley & Son, New York, **1982**

- 23 H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese – Methoden und Möglichkeiten*, Vieweg Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, **1994**
- 24 J.H. Knox, K.A. McCormack, *Chromatographia*, **38**, 1994, Nr. 3/4, 215
- 25 J.H. Knox, *Chromatographia*, **26**, 1988, 329
- 26 P.D. Grossmann, J.C. Colburn, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1992
- 27 L. Mitnik, L. Salome', J.L. Viovy, C. Heller, *J. Chromatogr. A*, **710**, 1995, 309
- 28 P.D. Grossmann, D.S. Soane, *Biopolymers*, **31**, 1991, 1221
- 29 J.L. Viovy, T. Duke, *Electrophoresis*, **14**, 1993, 322
- 30 D. Broseta, L. Leibler, A. Lapp, C. Strazielle, *Europhys. Lett.*, **2**, **1986**, 733
- 31 P.G. de Gennes, *Scaling Concept in Polymer Physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY, **1979**
- 32 N.M. Djordjevic, M. Widder, R. Kuhn, *J. High Resol. Chromatogr.*, **20 (4)**, **1997**, 189
- 33 J.P. Chervet, R.E.J. Vansoest, M. Ursem, *J. Chromatogr.* **543 (2)**, **1991**, 439
- 34 A. Röder, K. Bächmann, *J. Chromatogr. A*, **689**, **1995**, 305
- 35 C.H. Wu, Y.S. Lo, Y.H. Lee, T.I. Lin, *J. Chromatogr. A*, **716**, **1995**, 291
- 36 B. Gas, M. Demjanenko, J. Vacik, *J. Chromatogr.*, **192 (2)**, **1980**, 253
- 37 A.J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, G.K. Bonn, *Anal. Chem.*, **70**, **1998**, 563
- 38 K. Mayrhofer, A.J. Zemann, E. Schnell, G.K. Bonn, *Anal. Chem.*, **71**, **1999**, 3828
- 39 D. Kaniansky, V. Zelenska, M. Masar, F. Ivanyi, S. Gazdikova, *J. Chromatogr. A*, **844**, **1999**, 349
- 40 E.F. Hilder, A.J. Zemann, M. Macka, P.R. Haddad, *Electrophoresis*, **22**, **2001**, 1273
- 41 A.J. Zemann, *Electrophoresis*, **24**, **2003**, 2125

- 
- 42 M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, U. Giessmann, *Anal. Chem.*, **57**, **1985**, 2935
- 43 U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp, U. Giessmann, *Anal. Chem.*, **64**, **1992**, 2866
- 44 M. Karas, U. Bahr, A. Deppe, B. Stahl, F. Hillenkamp, U. Giessmann, *Makromol. Chem., Macromol. Symp.*, **61**, **1992**, 397
- 45 P.O. Danis, D.E. Karr, F. Mayer, A. Holle, C.H. Watson, *Org. Mass. Spectrom.*, **27**, **1992**, 843
- 46 A.T. Jackson, H.T. Yates, W.A. MacDonald, J.H. Scrivens, G. Critchley, J. Brown, M.J. Deery, K.R. Jennings, C. Brookes, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **8**, **1997**, 132
- 47 J. Skolnick, M. Fixman, *Macromolecules*, **10**, **1977**, 944
- 48 T. Odijk, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **15**, **1977**, 477
- 49 T. Odijk, *Polymer*, **19**, **1978**, 989
- 50 G.S. Manning, *J. Chem. Phys.*, **51**, **1969**, 924
- 51 U.P. Strauss, *J. A. Chem. Soc.*, **80**, **1965**, 6498
- 52 G.S. Manning, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **23**, **1972**, 117
- 53** G.S. Manning, *Polyelectrolytes*, E. Selegny ed., J. Reichel Publ. Comp., Dordrecht, **1974**
- 54 H. Cottet, P. Gareil, *Electrophoresis*, **21**, **2000**, 1493
- 55 H. Pasch, W. Hiller, R. Haner, *Polymer*, **39** (8-9), **1998**, 1515
- 56 C. Schwer, E. Kenndler, *Anal. Chem.*, **63**, **1991**, 1801

## Lebenslauf

Name:	Karl-Heinz Spriestersbach
Geburtsdatum:	12.01.1965
Geburtsort:	Lahnstein
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
1971 - 1975	Grundschule Friedrichsseggen
1975 - 1984	Neusprachliches Gymnasium Lahnstein, Abitur
Okt. 1984 - Dez. 1985	Grundwehrdienst
März - Mai 1986	Praktikum bei Erlenbach Maschinen, Lautert
WS 1986	Beginn des Studiums an der TU Darmstadt
Ab Juli 1992	Unterbrechung des Studiums; Gründung der "Holyhead Promotion GbR, Babenhausen"; Berufsmusiker, Inhaber und Lehrer an der "New Lapping Drum School, Darmstadt"
Ab Jan. 2000	Wiederaufnahme des Studiums an der TU Darmstadt
Nov. 2001	Diplomhauptprüfung
Jan. 2002 - Sep. 2002	Diplomarbeit am Deutschen Kunststoff-Institut, Darmstadt <i>Thema: Schnelle Polymeranalytik durch gekoppelte High-Throughput HPLC/MALDI-TOF-Massenspektrometrie</i>
Seit Dez. 2002	Promotion am Deutschen Kunststoff-Institut, Darmstadt <i>Thema: Kapillarelektrophorese zur Analyse von komplexen Polyelektrolyten</i>

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Darmstadt, den