

Entwicklung eines Raman-Detektors zur Integration in eine HT-HPLC/irMS-Kopplung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Björn Fischer
aus Willich

Düsseldorf, Dezember 2014

aus dem Institut für Physikalische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans Bettermann

Korreferent: Prof. Dr. Rainer Weinkauf

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2015

Zusammenfassung

In den letzten Jahren stieg die Zahl der Fälschungen und Plagiate von Markenprodukten stark an. Neben dem volkswirtschaftlichen Schaden entstehen den Herstellern der Originalprodukte hohe finanzielle und wirtschaftliche Schäden – neben Umsatzverlusten haben die betroffenen Unternehmen mit Imageschädigungen und unter Umständen sogar mit Produkthaftungsprozessen für gefälschte Produkte zu kämpfen. Als besonders kritisch wirken sich dabei Fälschungen in den Bereichen Lebensmitteln, Körperpflege und Pharmazeutika aus, die in manchen Fällen sogar zu gesundheitlichen Schädigungen der Konsumenten führen können.

Vor diesem Hintergrund wurde in einem durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) geförderten Forschungsvorhaben (IGF-Vorhaben Nr. 16120 N) ein analytisches Verfahren entwickelt, das die Herkunft bzw. Authentizität von Verbindungen eindeutig bestimmt. Dieser Ansatz kombiniert die Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HT-HPLC¹) unter Einsatz eines Raman-Detektors mit der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (irMS²). Das Verfahren soll insbesondere in den Bereichen Pharmazie und Lebensmittelchemie eingesetzt werden. Daneben steht aber auch die Dopinganalytik im Fokus der Forschungsarbeiten, mit dem Ziel, zwischen natürlichen und synthetischen Steroiden unterscheiden zu können.

Das Konzept dieses analytischen Ansatzes, das in Zusammenarbeit mit dem Institut für Energie- und Umwelttechnik (IUTA) und dem Institut für Instrumentelle Analytische Chemie (IAC) der Universität Duisburg-Essen entwickelt wurde, besteht darin, zunächst mit der HT-HPLC die Einzelkomponenten zu trennen und anschließend mittels irMS deren ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis zu bestimmen. Die dazu noch fehlende Identifikation bzw. Strukturaufklärung der Substanzen wird von der Raman-Spektroskopie übernommen. Weiterhin ermöglicht der Einsatz des Raman-spektroskopischen Detektors Koelutionen festzustellen, wenn zwei oder mehrere Substanzen zeitgleich von der Trennsäule der HT-HPLC eluieren.

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Entwicklung des Raman-Detektors und seine Implementierung in eine bestehende HT-HPLC/irMS-Kopplung. Der Raman-Detektor basiert auf dem Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters und ist als Durchflusszelle zur Online-Diagnostik konzipiert. Zentrale Aufgabe dieser Arbeit war es, eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit des Raman-Detektors zu erreichen, ohne dabei die optimierten Analyseparameter der HT-HPLC/irMS-Kopplung verändern zu müssen.

¹ HT-HPLC: high temperature high performance liquid chromatography

² irMS: isotope ratio mass spectrometry

Summary

Due to criminal statistics *product and trademark piracy* have increased dramatically in recent years. The critical number of *fake products* in foodstuffs, drugs and cosmetics exhibits potential risks for health. Producers of branded goods suffer high financial and economic damage – in addition to the loss of sales and profits they could receive considerable damage in trust and image. In worst case manufacturers have to assume responsibility for the *counterfeit products*.

Against this background an analytical method was developed to gather information about origin and authenticity of chemical compounds. This technique links *high-temperature high performance liquid chromatography (HT-HPLC)* with *isotope ratio mass spectrometry (irMS)*. After HT-HPLC separation compounds are analysed by *irMS* that yields $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio to identify the origin and authenticity of chemical compounds. The problem is that this setup does not provide any structural information about the separated analytes. Therefore, we developed an additional detector based on *Raman spectroscopy*. The *Raman detection cell* was inserted between the HT-HPLC and the *irMS* with the function as an online detection method. In addition to the structural identification of compounds the *Raman detector* also reveals co-elution.

This work describes the development of the *Raman detector* and its hyphenation with the HT-HPLC and *irMS*. The centerpiece of the *Raman detection cell* is a *liquid core waveguide*. The light guiding medium is the mobile phase of the HT-HPLC. A central part of this work is the extensive optimization of the optical components to achieve high sensitivity for *Raman detection*. This goal has to be achieved without affecting the adjusted parameters of the HT-HPLC and *irMS*. The complete system was tested by analysing chemical compounds in foodstuffs and drugs. In addition the method was used to distinguish between natural und synthesised steroids in order to discover cases of doping abuse.

The research project was supported by the *German Federal Ministry of Economics and Technology (BMW)* within the agenda for the promotion of industrial cooperative research (*IGF project no. 16120 N*). This work is part of a close cooperation with the *Institute of Energy and Environmental Technology (IUTA)* and the *Institute for Instrumental Analytical Chemistry (IAC)* of the *University Duisburg-Essen*.

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis.....	iii
II	Tabellenverzeichnis.....	viii
III	Formelverzeichnis	ix
1	Einleitung	1
2	Motivation und Hintergründe.....	3
2.1	Produkt- und Markenpiraterie.....	3
2.2	Dopinganalytik	6
3	Analytische Methoden	7
3.1	Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	7
3.2	Raman-Spektroskopie	9
3.2.1	Molekulare Lichtstreuung.....	9
3.2.2	Klassische Darstellung des Raman-Effekts.....	12
3.3	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	14
3.3.1	Gaschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie	15
3.3.2	Flüssigkeitschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie	16
4	Stand der Technik.....	17
4.1	Einsatz der Raman-Spektroskopie als HPLC-Detektor	17
4.2	Raman-Spektroskopie in Flüssigkern-Lichtwellenleitern.....	18
4.3	Einsatz der Flüssigkern-Lichtwellenleiter-Raman-Spektroskopie in der HPLC.....	20
5	Rahmenbedingungen und Zielsetzungen bei der Entwicklung des Raman-Detektors	23
5.1	Empfindlichkeit / Nachweisgrenze des Raman-Detektors.....	23
5.2	Verfügbare Messzeit	26
5.3	Volumen der Durchflusszelle	26
5.4	Druckstabilität der Durchflusszelle	27
6	Analytenauswahl	29
7	Experimentelle Arbeiten	31
7.1	Aufbau eines Raman-Mikroskop-Spektrometers.....	31
7.1.1	Der Laser	31
7.1.2	Der Monochromator	33
7.1.3	Der Detektor.....	35
7.1.4	Aufbau des Raman-Mikroskop-Spektrometers	36
7.2	Erstellung einer Referenz-Raman-Spektrendatenbank	39
7.2.1	Zuordnung von Schlüsselbanden am Beispiel von Testosteron, Epitestosteron und Prasteron	40
7.3	Entwicklung des Raman-Detektors für die Flüssigchromatographie....	45
7.3.1	Experimenteller Ansatz unter Einsatz der Raman-Mikroskopie	45

7.3.2	Experimenteller Ansatz unter Einsatz eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters.....	48
7.3.2.1	DuPont™ Teflon® AF.....	48
7.3.2.2	Kapillaren aus Teflon® AF.....	49
7.3.2.3	Funktionsprinzip des Flüssigkern-Lichtwellenleiters.....	49
7.3.2.4	Einkopplung des Laserlichtes in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter.....	53
7.3.2.5	Auskopplung des Raman-Streulichtes aus dem Flüssigkern-Lichtwellenleiter.....	58
7.3.2.6	Raman-Testmessung an einer wässrigen Coffein-Lösung.....	62
7.3.2.7	Vergütung des Auskoppel-Lichtwellenleiters mit einem Langpass-Kantenfilter zur Raman-Streulichtabnahme.....	64
7.3.2.8	Integration eines zusätzlichen Kantenfilters in den Monochromator.....	68
7.4	Vermessung eines Coffein-Peaks zur Bestimmung der Nachweisgrenze im Durchflussverfahren.....	70
7.5	Integration des Raman-Detektors in die HT-HPLC/irMS-Kopplung.....	76
8	Analyse von Substanzgemischen mit dem HT-HPLC/Raman/irMS-System.....	81
8.1	Analyse eines Gemisches von Lebensmittelzusatzstoffen.....	81
8.2	Analyse eines Gemisches von Antibiotika.....	89
8.3	Analyse eines Gemisches von Anabolika.....	92
9	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse.....	99
10	Literaturverzeichnis.....	101
11	Anhang.....	107
11.1	Basiskomponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus.....	107
11.2	Optische Komponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus.....	108
11.3	DuPont™ Teflon® AF.....	115
11.4	Verwendete Substanzen – Datenblätter und Raman-Spektren.....	120
11.4.1	Lebensmittelzusatzstoffe.....	120
11.4.2	Antibiotika (Sulfonamide und Trimethoprim).....	126
11.4.3	Anabolika (Steroide).....	132

I **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 2-1: An den Grenzen der EU sichergestellte Waren mit Verdacht auf Produkt- und Markenpiraterie.....	4
Abbildung 3-1: Messanordnung zur Kopplung von HT-HPLC, Raman-Spektroskopie und irMS.....	7
Abbildung 3-2: Auftragung der relativen statischen Permittivität von gesättigtem Wasser und Wasserdampf gegen die Temperatur.....	8
Abbildung 3-3: Termschema zur Rayleigh-, Stokes-Raman- und Anti-Stokes-Raman-Streuung	10
Abbildung 3-4: Raman-Spektrum von Cumarin.....	11
Abbildung 4-1: Normierte Raman-Intensität der CN-Schwingung von Acetontril.....	19
Abbildung 4-2: Online-Kopplung von HPLC und Raman-Spektroskopie mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach Dijkstra et al.	21
Abbildung 4-3: Online-Kopplung von HPLC und Raman-Spektroskopie mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach Marquardt et al.	21
Abbildung 5-1: Darstellung unterschiedlicher Elutions-Peak-Breiten mittels Gauß-Verteilungskurven ..	25
Abbildung 7-1: Millennia Pro 2s Lasersystem	32
Abbildung 7-2: Optischer Aufbau im Laserkopf des Millennia Pro 2s	33
Abbildung 7-3: Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VPT System™	34
Abbildung 7-4: Andor Technology CCD-Kamera Newton DU920P-BV	35
Abbildung 7-5: Schrägansicht des modular aufgebauten Raman-Mikroskop-Spektrometers.....	36
Abbildung 7-6: Schematische Darstellung des modular aufgebauten Raman-Mikroskop-Spektrometers	37
Abbildung 7-7: Referenz-Raman-Spektrum von Testosteron und Zuordnung von Schlüsselbanden.....	41
Abbildung 7-8: Referenz-Raman-Spektrum von Prasteron und Zuordnung von Schlüsselbanden	42
Abbildung 7-9: Referenz-Raman-Spektrum von Epitestosteron und Zuordnung von Schlüsselbanden.....	43
Abbildung 7-10: Referenz-Raman-Spektren von Epitestosteron und Testosteron	44
Abbildung 7-11: Raman-Spektren von Coffein in Wasser mittels Raman-Mikroskop-Spektrometer in einer Quarzglaszuvette (I).....	46

Abbildung 7-12: Raman-Spektrum von Coffein in Wasser mittels Raman-Mikroskop-Spektrometer in einer Quarzglasküvette (II)..	47
Abbildung 7-13: Copolymerisation von PDD und TFE zu Teflon® AF.	48
Abbildung 7-14: Funktionsprinzip des wassergefüllten Flüssigkern-Lichtwellenleiters 01RT171 bei Totalreflexion an der Kapillarinnenwand.	50
Abbildung 7-15: Funktionsprinzip des wassergefüllten Flüssigkern-Lichtwellenleiters 01RT171 bei Totalreflexion an der Kapillaraußenwand	52
Abbildung 7-16: Schematischer Querschnitt und Bemaßung des T-Stücks "U-428 Stainless Steel Tee"	54
Abbildung 7-17: Einkopplung des Laserlichtes in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter mittels modifiziertem HPLC Edelstahl T-Stück	55
Abbildung 7-18: Detailzeichnung zur Einkopplung des Laserlichtes in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter.	56
Abbildung 7-19: Darstellung von zwei Konzepten zur Auskopplung des Raman-Streulichtes aus dem Flüssigkern-Lichtwellenleiter	59
Abbildung 7-20: Finaler Aufbau der Raman-Durchflusszelle mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter.	61
Abbildung 7-21: Raman-Spektrum von Coffein in Wasser mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach dem Aufbau der Abbildung 7-20	63
Abbildung 7-22: Raman-Spektrum von Coffein in Wasser mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach dem Aufbau der Abbildung 7-21	64
Abbildung 7-23: Abnahme des vorwärts gerichteten Raman-Streulichtes mittels einer mit Langpass-Kantenfilter vergüteten Glasfaser	65
Abbildung 7-24: Freistehendes Faserende einer HCG-M0550T der Firma Laser Components GmbH mit Langpass-Kantenfilter beschichteter Stirnfläche (Fasermantel nicht abgezogen)	66
Abbildung 7-25: Transmissionskurve der Faserbeschichtung	67
Abbildung 7-26: Transmissionspektren der mit Kantenfilter beschichteten Lichtwellenleiter zur Raman-Streulicht-Abnahme.	68
Abbildung 7-27: Raman-Signal des Auskoppel-Lichtwellenleiters	69
Abbildung 7-28: Experimenteller Aufbau für die Raman-spektroskopische Vermessung eines Coffein-Peaks zur Bestimmung der Nachweisgrenze im Durchflussverfahren.	70
Abbildung 7-29: Laborfotographie des experimentellen Aufbaus zur Raman-spektroskopischen Vermessung eines Coffein-Peaks im Durchflussverfahren	71
Abbildung 7-30: Zeitliche Verfolgung des Coffein-Signals bei 254 nm mittels UV/Vis-Diodenarray-Detektor.	72
Abbildung 7-31: Online Raman-Messung von Coffein in Wasser bei einer Peak-Konzentration von 25 mg L ⁻¹	73

Abbildung 7-32: Online Raman-Messungen von Coffein bei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen	74
Abbildung 7-33: Experimenteller Gesamtaufbau zur Kopplung von Hochtemperatur-HPLC	76
Abbildung 7-34: Photographien des Raman-Detektors im Laboraufbau zur Kopplung von Hochtemperatur-HPLC, Raman-Detektion und Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	77
Abbildung 7-35: Photographien der HT-HPLC/irMS-Kopplung im Laboraufbau zur Kopplung von Hochtemperatur-HPLC, Raman-Detektion und Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	78
Abbildung 8-1: Trennung von sechs Lebensmittelzusatzstoffen	82
Abbildung 8-2: Online Raman-Messung von Theobromin	83
Abbildung 8-3: Online Raman-Messung von Theophyllin	84
Abbildung 8-4: Online Raman-Messung von Catechin	85
Abbildung 8-5: Online Raman-Messung von Coffein.....	86
Abbildung 8-6: Online Raman-Messung von Rutin.....	87
Abbildung 8-7: Online Raman-Messung von Rutin, Invertierte 2. Ableitung der Raman-Intensität	88
Abbildung 8-8: Trennung von fünf Antibiotika	89
Abbildung 8-9: Online Raman-Messung von Sulfadiazin.....	90
Abbildung 8-10: Online Raman-Messung von Sulfathiazol.....	91
Abbildung 8-11: Online Raman-Messung von Sulfamerazin	91
Abbildung 8-12: Trennung von fünf Steroiden	93
Abbildung 8-13: Online Raman-Messung von Nandrolon	94
Abbildung 8-14: Online Raman-Messung von Testosteron.....	95
Abbildung 8-15: Online Raman-Messung von Epitestosteron.....	96
Abbildung 8-16: Online Raman-Messung von Androsteron.....	96
Abbildung 11-1: Spectra-Physics Millennia Pro 2s.....	107
Abbildung 11-2: Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i.....	107
Abbildung 11-3: Andor Newton DU920P CCD-Kamera.....	107
Abbildung 11-4: Nikon CF IC EPI Plan SLWD 100X.	108
Abbildung 11-5: Nikon CF IC EPI Plan SLWD 10XA.....	108
Abbildung 11-6: Transmissionskurve Semrock „532 nm RazorEdge Dichroic™ laser-flat beamsplitter“ bei 45° Einfallswinkel.....	109
Abbildung 11-7: Technische Zeichnung Edmund Optics „Achromat, 25mm D. x 35mm Brennweite, VIS 0° beschichtet“	110

Abbildung 11-8: Reflexionskurve Edmund Optics „Achromat, 25mm D. x 35mm Brennweite, VIS 0° beschichtet“ bei 0° Einfallswinkel.....	111
Abbildung 11-9: Reflexionskurven Qioptiq „Planspiegel mit dielektrischer Beschichtung DLHS 532 nm“ bei 0° und 45° Einfallswinkel.....	112
Abbildung 11-10: Reflexionskurve Qioptiq „Planspiegel RAGV silberbeschichtet“ bei 45° Einfallswinkel.....	113
Abbildung 11-11: Transmissionskurve Edmund Optics „550nm hochpräziser Langpassfilter, 25mm Durchmesser“.....	114
Abbildung 11-12: Copolymerisation von PDD und TFE zu Teflon® AF.....	115
Abbildung 11-13: DuPont™ Teflon® AF (DPP/TFE-Copolymer) – Auftragung der Glasübergangstemperatur gegen den Anteil an PDD.....	116
Abbildung 11-14: Wellenlängenabhängige Lichttransmission durch Teflon® AF Schichten.....	117
Abbildung 11-15: Abhängigkeit von Brechungsindex und Glasübergangstemperatur bei Teflon® AF.....	118
Abbildung 11-16: Abhängigkeit von Brechungsindex und Wellenlänge bei Teflon® AF 1300, 1601 und 2400.....	119
Abbildung 11-17: Strukturformel von Coffein.....	120
Abbildung 11-18: Referenz-Raman-Spektrum von Coffein.....	120
Abbildung 11-19: Strukturformel von Theophyllin.....	121
Abbildung 11-20: Referenz-Raman-Spektrum von Theophyllin.....	121
Abbildung 11-21: Strukturformel von Theobromin.....	122
Abbildung 11-22: Referenz-Raman-Spektrum von Theobromin.....	122
Abbildung 11-23: Strukturformel von Aspartam.....	123
Abbildung 11-24: Referenz-Raman-Spektrum von Aspartam.....	123
Abbildung 11-25: Strukturformel von Catechin.....	124
Abbildung 11-26: Referenz-Raman-Spektrum von Catechin.....	124
Abbildung 11-27: Strukturformel von Rutin.....	125
Abbildung 11-28: Referenz-Raman-Spektrum von Rutin.....	125
Abbildung 11-29: Strukturformel von Sulfadiazin.....	126
Abbildung 11-30: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfadiazin.....	126
Abbildung 11-31: Strukturformel von Sulfamerazin.....	127
Abbildung 11-32: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfamerazin.....	127
Abbildung 11-33: Strukturformel von Sulfamethazin.....	128
Abbildung 11-34: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfamethazin.....	128
Abbildung 11-35: Strukturformel von Sulfathiazol.....	129

Abbildung 11-36: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfathiazol.	129
Abbildung 11-37: Strukturformel von Sulfamethoxazol.....	130
Abbildung 11-38: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfamethoxazol.....	130
Abbildung 11-39: Strukturformel von Trimethoprim.	131
Abbildung 11-40: Referenz-Raman-Spektrum von Trimethoprim.....	131
Abbildung 11-41: Strukturformel von Testosteron.....	132
Abbildung 11-42: Referenz-Raman-Spektrum von Testosteron.....	132
Abbildung 11-43: Strukturformel von Epitesteron.	133
Abbildung 11-44: Referenz-Raman-Spektrum von Epitesteron.	133
Abbildung 11-45: Strukturformel von Nandrolon.....	134
Abbildung 11-46: Referenz-Raman-Spektrum von Nandrolon.....	134
Abbildung 11-47: Strukturformel von Prasteron.	135
Abbildung 11-48: Referenz-Raman-Spektrum von Prasteron.	135
Abbildung 11-49: Strukturformel von Androsteron.	136
Abbildung 11-50: Referenz-Raman-Spektrum von Androsteron.....	136
Abbildung 11-51: Strukturformel von Eticholanolon.....	137
Abbildung 11-52: Referenz-Raman-Spektrum von Eticholanolon.....	137
Abbildung 11-53: Strukturformel von Dihydroandrosteron.....	138
Abbildung 11-54: Referenz-Raman-Spektrum von Dihydroandrosteron.	138
Abbildung 11-55: Strukturformel von Pregnantriol.....	139
Abbildung 11-56: Referenz-Raman-Spektrum von Pregnantriol.	139

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 6-1: Zusammenstellung ausgewählter Testsubstanzen.	30
Tabelle 7-1: Verwendete Kapillaren aus Teflon® AF 2400.	49
Tabelle 7-2: Messergebnisse zur Bestimmung der Online-Detektionsgrenze des Raman-Detektors am Beispiel von Coffein.	75
Tabelle 8-1: Messergebnisse der Online Raman-Detektion im Rahmen der Gesamtkopplung mit der HT-HPLC und irMS.	97
Tabelle 11-1: Spezifikationen der Basiskomponenten.	107
Tabelle 11-2: Spezifikationen der optischen Komponenten des Raman- Spektrometer-Aufbaus.	108
Tabelle 11-3: Coffein – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	120
Tabelle 11-4: Theophyllin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	121
Tabelle 11-5: Theobromin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	122
Tabelle 11-6: Aspartam – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	123
Tabelle 11-7: Catechin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	124
Tabelle 11-8: Catechin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	125
Tabelle 11-9: Sulfadiazin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	126
Tabelle 11-10: Sulfamerazin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	127
Tabelle 11-11: Sulfamethazin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	128
Tabelle 11-12: Sulfathiazol – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	129
Tabelle 11-13: Sulfamethoxazol – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	130
Tabelle 11-14: Trimethoprim – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	131
Tabelle 11-15: Testosteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	132
Tabelle 11-16: Epi-testosteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	133
Tabelle 11-17: Nandrolon – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	134
Tabelle 11-18: Prasteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	135
Tabelle 11-19: Androsteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	136
Tabelle 11-20: Eticholanolon – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	137
Tabelle 11-21: Dihydroandrosteron – Datenblatt und Referenz-Raman- Spektrum	138
Tabelle 11-22: Pregnantriol – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.	139

III Formelverzeichnis

Formel 1: Beschreibung des Raman-Effekts – Induziertes Dipolmoment (I).....	12
Formel 2: Beschreibung des Raman-Effekts – Induziertes Dipolmoment (II).....	13
Formel 3: Beschreibung des Raman-Effekts – Molekulare Eigenschwingung.....	13
Formel 4: Beschreibung des Raman-Effekts – Modulierter Polarisierbarkeitstensor.....	13
Formel 5: Beschreibung des Raman-Effekts – Moduliertes induziertes Dipolmoment (I).....	13
Formel 6: Beschreibung des Raman-Effekts – Moduliertes induziertes Dipolmoment (II).....	14
Formel 7: Berechnung des Delta-Wertes zur Darstellung der Isotopensignatur	15
Formel 8: Gesetz von Hagen-Poiseuille zur Berechnung des Druckabfalls in Kapillaren.....	27
Formel 9: Berechnung des Grenzwinkels der Totalreflexion im LWL an der Kapillar-Innenwand.....	51
Formel 10: Berechnung des maximalen Akzeptanzwinkels im LWL bei Totalreflexion an der Kapillar-Innenwand.....	51
Formel 11: Berechnung der numerischen Apertur des Flüssigkern- Lichtwellenleiters.....	51
Formel 12: Berechnung des Grenzwinkels der Totalreflexion im LWL an der Kapillar-Außenwand.....	52
Formel 13: Berechnung des maximalen Akzeptanzwinkels im LWL bei Totalreflexion an der Kapillar-Außenwand.....	53

1 Einleitung

In den letzten Jahren stieg die Zahl der Fälschungen und Plagiate von Markenprodukten stark an. Neben dem volkswirtschaftlichen Schaden entstehen den Herstellern der Originalprodukte hohe finanzielle und wirtschaftliche Schäden – neben Umsatzverlusten haben die betroffenen Unternehmen mit Imageschädigungen und unter Umständen sogar mit Produkthaftungsprozessen für gefälschte Produkte zu kämpfen. Als besonders kritisch wirken sich dabei Fälschungen in den Bereichen Lebensmitteln, Körperpflege und Pharmazeutika aus, die in manchen Fällen sogar zu gesundheitlichen Schädigungen der Konsumenten führen können [1].

Vor diesem Hintergrund wurde in einem durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) geförderten Forschungsvorhaben (IGF-Vorhaben Nr. 16120 N) ein analytisches Verfahren entwickelt, das die Herkunft bzw. Authentizität von Verbindungen eindeutig bestimmt [2]. Dieser Ansatz kombiniert die Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HT-HPLC³) unter Einsatz eines Raman-Detektors mit der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (irMS⁴). Das Verfahren soll insbesondere in den Bereichen Pharmazie und Lebensmittelchemie eingesetzt werden. Daneben steht aber auch die Dopinganalytik im Fokus der Forschungsarbeiten, mit dem Ziel, zwischen natürlichen und synthetischen Steroiden unterscheiden zu können.

Das Konzept dieses analytischen Ansatzes, das in Zusammenarbeit mit dem Institut für Energie- und Umwelttechnik (IUTA) und dem Institut für Instrumentelle Analytische Chemie (IAC) der Universität Duisburg-Essen entwickelt wurde, besteht darin, zunächst mit der HT-HPLC die Einzelkomponenten zu trennen und anschließend mittels irMS deren ¹²C/¹³C-Isotopenverhältnis zu bestimmen. Die dazu noch fehlende Identifikation bzw. Strukturaufklärung der Substanzen wird von der Raman-Spektroskopie übernommen. Weiterhin ermöglicht der Einsatz des Raman-spektroskopischen Detektors Koelutionen festzustellen, wenn zwei oder mehrere Substanzen zeitgleich von der Trennsäule der HT-HPLC eluieren.

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Entwicklung des Raman-Detektors und seine Implementierung in eine bestehende HT-HPLC/irMS-Kopplung. Der Raman-Detektor basiert auf dem Prinzip eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters und ist als Durchflusszelle zur Online-Diagnostik konzipiert. Zentrale Aufgabe dieser Arbeit war es, eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit des Raman-Detektors zu erreichen, ohne dabei die optimierten Analyseparameter der HT-HPLC/irMS-Kopplung verändern zu müssen.

³ HT-HPLC: high temperature high performance liquid chromatography

⁴ irMS: isotope ratio mass spectrometry

2 Motivation und Hintergründe

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, soll durch die Kopplung von HT-HPLC, Raman-Detektor und irMS ein analytisches Gesamtsystem entwickelt werden, das zur Aufklärung von Produkt- und Markenpiraterie sowie in der Dopinganalytik eingesetzt werden kann. Das Projekt wurde durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi) unter IGF-Vorhaben Nr. 16120 N mit dem Titel „*Entwicklung eines flüssigchromatografischen Analyseverfahrens zur Struktur- und Identitätsaufklärung in komplexen wässrigen Medien mittels gekoppelter Raman/irMS Detektoren*“, gefördert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im speziellen mit der Entwicklung des Raman-Detektors und seine Integration in die HT-HPLC/irMS-Kopplung. Verständlicherweise wird hier nur ein Teil der projektrelevanten Fragestellungen abgehandelt. Vor diesem Hintergrund soll im Folgenden nur kurz auf die übergeordneten Ziele und Anwendungsfelder der Gesamtkopplung eingegangen werden. Weiterführende Informationen können dem Abschlussbericht zum IGF-Vorhaben Nr. 16120 N entnommen werden [2].

2.1 Produkt- und Markenpiraterie

Die Europäische Kommission veröffentlicht jährlich einen Bericht über die vom Zoll beschlagnahmten Handelswaren, die der Produkt- und Markenpiraterie verdächtig wurden [3]. Demnach wurden im Jahr 2013 an den Grenzen der EU fast 87.000 Fälle registriert, bei denen gefälschte Waren aus dem Verkehr gezogen werden mussten. Insgesamt konnten dabei etwa 36 Millionen Artikel mit einem Marktwert von 768 Millionen Euro sichergestellt werden. Im Vergleich zum Vorjahr zeigt die Statistik einen leichten Rückgang, die Zahl der registrierten Fälle ist von 90.500 in 2012 um etwa 4 % gesunken. Interessant ist dabei allerdings, dass im gleichen Zuge die Anzahl gefälschter Waren des täglichen Gebrauchs gestiegen ist. Produkte, die eine potentielle Gefahr für die Gesundheit und Sicherheit der Konsumenten darstellen (z. B. Medikamente, Lebensmittel, Kosmetik, Haushaltsgeräte und Spielzeug), nahmen in 2012 einen Anteil von 12,7 % aller sichergestellten Fälschungen ein. In 2013 hat sich diese Zahl mit 25,2 % fast verdoppelt. Der Hauptgrund dafür ist laut Aussage der Europäischen Kommission in dem dramatischen Anstieg gefälschter Medikamente zu sehen. Die Zahl sichergestellter Arzneimittel lag in 2012 bei etwa 700.000 und ist in 2013 auf fast 3,7 Millionen angestiegen – das entspricht einem Anstieg um das Fünffache. Die Abbildung 2-1 gliedert die in 2013 beschlagnahmten Artikel in Produktarten auf. Gefälschte Medikamente liegen aktuell mit anteilig 10 % knapp hinter Kleidung (12 %) und sonstigen Waren (11 %) an dritter Stelle.

Dieser hohe Anteil muss als ein besonders schwerwiegendes Problem eingestuft werden. Eine Nachahmung von Arzneimitteln kann z. B. aufgrund falscher Wirkstoffdosierung oder möglicher Verunreinigungen zu gravierenden gesundheitlichen Schädigungen der Konsumenten führen. Laut einer Schätzung der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) waren bereits im Jahr 2005 weltweit über 10 % aller Medikamente gefälscht [4].

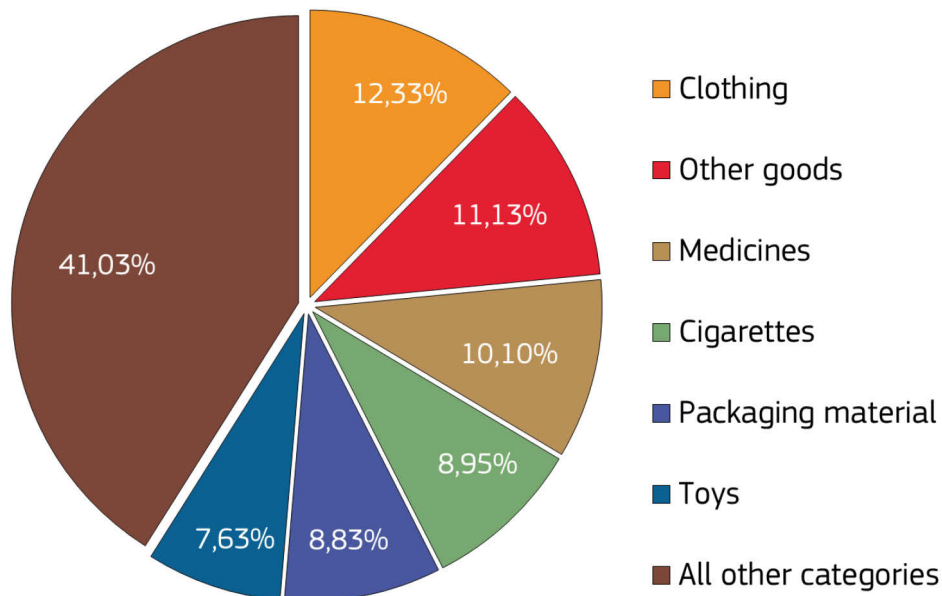


Abbildung 2-1: An den Grenzen der EU sichergestellte Waren mit Verdacht auf Produkt- und Markenpiraterie (insgesamt 36 Millionen Artikel in 2013) – Aufteilung nach Produktarten [3].

Neben den gesundheitlichen Risiken für die Verbraucher erleiden die betroffenen Unternehmen und Hersteller der Originalpräparate hohe finanzielle und wirtschaftliche Schäden. Eine durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Studie zum Thema Plagiatschutz aus dem Jahr 2007 fasst zusammen, dass es sich bei etwa 9 % des Welthandelsvolumens um Produktpiraterie handelt [5]. Das entsprach dem damaligen Gegenwert von ca. 660 Milliarden Euro. Neben hohen Umsatzeinbußen und Gewinnausfällen müssen die betroffenen Unternehmen möglicherweise schwer zu beziffernde Imageverluste in Kauf nehmen, wenn der Ruf einer Marke aufgrund minderwertiger Fälschungen Schaden leidet. Ebenso ist es denkbar, dass die Hersteller mit Kosten aus Produkthaftungsprozessen für Fälschungen ihrer eigenen Produkte konfrontiert werden.

Laut eben genannter Studie ist allerdings auch der volkswirtschaftliche Schaden immens. Neben entgangenen Steuereinnahmen gehen den Industrienationen durch Produkt- und Markenpiraterie Arbeitsplätze verloren bzw. sind dadurch konkret bedroht. Nach Aussagen des „Aktionskreises Deutscher Wirtschaft gegen Produkt- und Markenpiraterie“ (APM), des „Zentralverbands Elektrotechnik- und

Elektronikindustrie“ (ZVEI) und des „Deutschen Industrie- und Handelskammertag“ (DIHK) ist alleine in Deutschland der jährliche Verlust von 70.000 Arbeitsplätzen auf Produkt- und Markenpiraterie zurückzuführen [5]. Für den gesamteuropäischen Raum rechnet die „Vereinigung zur Bekämpfung von Produktpiraterie“ (VBP) mit einem Verlust von jährlich 300.000 Arbeitsplätzen [5].

Wie gezeigt wurde, stellt das Thema Produkt- und Markenpiraterie für viele Interessengruppen ein großes Problem dar. Daher ist es wichtig, gefälschte Produkte zu identifizieren und frühzeitig aus dem Verkehr zu ziehen. In vielen Fällen können Fälschungen relativ leicht erkannt werden. Dies kann oft bereits am äußeren Erscheinungsbild des Produktes oder anhand der Verpackung festgestellt werden. Qualitativ hochwertige Fälschungen sind hingegen nicht so leicht vom Originalprodukt zu unterscheiden. Ein Medikament z. B. kann äußerlich eine perfekte Kopie darstellen, die Inhaltsstoffe können dabei jedoch stark variieren. Neben Verunreinigungen und falscher Dosierung kann im schlimmsten Fall überhaupt kein pharmazeutisch aktiver Wirkstoff in dem Präparat enthalten sein. Laut der WHO (World Health Organization) sind schätzungsweise bis zu 25 Prozent der Medikamente in Entwicklungsländern gefälscht [6]. Ein Beispiel dafür ist die Meningitis-Epidemie im Niger im Jahre 1995. In diesem Zuge wurde 50.000 Menschen mit einem gefälschten Medikament geimpft, das keinen aktiven Wirkstoff enthielt. Als Folge starben 2.500 Menschen. Die WHO schätzt weiterhin, dass von den weltweit jährlich etwa eine Million zu beklagenden Todesfällen durch Malaria wahrscheinlich 200.000 auf gefälschte wirkungslose Impfstoffe zurückzuführen sind [6]. Wenn sich die Inhaltsstoffe der Fälschungen von den Originalprodukten unterscheiden, können sie relativ leicht mittels etablierter Methoden wie z. B. GC-MS, LC-MS aber auch der Raman- oder IR-Spektroskopie identifiziert werden. Schwierig wird es dann, wenn die Fälschungen so gut sind, dass sogar die Inhaltsstoffe identisch sind. In diesem Fall sind zwar nicht mehr die Konsumenten gesundheitlichen Gefahren ausgesetzt, umso schwieriger ist es jedoch für die Hersteller der Originalprodukte gegen diese Art von „perfekten“ Fälschungen vorzugehen. Neben dem in den letzten Jahren standardmäßig eingesetzten Barcode-Verfahren, mit dem Medikamente über einen Identifikationsschlüssel bis zum Produktionsursprung zurückverfolgt werden können, kann für eine genaue Charakterisierung der Fälschungen zurzeit nur die irMS eingesetzt werden [7]. Anhand der Isotopensignatur kann z. B. die (geographische) Herkunft der gefälschten Substanzen aufgeklärt werden, oder z. B. zwischen natürlichen und synthetischen Inhaltsstoffen unterschieden werden [8, 9].

An dieser Stelle knüpft das IGF-Forschungsprojekt Nr. 16120 N an. Die Entwicklung einer HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung soll als neuartige Methode zur Identifizierung von gefälschten Produkten, vornehmlich in den Bereichen Lebensmittel und Pharmazeutika, eingesetzt werden.

2.2 Dopinganalytik

Laut aktuellen Medienberichten (November 2014) steht zurzeit ein Entwurf für ein neues Anti-Doping-Gesetz zur Diskussion, nach dem Doping künftig mit einer Freiheitsstrafe von bis zu drei Jahren geahndet werden soll [10]. Damit will die deutsche Regierung ein Zeichen zur Bekämpfung von Doping im Sport setzen. Bisher hatte der Nachweis von Doping für die Spitzensportler lediglich Geldstrafen und Wettkampfsperren zur Folge. Sollte das Anti-Doping-Gesetz in Kraft treten, kann künftig ein positiver Dopingbefund für die betroffenen Leistungssportler gravierende existentielle Folgen haben. Umso wichtiger wird es dann sein, dass die Testergebnisse des Dopings nachweises absolut eindeutig sind.

Die Einnahme von Steroiden ist heutzutage die am weitesten verbreitete Maßnahme zur illegalen Steigerung der körperlichen Fitness [11]. Bisher erfolgt die Unterscheidung körpereigener von synthetisch eingenommenen Steroiden routinemäßig durch eine GC-irMS-Kopplung (siehe Kapitel 3.3.1). Die bisherige Methode erfolgt durch eine vorherige Derivatisierung der Steroide, um sie der Gaschromatographie zugänglich zu machen [11]. Diese Derivatisierung ist problematisch, da die Einführung von kohlenstoffhaltigen Gruppen durch das Derivatisierungsreagenz zu falschen Isotopensignaturen durch kinetische Isotopeneffekte und einer Verdünnung des Isotopensignals führen kann [12]. Dieses Problem kann durch eine LC-irMS-Kopplung (siehe Kapitel 3.3.2) und der damit gegebenen Möglichkeit einer direkten Analyse der nicht derivatisierten Verbindungen gelöst werden.

In Rahmen des IGF-Vorhaben Nr. 16120 N konnte gezeigt werden, dass die Kopplung von HT-HPLC, Raman-Detektor und irMS hervorragend dazu geeignet ist, in der Dopinganalytik eingesetzt zu werden. Die Methode zeigt ein hohes Potential, um sich zu einer routinemäßigen Standardmethode in diesem Anwendungsfeld zu etablieren.

3 Analytische Methoden

Im Rahmen der Forschungstätigkeiten des genannten Projektes werden drei unterschiedliche analytische Methoden aus den Bereichen Chromatographie, Spektroskopie und Massenspektrometrie in einer Online-Kopplung miteinander kombiniert. Die Verknüpfung der Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HT-HPLC), Raman-Spektroskopie und Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (irMS) führt dabei zu einem neuartigen Gesamtsystem, mit dem Substanzen hinsichtlich ihrer Herkunft und Authentizität überprüft werden können. Das Konzept dieser Kopplung ist schematisch in der Abbildung 3-1 dargestellt.

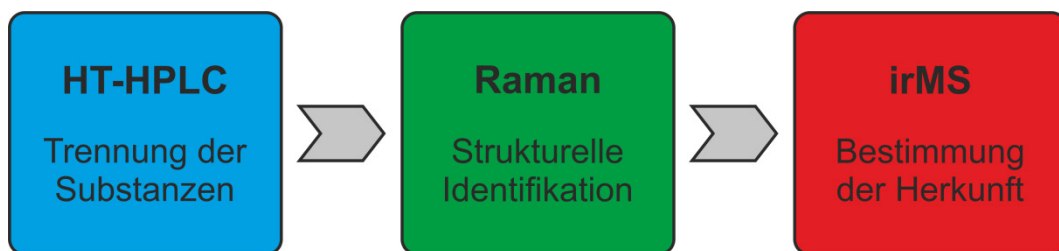


Abbildung 3-1: Messanordnung zur Kopplung von HT-HPLC, Raman-Spektroskopie und irMS.

In einem ersten Schritt erfolgt die Trennung eines Substanzgemisches mittels der Hochtemperatur-HPLC. Die getrennten Substanzen werden anschließend Raman-spektroskopisch untersucht und anhand ihrer Molekülstruktur identifiziert. Letztlich wird mit einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer das $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffisotopenverhältnis bestimmt, um anhand der erhaltenen Delta-Werte Aussagen über die Herkunft bzw. Authentizität der Substanzen zu treffen. In den folgenden Kapiteln werden die verwendeten Methoden im Einzelnen kurz vorgestellt.

3.1 Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

In der klassischen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) basiert die chromatographische Trennung auf einem Polaritätsgradienten in der mobilen Phase, der im Normalfall durch die sog. Lösungsmittel-Gradientenelution erreicht wird. Bei der zumeist eingesetzten Umkehrphasenchromatographie wird dazu ein Gradient eines polaren Lösungsmittels (z. B. Wasser) zu einem vergleichsweise weniger polaren Lösungsmittel (z. B. Methanol oder Acetonitril) verwendet [13]. Das Laufmittel wird dabei zusammen mit den zu trennenden Substanzen durch die Trennsäule der HPLC geführt. Die Trennsäule enthält eine stationäre Phase, die im Falle der soeben beschriebenen Umkehrphasenchromatographie hydrophobe Eigenschaften besitzt. Die zu untersuchenden Substanzen gehen in eine Wechselwirkung mit der stationären Phase und werden von dieser

zurückgehalten. Über den zeitlichen Verlauf der chromatographischen Trennung lösen sich zunächst die polaren Substanzen von der stationären Phase und werden vom Laufmittel mitgezogen. Mit steigendem Anteil an organischem Lösungsmittel eluieren dann auch die unpolaren Moleküle von der Trennsäule. Auf diese Weise lassen sich für die Substanzen unterschiedliche Retentionszeiten mit hoher Trenneffizienz erhalten.

Bei der Hochtemperatur-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HT-HPLC) handelt es sich im Prinzip um eine Modifikation der klassischen HPLC. Auch hier wird die Trennung durch einen Polaritätsgradienten erreicht, allerdings wird anstelle des Lösungsmittelgradienten ein Temperaturgradient auf die mobile Phase angewendet [14]. Dabei wird der Effekt ausgenutzt, dass die relative Permittivität ϵ_r temperaturabhängig ist. Molekular betrachtet erhöht sich mit steigender Temperatur der Grad der Unordnung der Ladungsträger und die Polarisierbarkeit nimmt aufgrund der zunehmenden Eigenbewegung ab. Daher sinkt die relative Permittivität bei Temperaturerhöhung. Die Abbildung 3-2 verfolgt die relative Permittivität von gesättigtem Wasser und Wasserdampf in einem Temperaturbereich zwischen 0 und 350 °C [15].

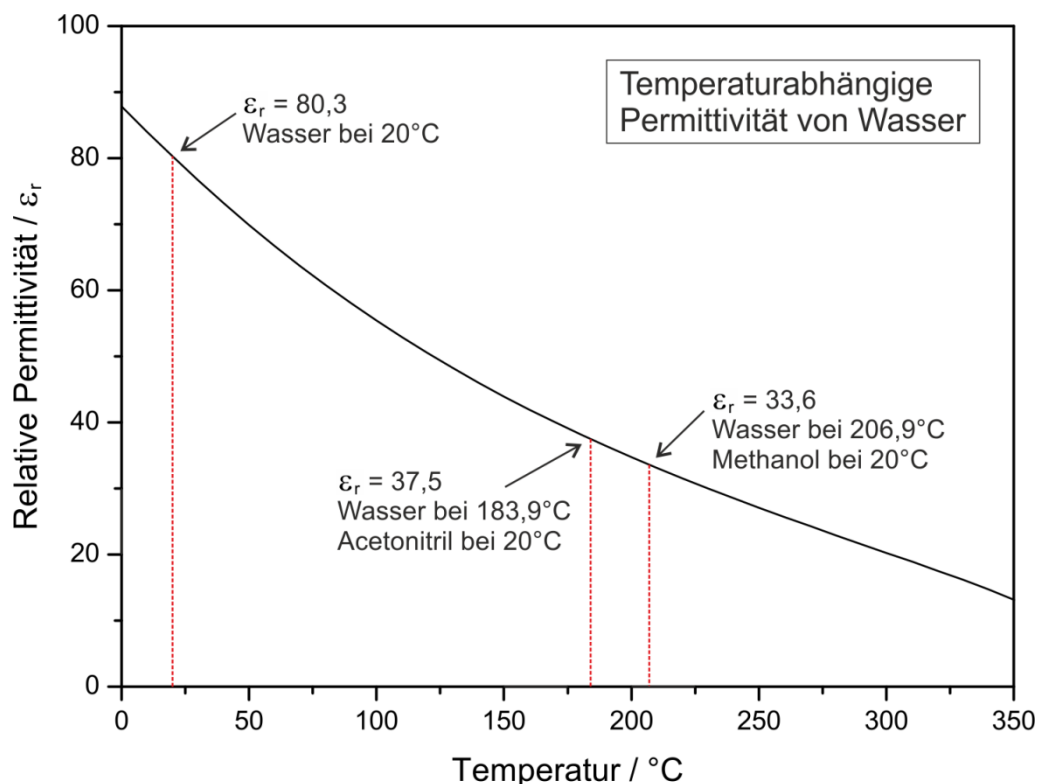


Abbildung 3-2: Auftragung der relativen statischen Permittivität von gesättigtem Wasser und Wasserdampf gegen die Temperatur.

Bei 20 °C liegt ϵ_r bei 80,3 und Wasser zeigt aufgrund seines permanenten Dipols polare Eigenschaften. Wird die Temperatur auf 183,9 °C erhöht, fällt die relative Permittivität auf $\epsilon_r = 37,5$. Dieser Wert entspricht der relativen Permittivität von

Acetonitril bei 20 °C, d.h. Wasser nimmt mit steigender Temperatur zunehmend unpolare Eigenschaften an. Bei 206,9 °C liegt ϵ_r bereits bei 33,6 und entspricht damit der Permittivitätszahl von Methanol bei 20 °C. Durch die Verwendung eines Temperaturgradienten können organische Lösungsmittel wie z. B. Acetonitril oder Methanol, die standardmäßig in der HPLC eingesetzt werden, durch eine rein wässrige mobile Phase mit annähernd gleicher Elutionskraft ersetzt werden.

Insbesondere vor dem Hintergrund der irMS-Kopplung erweist sich die Hochtemperatur-HPLC als geradezu ideal, da organische Lösungsmittel für die irMS aufgrund eines zu hohen CO₂-Messuntergrundes nicht verträglich sind. Auch für die Raman-Spektroskopie ist eine rein wässrige mobile Phase von Vorteil, da Wasser nur wenige Raman-Banden aufweist und die Raman-Signale der zu untersuchenden Substanzen nicht überlagert werden.

3.2 Raman-Spektroskopie

1922 beobachtete Arthur H. Compton, dass die Streuung hochenergetischer Röntgenstrahlung an Elektronen mit einer Frequenzverschiebung in Richtung höherer Wellenlängen einhergeht (Compton-Effekt) [16]. Kurz darauf sagte Adolf Smekal anhand quantenmechanischer Überlegungen einen analogen Effekt für die Streuung von Licht an Molekülen voraus [17]. Im Jahr 1928 konnte dann erstmals die Frequenzverschiebung bei molekularer Lichtstreuung experimentell nachgewiesen werden [18-22]. Die Arbeiten wurden fast zeitgleich von C. V. Raman sowie L. I. Mandelstam und G. S. Landsberg durchgeführt. Da Raman allerdings zuerst publizierte, wurde nur er 1930 für diese Entdeckung mit dem Nobelpreis belohnt. Aus diesem Grund wird heutzutage das frequenzverschobene Streulicht an Molekülen als Raman-Streulicht bezeichnet.

In diesem Kapitel wird eine kurze Einführung in die Raman-Spektroskopie gegeben. Die Darstellung der Raman-Theorie orientiert sich maßgeblich an dem Buch „Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications“ von Bernhard Schrader aus dem Jahr 1995 [23].

3.2.1 Molekulare Lichtstreuung

Befindet sich eine elektromagnetische Welle in unmittelbarer Nähe zu einem Molekül, kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen der Elektronenhülle des Moleküls und dem elektrischen Feld der Welle. Die Art der Wechselwirkung ist stark frequenzabhängig. Trifft z. B. Licht auf ein Molekül, werden die Elektronen aus ihrer Gleichgewichtslage heraus von den Atomkernen verschoben. Dadurch werden Dipolmomente proportional zu der am Molekül befindlichen Feldstärke induziert. Bei der Relaxation der Elektronenhülle wird Energie in Form von

Streulicht abgegeben. Die Molekulare Lichtstreuung lässt sich in die Rayleigh-Streuung sowie die Stokes-Raman- und Anti-Stokes-Raman-Streuung einteilen und kann anhand des in Abbildung 3-3 dargestellten Termschemas beschrieben werden:

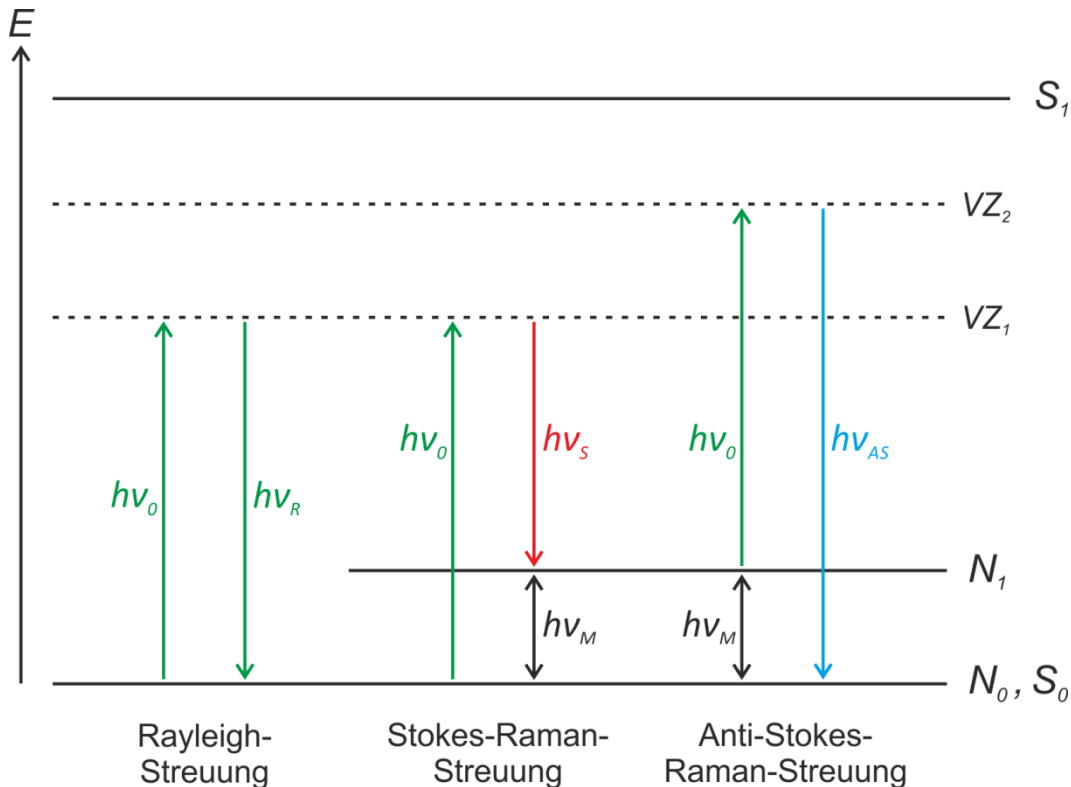


Abbildung 3-3: Termschema zur Rayleigh-, Stokes-Raman- und Anti-Stokes-Raman-Streuung.

$h\nu_0$: Energie des anregenden Lichtquants, $h\nu_R$: Energie der emittierten Rayleigh-Streuung (elastischer Streuprozess), $h\nu_S$: Energie der emittierten Stokes-Raman-Streuung (inelastischer Streuprozess), $h\nu_{AS}$: Energie der emittierten Anti-Stokes-Raman-Streuung (inelastischer Streuprozess), $h\nu_M$: Energie der Raman-aktiven Molekülschwingung, N_0 : Schwingungs-Grundzustand, N_1 : Angeregte Raman-aktive Molekülschwingung, S_0 : Elektronischer Grundzustand, S_1 : Erster elektronisch angeregter Zustand, VZ : Virtuelle Zustände resultierend aus der Elektronenhüllenverzerrung.

Bei dem wahrscheinlichsten Fall molekularer Lichtstreuung handelt es sich um die sog. Rayleigh-Streuung, der ein elastischer Streuprozess zugrunde liegt. Dabei tritt ein Molekül, das sich in einem energetischen Grundzustand (N_0, S_0) befindet, in Wechselwirkung mit einer Lichtwelle der Energie $h\nu_0$. Entsprechend der Elektronenhüllenverzerrung erreicht das Molekül einen sog. „Virtueller Zustand“ (VZ_1). Die Relaxation der Elektronenhülle erfolgt unter spontaner Emission von Streulicht und das Molekül fällt in seinen Grundzustand zurück. Dabei entspricht die Energie der Rayleigh-Streuung ($h\nu_R$) der Energie der wechselwirkenden Lichtwelle ($h\nu_0$) – das Rayleigh-Streulicht emittiert mit der Frequenz des Anregungslichts ($h\nu_R = h\nu_0$). Aus diesem Grund können anhand der Rayleigh-Streuung keine Rückschlüsse auf die Molekülschwingungen und damit auf die Molekülstruktur gezogen werden.

Weitere Möglichkeiten der molekularen Lichtstreuung sind die sog. Stokes- und Anti-Stokes-Raman-Streuung, bei denen es sich um inelastische Streuprozesse handelt. Bei der Stokes-Raman-Streuung wird das Molekül z. B. aus seinem Grundzustand (N_0, S_0) heraus in den virtuellen Zustand VZ_1 angeregt. Bei anschließender Relaxation der Elektronenhülle wird allerdings nur ein Teil der aufgenommenen Energie $h\nu_0$ in Form von Streustrahlung emittiert – es wird ein Raman-aktiver Schwingungszustand (N_1) besetzt. Das Stokes-Raman-Streulicht $(h\nu_S)$ besitzt eine geringere Frequenz als die wechselwirkende Lichtwelle $(h\nu_S = h\nu_0 - h\nu_M)$. Anhand der Frequenzverschiebung lässt sich die Energie der Raman-aktiven Schwingung $(h\nu_M)$ bestimmen und somit können Rückschlüsse auf die Molekülstruktur gezogen werden.

Für den Anti-Stokes-Raman-Streuprozess wird vorausgesetzt, dass sich ein Molekül gemäß Stefan-Boltzmann-Gesetz bereits in einem angeregten Schwingungszustand (N_1) befindet. Durch die Übertragung der Energie $h\nu_0$ und der daraus resultierenden Elektronenhüllenverzerrung wird ein erhöhter virtueller Zustand (VZ_2) eingenommen. Die vollständige Relaxation des Moleküls in seinen Grundzustand (N_0, S_0) führt zu einer Streulichtemission mit höherer Frequenz als das Anregungslicht $(h\nu_{AS} = h\nu_0 + h\nu_M)$.

Die Abbildung 3-4 zeigt ein Streulicht-Spektrum der Substanz Coumarin, in dem Rayleigh-Streuung, Stokes-Raman-Streuung und Anti-Stokes-Raman-Streuung nebeneinander dargestellt sind:

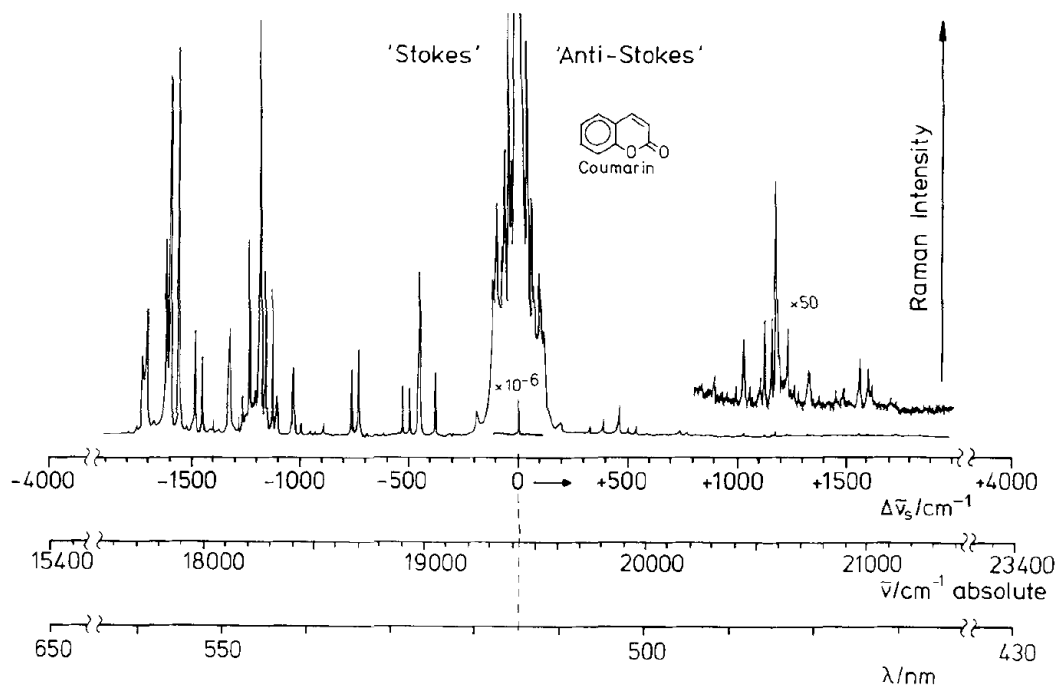


Abbildung 3-4: Raman-Spektrum von Coumarin. Anregung mittels Ar^+ -Laser bei $\lambda = 514,53 \text{ nm}$ entsprechend $\nu = 19435 \text{ cm}^{-1}$. [23]

Um die Vergleichbarkeit der Raman-Spektren mit IR-Absorptionsspektren zu erleichtern, wird die Frequenzverschiebung der Stokes- bzw. Anti-Stokes-Raman-Streuung in relativen Wellenzahlen angegeben. Da die Rayleigh-Streuung mit der Frequenz der Anregungslaserlinie emittiert, liegt sie im Spektrum bei 0 cm^{-1} . Davon ausgehend wird die Stokes-Raman-Streuung in Richtung niedrigerer Frequenzen aufgetragen. Die Anti-Stokes-Raman-Streuung liegt in Bezug auf die Rayleigh-Streuung in Richtung höherer Frequenzen verschoben. Stokes und Anti-Stokes verhalten sich hinsichtlich der Frequenzverschiebung wie Bild und Spiegelbild zueinander, allerdings mit unterschiedlichen Streulichtintensitäten. Die Stokes-Raman-Streuung emittiert in der Regel um den Faktor 10^5 schwächer als die Rayleigh-Streuung. Die vergleichsweise noch niedriger ausgeprägte Anti-Stokes-Raman-Streuung kann entsprechend der Boltzmann-Statistik über die geringere Wahrscheinlichkeit bereits besetzter Energiezustände erklärt werden. Aus diesem Grund wird in der analytischen Praxis meist nur die Stokes-Raman-Streuung zur Strukturaufklärung und Materialcharakterisierung ausgewertet.

3.2.2 Klassische Darstellung des Raman-Effekts

Wie eingangs bereits erwähnt, werden in einem Molekül durch die Wechselwirkung zwischen Licht und Materie Dipolmomente induziert. Die Größe des induzierten Dipolmoments $\vec{\mu}'$ wird maßgeblich durch zwei Faktoren bestimmt, dem elektrischen Feldvektor \vec{E} der anregenden Lichtwelle sowie den Elementen des Polarisierbarkeitstensors $\hat{\alpha}$ des wechselwirkenden Moleküls. Der Polarisierbarkeitstensor stellt dabei ein Maß für die Beweglichkeit der Hüllenelektronen dar.

$$\vec{\mu}' = \hat{\alpha} \cdot \vec{E} \quad (1)$$

$\vec{\mu}'$: Induziertes Dipolmoment

$\hat{\alpha}$: Polarisierbarkeitstensor

\vec{E} : Elektrischer Feldvektor

Formel 1: Beschreibung des Raman-Effekts – Induziertes Dipolmoment (I).

Wird das Molekül von einem alternierenden elektrischen Feld E der Frequenz ν_0 getroffen, wird ein Dipolmoment mit der Frequenz der elektromagnetischen Welle induziert. Anschaulich betrachtet verhält sich das Molekül dann wie eine Antenne und emittiert elektromagnetische Strahlung mit der gleichen Frequenz wie das anregende elektrische Feld. Dieser Vorgang beschreibt einen elastischen Streuprozess, der auch als Rayleigh-Streuung bezeichnet wird. Der Zusammenhang zwischen eingestrahelter Lichtwelle, Polarisierbarkeit und induziertem Dipolmoment kann wie folgt dargestellt werden:

$$\vec{\mu}' = \hat{\alpha} \cdot \vec{E}_0 \cdot \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2)$$

\vec{E}_0 : Maximaler Wert des elektrischen Feldstärkenvektors
 ν_0 : Frequenz des elektrischen Feldes
 t : Laufzeit

Formel 2: Beschreibung des Raman-Effekts – Induziertes Dipolmoment (II).

Die Polarisierbarkeit hängt dabei stark von den Bindungsverhältnissen im Molekül ab. Da die Moleküle Eigenschwingungen besitzen, erfolgt eine alternierende Änderung der Polarisierbarkeit. Die Frequenz des nach Gleichung 2 induzierten Dipolmoments wird daher mit der Frequenz der molekularen Eigenschwingung moduliert. Die harmonische Eigenschwingung eines Moleküls kann durch die Formel 3 in Normalkoordinaten beschrieben werden:

$$q_k = q_k^0 \cdot \cos 2\pi\nu_k t \quad (3)$$

q_k : Harmonische Eigenschwingung entlang der Normalkoordinate
 q_k^0 : Maximale Auslenkung der Elementarteilchen aus ihrer Gleichgewichtslage (Amplitude)
 ν_k : Frequenz der Eigenschwingung

Formel 3: Beschreibung des Raman-Effekts – Molekulare Eigenschwingung.

Da die Amplituden der Eigenschwingungen in einem Molekül sehr klein sind, kann die durch sie hervorgerufene Modulation der Polarisierbarkeit in Form einer Taylor-Reihe mit Abbruch nach dem linearen Glied entwickelt werden:

$$\hat{\alpha}_k = \hat{\alpha}_0 + \left(\frac{\partial \hat{\alpha}}{\partial q_k} \right)_0 q_k^0 \cdot \cos 2\pi\nu_k t \quad (4)$$

$\hat{\alpha}_k$: Modulierter Polarisierbarkeitstensor
 $\hat{\alpha}_0$: Polarisierbarkeitstensor in der Gleichgewichtslage

Formel 4: Beschreibung des Raman-Effekts – Modulierter Polarisierbarkeitstensor.

Die Interaktion zwischen molekularer Eigenschwingung und dem elektrischen Feld der Lichtwelle führt in dem Molekül zu einem modulierten Dipolmoment $\vec{\mu}'_k$. Dazu wird der in Gleichung 4 dargestellte Abbruch der Taylor-Reihe in die Formel 2 eingesetzt:

$$\vec{\mu}'_k = \hat{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t + \left(\frac{\partial \hat{\alpha}}{\partial q_k} \right)_0 q_k^0 \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t \cdot \cos 2\pi\nu_k t \quad (5)$$

$\vec{\mu}'_k$: Moduliertes induziertes Dipolmoment

Formel 5: Beschreibung des Raman-Effekts – Moduliertes induziertes Dipolmoment (I).

Das Produkt der beiden Kosinusfunktionen kann über ein trigonometrisches Additionstheorem zerlegt werden zu:

$$\begin{aligned}\vec{\mu}'_k &= \hat{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi \nu_0 t \\ &+ \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \hat{\alpha}}{\partial q_k} \right)_0 q_k^0 \vec{E}_0 \cos 2\pi (\nu_0 - \nu_k) t \\ &+ \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \hat{\alpha}}{\partial q_k} \right)_0 q_k^0 \vec{E}_0 \cos 2\pi (\nu_0 + \nu_k) t\end{aligned}\quad (6)$$

Formel 6: Beschreibung des Raman-Effekts – Moduliertes induziertes Dipolmoment (II).

Der erste Term der Gleichung beschreibt die Rayleigh-Streuung. Dabei verhalten sich die Frequenz der anregenden Lichtwelle und das induzierte Dipolmoment zueinander kohärent. Die Beiträge der Raman-Streuung werden in der Gleichung durch den zweiten (Stokes-Raman-Streuung) und dritten Term (Anti-Stokes-Raman-Streuung) dargestellt. Demnach ist die molekulare Eigenschwingung nur dann Raman-aktiv, wenn sich die Polarisierbarkeit entlang der Normalkoordinate dieser Schwingung ändert (Auswahlregel). Die Modulation des induzierten Dipolmoments durch die Eigenschwingung des Moleküls äußert sich in zwei zusätzlichen Frequenzbeiträgen $\nu_0 - \nu_k$ (Stokes) und $\nu_0 + \nu_k$ (Anti-Stokes). Aufgrund der Frequenzverschiebung zwischen anregender Lichtwelle und Raman-Streulicht, wird der Raman-Effekt auch als inkohärenter Streuprozess bezeichnet.

3.3 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Bereits im Jahr 1939 fanden Alfred Nier und Earl Gulbransen heraus, dass sich die Kohlenstoffisotopenverhältnisse in lebenden Organismen von denen in mineralischen Verbindungen wie z. B. der Carbonate unterscheiden [24]. Heute weiß man, dass jede chemische Reaktion zu einer Fraktionierung der stabilen Isotope der an der Reaktion beteiligten Elemente innerhalb der reagierenden Moleküle führt. Das gilt sowohl für enzymatisch katalysierte Reaktionen als auch für Reaktionen in Labor und Industrie. Die Isotopenfraktionierung resultiert aus kinetischen, thermodynamischen und magnetischen Isotopeneffekten sowie aus unterschiedlichen Bindungsstärken zwischen leichten und schweren Isotopen eines Elements (i. d. R. reagieren leichte Isotope schneller). Ähnlich eines Fingerabdrucks lassen sich über die Isotopenverhältnisse Aussagen über die (geographische) Herkunft und Authentizität einer Verbindung treffen.

Eine Methode, die diese Informationen zugänglich macht, ist die substanzspezifische Isotopenanalyse (Compound Specific Isotope Analysis, CSIA), bei der die Verhältnisse stabiler Isotope, z. B. der Elemente Kohlenstoff,

Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff bestimmt werden. Die Aufklärung der Isotopensignatur erfolgt dabei über den Einsatz der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (isotope ratio mass spectrometry, irMS). In der Praxis werden für eine Substanz keine absoluten Gehalte der einzelnen Isotope angegeben, sondern die Verhältnisse von schwerem zu leichtem Isotop (z. B. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oder $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$). Die Angabe der Isotopensignatur erfolgt zur besseren Vergleichbarkeit auf Basis der sog. „Delta-Nomenklatur“ in Delta-Werten δ_x (siehe Formel 7).

$$\delta_x = \left(\frac{R_x - R_{Ref}}{R_{Ref}} \right) \cdot 1000 [\text{‰}] \quad (7)$$

δ_x : Delta-Wert der Probe

R_x : Verhältnis stabiler Isotope der Probe

R_{Ref} : Verhältnis stabiler Isotope des Referenzstandard

Formel 7: Berechnung des Delta-Wertes zur Darstellung der Isotopensignatur.

Dabei wird das Isotopenverhältnis einer Probe R_x ins Verhältnis zu einem international anerkannten Isotopenverhältnis-Referenzstandards R_{Ref} gesetzt. Da die Unterschiede in der natürlichen Isotopenzusammensetzung des Referenzmaterials und der Probe sehr klein sind, wird das Verhältnis beider Werte mit 1000 multipliziert und das Ergebnis in Promille angegeben. Im Falle von Kohlenstoff wurde früher als Referenzmaterial Pee Dee Belemnite (PDB), ein Fossil aus der Kreidezeit, verwendet. Da dieses Material nur begrenzt zur Verfügung stand, entwickelte die International Atomic Energy Agency (IAEA) einen synthetisch hergestellten Standard, der in seiner Isotopenzusammensetzung dem originalen PDB gleicht. Dieses Material, auch Vienna PDB genannt, steht heute als primäre Referenz zur Verfügung, ebenso wie verschiedene Materialien für andere Elemente.

3.3.1 Gaschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie (GC-irMS)

In der Geochemie wird die irMS seit bereits einigen Jahrzehnten zur Analyse von flüssigen und festen Proben eingesetzt. Über die Isotopensignatur lassen sich Aussagen zur Probenherkunft oder der Paläotemperatur treffen. Dabei wird die gesamte Probe z. B. durch Verbrennung in die Gasphase überführt und der irMS zugeführt. Die Analyse komplexer Gemische kann hingegen nur durch eine der irMS vorgeschalteten chromatographischen Trennung erfolgen. Heutzutage wird die irMS in vielen Anwendungsbereichen, wie z. B. der Forensik [25-29], Ökologie [30, 31], Umweltchemie [32], Biomedizin [33, 34] oder Lebensmittelchemie [35-39], mit der Gaschromatographie gekoppelt (GC-irMS).

Für polare und schwerflüchtige Analyten lässt sich die Gaschromatographie allerdings nur eingeschränkt nutzen. Zwar können Verbindungen über zusätzliche

Derivatisierungsschritte der Gaschromatographie zugänglich gemacht werden, dabei besteht jedoch das Risiko, dass es zur einer kinetischen Isotopenfraktionierung kommt, die zu einer Verfälschung der Isotopensignatur führt [12]. Für eine breitere Nutzung der irMS ist daher eine Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie unabdingbar.

3.3.2 Flüssigkeitschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie (LC-irMS)

Um die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie erfolgreich umsetzen zu können, müssen die Analyten nach chromatographischer Trennung in die Gasphase überführt werden. Dazu hat sich ein Verfahren durchgesetzt, das im Jahr 2004 von der Firma Thermo Fisher Scientific kommerzialisiert wurde (LC IsoLink™ Interface). Dabei werden die getrennten Analyten zunächst nasschemisch mittels konzentrierter Natriumperoxodisulfat-Lösung und konzentrierter Phosphorsäure bei 99 °C zu CO₂ und Wasser oxidiert. Anschließend wird das CO₂ mittels Membran von der mobilen Phase abgetrennt und der irMS zugeführt. Bei der LC-irMS-Kopplung muss darauf geachtet werden, dass die mobile Phase keine kohlenstoffhaltigen Verbindungen enthält, da zusätzlich entstehendes CO₂ das Analytsignal überlagern würde und eine Bestimmung der exakten Delta-Werte unter diesen Bedingungen nicht möglich ist. Aus diesem Grund wird in der Praxis eine rein wässrige mobile Phase verwendet. Da wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben reines Wasser im Falle der Umkehrphasenchromatographie ein sehr schwaches Lösungsmittel ist, können bei Raumtemperatur nur einige sehr polare Substanzen der Detektion zugänglich gemacht werden. Eine Erweiterung des Substanzspektrums wird durch die Kopplung mit der Hochtemperatur-HPLC erreicht [40].

4 Stand der Technik

In diesem Kapitel soll der aktuelle Stand der Technik hinsichtlich des Einsatzes der Raman-Spektroskopie als Detektionsmethode in der analytischen Flüssigkeitschromatographie dargestellt werden. Dabei werden u. a. Ergebnisse vergangener Arbeiten beschrieben, in denen Raman-Detektoren auf Basis von Flüssigkern-Lichtwellenleitern entwickelt worden sind. Kopplungen, die Raman-verstärkende Effekte wie z. B. Resonanz-Raman oder SERS⁵ ausnutzen, werden nicht diskutiert, da durch deren Einsatz die Substanzauswahl stark eingeschränkt wird. Im Rahmen der Projektplanung wurde ein möglichst universell anwendbarer Raman-Detektor gewünscht. Auch die Kopplung von GC- bzw. LC-irMS wird in diesem Abschnitt nicht weiter vertieft. Das Thema wurde bereits kurz in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 angerissen und kann weiterführend dem Abschlussbericht zu IGF Forschungsvorhaben 16120 N entnommen werden [2].

4.1 Einsatz der Raman-Spektroskopie als HPLC-Detektor

Der Wunsch die Raman-Spektroskopie als strukturaufklärenden Detektor in der HPLC einzusetzen zu können ist nicht neu. Erste Versuche einer echten Online-Kopplung gehen auf das Jahr 1996 zurück. Die Arbeitsgruppe um Hong et al. beschreibt in der Publikation *“Coupling of high-performance liquid chromatography with Raman spectrometry”* die Entwicklung einer Raman-Durchflusszelle, die weitgehend dem Aufbau einer zum damaligen Zeitpunkt typischen UV-Durchflusszelle entsprach [41]. In der Arbeit wurde das Detektionslimit des Raman-Detektors am Beispiel von Toluol bestimmt. Dazu wurde die ausgeprägte Ringschwingung des Aromaten bei 1002 cm^{-1} verfolgt. Als mobile Phase wurde ein Acetonitril / Wasser-Gemisch (75 : 25, v / v) mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} verwendet. Die Nachweisgrenze lag bei $9,6\text{ }\mu\text{g}$ Toluol, das auf die Trennsäule der HPLC aufgegeben wurde. Für Toluol waren die damaligen HPLC-UV-Detektoren um etwa den Faktor 500 empfindlicher.

In den Jahren 1997 und 1998 wurden von der Arbeitsgruppe Steinert, Bettermann und Kleinermanns zwei Publikationen veröffentlicht, in denen eine empfindliche Raman-Apparatur entwickelt und mit einer HPLC gekoppelt wurde [42, 43]. Allerdings wurde in dieser Arbeit keine Online-Kopplung zwischen Raman-Detektor und HPLC realisiert, sondern die Proben nach chromatographischer Trennung zunächst gesammelt und anschließend separat vermessen. Zur Steigerung der Messempfindlichkeit wurde die Probenzelle in einen Laserresonator integriert, um eine größtmögliche Photonendichte des Anregungslichtes zu erreichen. Zwecks Erfassung einer maximalen Anzahl von

⁵ SERS: Surface-enhanced Raman scattering

Raman-Photonen wurde das Streulicht durch große Fresnellinsen gesammelt. Mit dem Raman-Detektor wurden die zuvor chromatographisch getrennten Substanzen Benzol, Toluol, o-Xylol und m-/p-Xylol (konnte nicht aufgetrennt werden) vermessen. Die Erfassungsgrenzen für die genannten Aromaten lagen zwischen 10^{-5} und 10^{-6} mol L⁻¹. Zum damaligen Zeitpunkt war der erreichte Konzentrationsbereich für die Raman-Spektroskopie außerordentlich gut. Eine kommerzielle Verwertung in Richtung HPLC-Detektor blieb allerdings aus, da auch der apparative Aufwand außerordentlich war.

4.2 Raman-Spektroskopie in Flüssigkern-Lichtwellenleitern

Erste Versuche zu Raman-spektroskopischen Messungen in Flüssigkern-Lichtwellenleitern gehen auf die frühen 1970er Jahre zurück. Walrafen und Stone befüllten dazu 10 bis 25 Meter lange Fused-Silika-Kapillaren mit hochbrechenden Flüssigkeiten wie z. B. Benzol. Infolge der Totalreflexion an der Kapillarinnenwand konnte das Laserlicht eines 488 nm Argon-Ionen-Lasers über die gesamte Kapillarweglänge durch das Benzol transportiert werden. Die dabei entstandene Raman-Streuung des Benzols konnte um den Faktor 10^2 bis 10^3 intensiver detektiert werden, als es bei Vergleichsmessungen in damals üblichen Raman-Probenzellen möglich war [44]. Ähnliche Arbeiten wurden auch von Ross und McClain sowie Schwab und McCreery in den Jahren 1981 und 1987 durchgeführt [45, 46].

Aufgrund des Brechungsindex der Fused-Silika-Kapillaren bei etwa 1,46 im sichtbaren Spektralbereich konnten zur Erreichung der Totalreflexion nur Substanzen mit höheren Brechzahlen in die Kapillaren gefüllt werden. Diese Einschränkung in der Substanzauswahl führte dazu, dass die Kombination aus Flüssigkern-Lichtwellenleiter und Raman-Spektroskopie bis etwa 1997 eher wenig Beachtung fand.

Frischen Wind in die Forschung brachte dann Anfang der 1990er Jahre die Entwicklung eines neuen Spezialpolymers durch die Firma DuPont mit dem Handelsnamen Teflon® AF (AF: Amorphous Fluoropolymer) [47-49]. Das Material zeigt einen für Polymere bisher unerreicht niedrigen Brechungsindex von $n_D \leq 1,29$ und stellt somit ein ideales Material zur Herstellung von Flüssigkern-Lichtwellenleitern dar (siehe dazu Kapitel 7.3.2.1 bis 7.3.2.3, sowie Kapitel 11.3). Zwischen den Jahren 1997 und 2004 wurde die Technologie des Flüssigkern-Lichtwellenleiters auf Basis von Teflon® AF sowie die Anwendbarkeit hinsichtlich der Raman-Spektroskopie intensiv untersucht [50-56].

Die Arbeitsgruppe um Altkorn und Koev führte z. B. Messungen zur Bestimmung der optischen Dämpfung von mit Wasser, Methanol, Ethanol und Acetonitril befüllten Teflon AF 2400 Kapillaren durch [51]. Es konnte gezeigt werden, das

der Lichttransport durch die flüssige Phase für einen großen Teil des sichtbaren Spektralbereichs einer Dämpfung zwischen 2 und 3 dB m⁻¹ unterliegt. Am Beispiel des Raman-Spektrums von Acetonitril als lichtleitender Kern der Teflon AF 2400 Kapillare konnte gezeigt werden, dass sich die Raman-Intensität bei Verlängerung des Flüssigkern-Lichtwellenleiters erhöht. Die Abhängigkeit der Signal-Intensität der prägnanten CN-Schwingung bei 2253 cm⁻¹ von der Kapillarlänge zeigt die Abbildung 4-1.

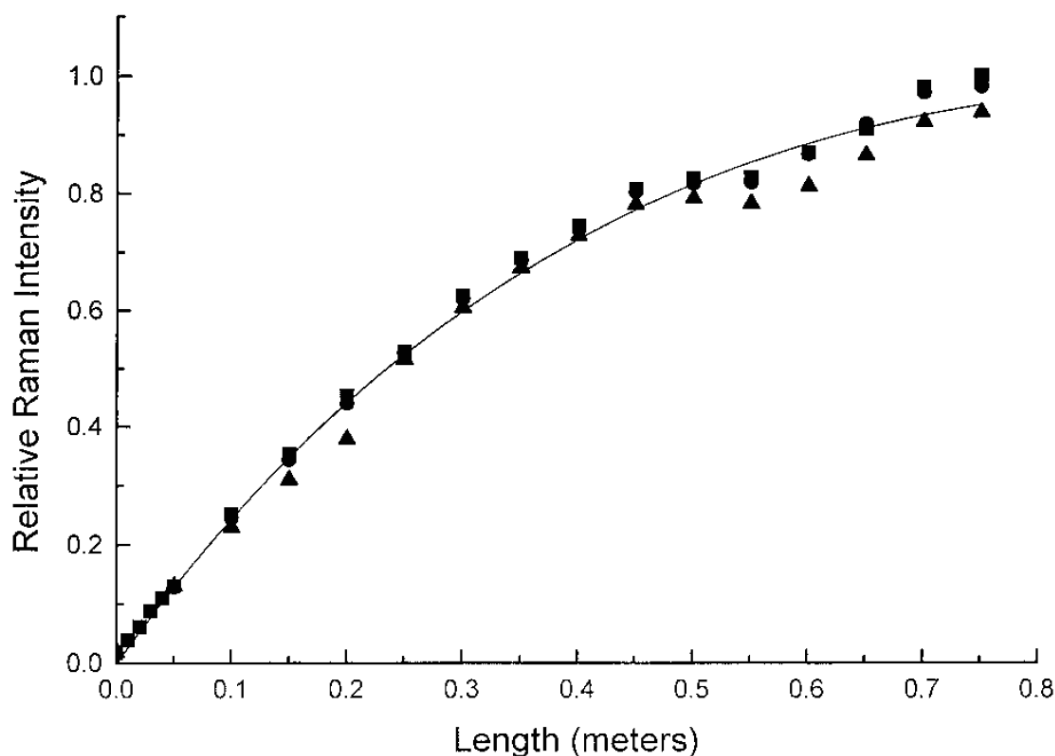


Abbildung 4-1: Normierte Raman-Intensität der CN-Schwingung von Acetonitril bei 2253 cm⁻¹ in Abhängigkeit zur Länge des Teflon AF 2400 Flüssigkern-Lichtwellenleiters mit 250 µm Innendurchmesser. Laserwellenlänge: 514,5 nm, Ausgangsleistung: 350 µW. [51]

Der leichte Intensitätseinbruch zwischen 0,5 und 0,65 m wird von den Autoren auf Materialfehler in diesem Kapillarbereich zurückgeführt. Der Auftragung kann entnommen werden, dass eine Kapillare mit einer Länge von 40 cm ein optimales Verhältnis zwischen Raman-Intensität und Zellvolumen zeigt (für die verwendete Anregungswellenlänge von 514,5 nm). Diese Information ist insbesondere für die Kopplung mit der HPLC interessant, da lange Kapillarwege und Probenvolumen vermieden werden müssen.

Qi und Berger führten im Jahr 2004 Raman-spektroskopische Untersuchungen an verschiedenen Substanzen durch und verglichen dabei u. a. die erhaltenen Raman-Intensitäten zwischen den Messungen in Flüssigkern-Lichtwellenleitern und den herkömmlichen Messungen in optischen Küvetten [55]. Für eine

Lysozym-Lösung konnte eine Verstärkung der Raman-Intensität um den Faktor 500 beobachtet werden.

4.3 Einsatz der Flüssigkern-Lichtwellenleiter-Raman-Spektroskopie in der HPLC

Schnell wurde erkannt, dass eine Raman-Durchflusszelle auf Basis eines Teflon® AF Flüssigkern-Lichtwellenleiters ideale Voraussetzungen mit sich bringt, um die Raman-Spektroskopie als Detektor für die HPLC einzusetzen. Neben der Verstärkung der Raman-Intensität können durch die Verwendung einer Kapillare als Raman-Durchflusszelle extrem kleine Probenvolumen erzielt werden. Forschungsarbeit auf diesem Gebiet wurde maßgeblich in Jahren 1999 bis 2004 geleistet [57-61].

Den Auftakt dazu gaben zwei Forschergruppen ungefähr zeitgleich und unabhängig voneinander. Die US-amerikanische Arbeitsgruppe um Brian J. Marquardt et al. und das niederländische Forscherteam um Reyer J. Dijkstra et al. publizierten beide die Kopplung einer HPLC mit der Flüssigkern-Lichtwellenleiter verstärkten Raman-Spektroskopie in der gleichen Ausgabe Nr. 71 des Journals Analytical Chemistry von 1999 [57, 58].

Dijkstra et al. untersuchten mit der HPLC/Raman-Kopplung aromatische Nitro-Verbindungen in einer mobilen Phase aus einem Wasser/Methanol-Gemisch. Eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zeigt die Abbildung 4-2. In dem System wird eine 30 cm lange Teflon AF 2400 Kapillare mit einem Innendurchmesser von 280 µm verwendet. Die Raman-spektroskopische Erfassung erfolgte online nach chromatographischer Trennung der Substanzen. Die Erfassungsgrenze des Raman-Detektors zeigte sich dabei stark substanzabhängig. Für 4-Nitroanilin wurde eine Nachweisgrenze von 10 mg L⁻¹ ermittelt, Nitrobenzol hingegen musste für eine Detektion mit einer Konzentration von 500 mg L⁻¹ vorliegen.

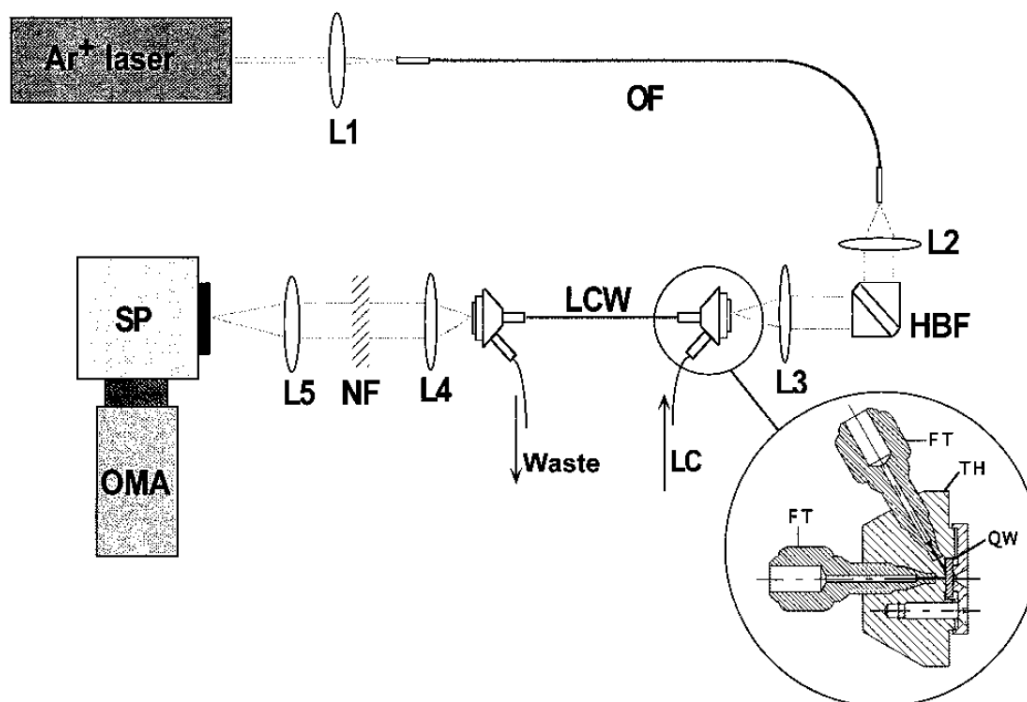


Abbildung 4-2: Online-Kopplung von HPLC und Raman-Spektroskopie mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach Dijkstra et al. (Teflon AF 2400: $l = 30$ cm, ID = 280 μm). Laserwellenlänge: 514,5 nm, Laserleistung im FK-LWL: 40 mW. [57]

Marquardt et al. untersuchten mit ihrem Raman-Aufbau die chromatographische Trennung von 10 Alkoholen in einer wässrigen mobilen Phase. Die Abbildung 4-3 zeigt einen schematischen Aufbau der Kopplung:

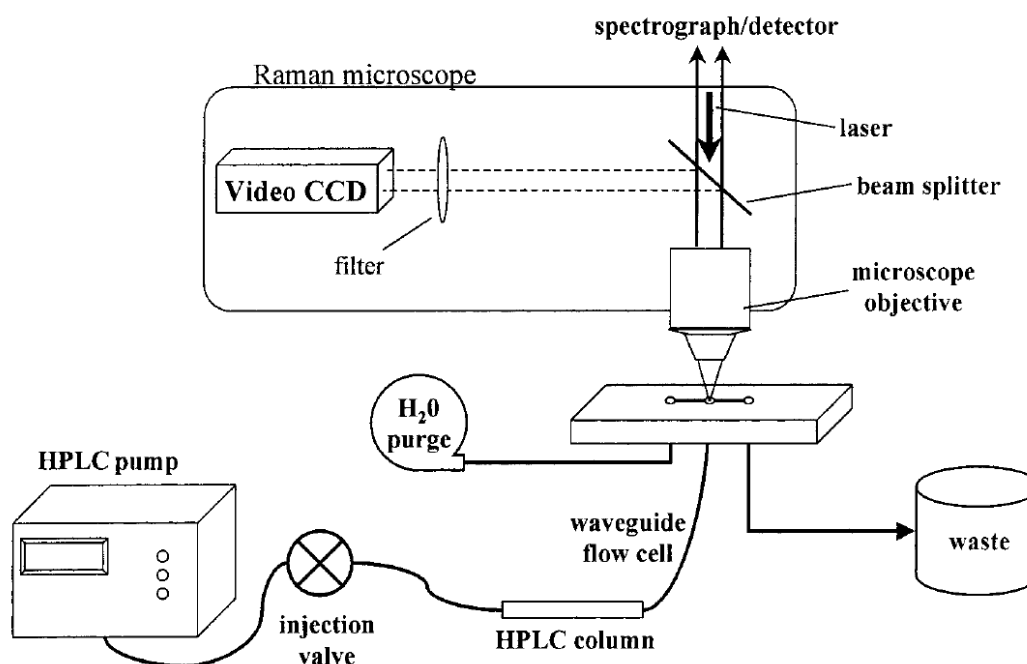


Abbildung 4-3: Online-Kopplung von HPLC und Raman-Spektroskopie mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach Marquardt et al. (Teflon AF 2400: $l = 1$ m, ID = 50 μm). Laserwellenlänge: 785 nm, Laserleistung im FK-LWL: 60 mW. [58]

Als Flüssigkern-Lichtwellenleiter wurde eine 1 Meter lange Teflon AF 2400 Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 μm verwendet. Für Isopropanol wurde eine Erfassungsgrenze von 2 mg L^{-1} bestimmt. Durch den Einsatz des Flüssigkern-Lichtwellenleiters konnte eine Verstärkung der Raman-Intensität um den Faktor 10^3 erreicht werden.

Die letzten bekannten Arbeiten zur Kopplung von HPLC und Raman-Detektion mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter stammen von Dijkstra et al. und Tanikkul et. al. und wurden zwischen 2001 bis 2004 publiziert [59-61]. Dijkstra et al. stellten u. a. Berechnungen an, um die optimale Länge des Flüssigkern-Lichtwellenleiters bei verschiedenen Laserfrequenzen zu ermitteln [59]. Im Falle einer wässrigen mobilen Phase erhöht sich mit steigender Wellenlänge die optische Dämpfung im Flüssigkern-Lichtwellenleiter. Für eine Laserwellenlänge von 532 nm wurde eine optimale Länge des Flüssigkern-Lichtwellenleiters von 94 bis 111 cm (in Abhängigkeit von der Frequenz der Raman-aktiven Schwingung) bestimmt. Für 785 nm liegt die optimale Länge zwischen 12 und 29 cm.

Zwischen 2004 und 2005 erschienen noch zwei Übersichtsartikel, die eine allgemeine Einschätzung zum Stand der Technik sowie zur Anwendbarkeit von Flüssigkern-Lichtwellenleitern und Raman-Spektroskopie im Bereich der Routineanalytik geben [62, 63]. Trotz positivem Résumé und dem vielfach dargelegten hohen Potential dieser Methode, konnte sich bis heute kein Raman-Detektor auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters etablieren. Der Grund dafür scheint die immer noch relativ niedrige Empfindlichkeit der Raman-Spektroskopie zu sein, insbesondere vor dem Hintergrund, dass heutzutage fast jedes Routinelabor mit hochempfindlichen Massenspektrometern ausgerüstet ist.

5 Rahmenbedingungen und Zielsetzungen bei der Entwicklung des Raman-Detektors

Die interdisziplinäre Verknüpfung der eingesetzten analytischen Methoden führt zu einigen Einschränkungen, die bei der Entwicklung des Raman-Detektors berücksichtigt werden müssen. Sowohl bei der Hochtemperatur-HPLC, als auch der irMS handelt es sich (mess)technisch betrachtet um äußerst empfindliche Systeme, deren Messparameter nur in einem sehr begrenzten Rahmen verändert werden dürfen. Bereits die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der irMS stellte in den vergangenen Jahren einen beträchtlichen Forschungs- und Entwicklungsaufwand dar (siehe Kapitel 3.3.2). Die zusätzliche Einbindung der Raman-Spektroskopie erfordert daher ein äußerst fein abgestimmtes Gesamtsystem, in dem die Funktionalität aller Einzelkomponenten weitgehend erhalten bleibt.

Die Entwicklung des Raman-Detektors ist daher stark durch die Vorgaben der Hochtemperatur-HPLC und irMS geprägt. In den folgenden Unterkapiteln werden diese Vorgaben diskutiert und die Rahmenbedingungen für die Detektor-Entwicklung festgelegt. Dabei soll vor allem die Komplexität der Detektor-Integration verdeutlicht und die damit verbundenen Schwierigkeiten herausgearbeitet werden.

5.1 Empfindlichkeit / Nachweisgrenze des Raman-Detektors

Bei der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie wird die Nachweisgrenze durch die irMS limitiert. Ziel dieser Arbeit ist es, einen Raman-Detektor zu entwickeln, der mindestens die Empfindlichkeit der irMS erreicht, um somit eine Reduzierung der Nachweisgrenze in der Gesamtkopplung zu vermeiden. Um eine Abschätzung der Machbarkeit für dieses Vorhaben zu geben, muss zunächst eine einheitliche Darstellung für die Angabe der Nachweisgrenze stattfinden.

Im Falle der HT-HPLC/irMS-Kopplung macht es Sinn, die absolute Masse einer Substanz (z. B. ng oder μg), bzw. die entsprechende Stoffmenge (z. B. nmol) anzugeben, die auf die Trennsäule der Flüssigkeitschromatographie aufgetragen wird. Alternativ kann aber auch die Konzentration der gemessenen Stammlösung (z. B. mg L^{-1}) zusammen mit der Menge des injizierten Volumens (z. B. μL) angegeben werden. Nach *Schmidt et al.* liegt die Detektionsgrenze der hier eingesetzten HT-HPLC/irMS-Kopplung für eine eindeutige Identifikation der $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffisotopen-Signatur von Coffein bei 12,4 nmol Kohlenstoff, der auf die Trennsäule der HT-HPLC aufgetragen werden muss [64]. Vorausgesetzt

einer vollständigen Oxidation des gesamten Kohlenstoffs zu CO_2 liegt z. B. die Nachweisgrenze für Coffein bei insgesamt ca. 4,8 μg .

Diese Nachweisgrenze ist allerdings ohne weitere Informationen nicht so einfach auf den zu entwickelnden Raman-Detektor übertragbar. Um im Vorfeld eine Aussage über die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie hinsichtlich ausreichender Empfindlichkeit treffen zu können, ist es nötig, die Detektionsgrenze der irMS auf eine Konzentration umzurechnen, wie sie später in der Raman-Detektionszelle vorliegen wird. Bei der Kopplung von flüssigkeitschromatographischen Verfahren mit spektroskopischen Detektoren ist es vorteilhaft, mit Peak-Konzentrationen zu arbeiten. Dazu wird die absolute Masse an Substanz, die auf die Trennsäule aufgetragen wird, in das Verhältnis zum Peak-Volumen gesetzt, in dem die Substanz nach chromatographischer Trennung vorliegt (Elutions-Peak-Volumen). Diese Darstellung der Messkonzentration bietet den Vorteil, dass die Nachweisgrenze immer in Relation zur Qualität der chromatographischen Trennung, sprich der Peak-Breite, bestimmt wird. Auf diese Weise kann die Nachweisstärke diverser flüssigkeitschromatographischer Detektionssysteme miteinander verglichen werden. Der Einfluss der chromatographischen Trennleistung auf die Peak-Konzentration wird in der Abbildung 5-1 verdeutlicht.

In dem Diagramm sind exemplarisch vier Peak-Profile dargestellt, die mittels Gauß-Verteilungsfunktion simuliert worden sind. Angelehnt an eine chromatographische Detektion wird die Konzentration einer von der Säule eluierenden Substanz gegen die Zeit (Retentionszeit) aufgetragen. Die Elutions-Peak-Breiten betragen beispielhaft 10, 20, 40 und 80 Sekunden auf der Basislinie. Vorausgesetzt einer konstanten Flussrate kann die Peak-Breite auch als eluiertes Volumen der mobilen Phase (Peak-Volumen) dargestellt werden. Die Peak-Konzentration ist definiert als die Substanzmenge, die sich in dem Peak-Volumen verteilt. Da die Substanzmenge (Fläche unter den Kurven) entsprechend der Gauß-Verteilung bei allen vier Peaks gleich groß ist, verhält sich die Peak-Konzentration linear zur Peak-Breite bzw. zum Peak-Volumen. Wie bereits erwähnt setzt diese Betrachtungsweise natürlich voraus, dass erstens der Elutions-Peak durch eine Gaußverteilung beschrieben werden kann und zweitens die Flussrate konstant ist.

Im Folgenden soll anhand der in Abbildung 5-1 dargestellten Peak-Breiten eine Abschätzung gegeben werden, mit welchen Peak-Konzentrationen die eingangs erwähnte Substanz Coffein in der mobilen Phase vorliegen wird, wenn die absolut eingetragene Substanzmenge im Bereich der irMS-Nachweisgrenze bei 12,4 nmol Kohlenstoff liegt (siehe oben). Für die Berechnung wird eine für die HT-HPLC/irMS-Kopplung anwendungstypische Flussrate von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ angenommen. Entsprechend der Peak-Breiten von 10, 20, 40 und 80 s ergeben sich Peak-Volumen von ca. 83, 167, 333 und 667 μL .

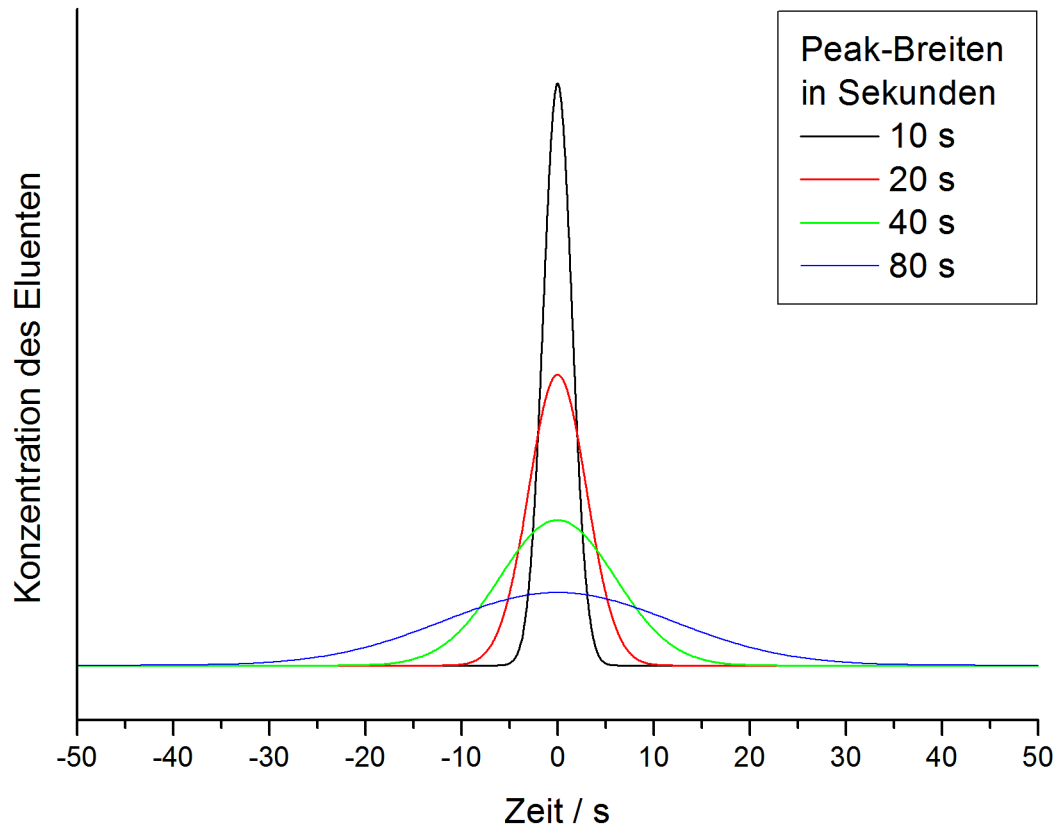


Abbildung 5-1: Darstellung unterschiedlicher Elutions-Peak-Breiten mittels Gauß-Verteilungskurven.

Wie bereits erwähnt, liegt für Coffein die Nachweisgrenze der irMS bei insgesamt ca. $4,8 \mu\text{g}$ auf der Trennsäule. Dementsprechend können die erwarteten Peak-Konzentrationen auf 58 mg L^{-1} (bei 10 s Peak-Breite), 29 mg L^{-1} (bei 20 s), $14,5 \text{ mg L}^{-1}$ (bei 40 s) und $7,25 \text{ mg L}^{-1}$ (bei 80 s) berechnet werden. Anhand dieser Abschätzung wurde zu Beginn der Arbeiten als Projektziel definiert, dass die Nachweisgrenze des Raman-Detektors bei einer Peak-Konzentration von ca. 1 mg L^{-1} liegen soll. Dieser Wert unterschreitet die Detektionsgrenze kommerziell verfügbarer Raman-Detektoren um den Faktor 100 bis 1000.

5.2 Verfügbare Messzeit

Ein weiteres Projektziel sah vor, dass der Raman-Detektor zwischen HT-HPLC und irMS als Durchflusszelle integriert wurde und die Raman-spektroskopischen Messungen online erfolgen sollten. Eine flussunterbrechende Analyse (stopped-flow) wurde von vorneherein ausgeschlossen, da diese Methode die Diffusion der Analyten in der mobilen Phase begünstigt und somit zu unerwünschten Peak-Verbreiterungen, im schlimmsten Fall zu einer Rückvermischung der getrennten Proben führen kann.

Aufgrund der Online-Messung ist das Zeitfenster für die Raman-spektroskopische Erfassung begrenzt und wird maßgeblich durch die Peak-Breiten der Eluenten bestimmt. Diese betragen im Falle der hier vorliegenden HT-HPLC/irMS-Kopplung bei einer Flussrate von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ mindestens 10 bis 20 Sekunden (auf der Basislinie des UV-Chromatogramms) und können z. B. bei den Steroiden auch zwischen 60 und 120 Sekunden liegen (Steroide sind mit rein wässrigem Eluenten schwer zu trennen). Laut *M. Swartz* gilt im Bereich chromatographischer Trennverfahren die allgemeine Faustregel, dass mindestens 20 Datenpunkte für eine vernünftige Peak-Integration benötigt werden [65]. Das würde bedeuten, dass bei einem Substanz-Peak, der in einem Zeitraum von 10 s die Messzelle durchläuft, alle 0,5 s eine Raman-spektroskopische Messung durchgeführt werden müsste. In Anbetracht der für die Raman-Spektroskopie sehr niedrigen Peak-Konzentrationen (siehe Kapitel 5.1) sind 0,5 s Detektionszeit möglicherweise zu kurz (die Empfindlichkeit der Raman-Spektroskopie verhält sich proportional zur Belichtungszeit des Detektors). Aus diesem Grund wurde entschieden, dass einer Peak-Integration anhand der Raman-Daten keine Priorität zukommt, insbesondere auch deshalb, da für diesen Zweck ein standardmäßiger UV-Detektor zwischen HT-HPLC und Raman-Detektor geschaltet werden kann.

Die Detektionszeit für die Raman-spektroskopische Erfassung wurde daher anhand entsprechender Erfahrungswerte für die zu erwartenden Peak-Breiten in der HT-HPLC/irMS-Kopplung auf maximal 10 Sekunden pro Messung festgelegt.

5.3 Volumen der Durchflusszelle

Das Volumen der Durchflusszelle spielt im Rahmen dieser Kopplung eine sehr zentrale Rolle. Aus chromatographischer Sicht sollte das Zellvolumen möglichst klein sein um eine Peak-Verbreiterung nach chromatographischer Trennung zu vermeiden. Dies ist insbesondere für die nach der Raman-Detektion geschalteten irMS wichtig, die ohnehin als letzter Detektor in der Kopplung aufgrund langer Kapillarwege (ca. 300 cm vom Säulenausgang bis zum Oxidationsreaktor) mit verbreiterten Substanz-Peaks arbeiten muss. Kommerziell verfügbare UV-

Detektoren für die HPLC besitzen typischerweise Durchflusszellen mit Volumen zwischen 1 und 10 μL . Das zulässige Volumen für die Raman-Durchflusszelle wurde hinsichtlich der nachgeschalteten irMS auf maximal 5 μL festgelegt.

5.4 Druckstabilität der Durchflusszelle

Ein wichtiger Aspekt ist die Frage nach der geforderten Druckstabilität der Raman-Durchflusszelle. Im Normalfall befindet sich ein HPLC-Detektor am Ende der HPLC und die Eluenten werden nach der Detektion entweder aufgefangen oder in den Abfall befördert. D. h., ein sofortiger Druckabfall unmittelbar hinter der Durchflusszelle stellt für die chromatographische Trennung kein Problem mehr dar. Im Falle der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung muss allerdings die chromatographische Auftrennung der Substanzen bis in den Oxidationsreaktor der irMS erhalten bleiben. Aus diesem Grund müssen die Verbindungskapillaren, die die mobile Phase durch das Gesamtsystem führen, möglichst kleine Innendurchmesser besitzen. In diesem Aufbau wurden PEEK-Kapillaren mit 127 μm Innendurchmesser (Normkapillare mit ID = 0,005") verwendet. Da die irMS innerhalb des LC IsoLink™ Interface ca. 100 cm Kapillarweg verbaut hat und die Verbindung zwischen Raman-Durchflusszelle und IsoLink weitere 100 cm Verbindungskapillare benötigt, liegen hinter der Raman-Zelle ca. 200 cm Kapillare mit einem Innendurchmesser von 127 μm an. Bei einer Flussrate (Volumenstrom) von 0,5 mL min^{-1} und der dynamischen Viskosität von Wasser als mobiler Phase von 1 mPa s (bei 20 °C) kann der durch die Kapillare erzeugte Gegendruck nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille berechnet werden. Dem vorausgesetzt wird ein linearer Druckabfall entlang der gesamten Kapillare:

$$\Delta p = \frac{8 \cdot \eta \cdot l \cdot \dot{V}}{\pi \cdot r^4} \quad (8)$$

Δp : Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende der Kapillare

η : Dynamische Viskosität der mobilen Phase

l : Länge der Kapillare

\dot{V} : Volumenstrom durch die Kapillare

r : Innenradius der Kapillare

Formel 8: Gesetz von Hagen-Poiseuille zur Berechnung des Druckabfalls in Kapillaren.

Der Gegendruck beträgt bei genannten Parametern 26,1 bar. Aus diesem Grund wurde geplant, dass die Raman-Durchflusszelle im Dauereinsatz bis mindestens 35 bar druckstabil sein sollte.

6 Analytenauswahl

Die Funktionsfähigkeit der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung soll anhand von Gemischen ausgewählter Testsubstanzen überprüft werden. Die Zusammenstellung anwendungsbezogener Substanzgemische erfolgte im Rahmen des IGF-Forschungsvorhaben 16120 N.

Aus dem Bereich der Lebensmittelchemie wurden die sechs Lebensmittelzusatzstoffe Coffein, Theobromin, Theophyllin, Aspartam, Catechin und Rutin vermessen. Diese Substanzen finden sich z. B. in Mixgetränken wie Eistee wieder. Verwendet z. B. ein Hersteller ausschließlich natürliche Tee-Extrakte für seine Getränke, kann das anhand des Kohlenstoffisotopenverhältnisses bestätigt werden. Plagiate, mit z. B. synthetisch zugesetzten Aromastoffen, können auf diese Weise identifiziert und aus dem Verkehr gezogen werden.

Die Charakterisierung pharmazeutischer Wirkstoffe wurde am Beispiel der Antibiotika durchgeführt. In die Substanzliste wurden die fünf Sulfonamide Sulfadiazin, Sulfamerazin, Sulfamethazin, Sulfathiazol und Sulfamethoxazol aufgenommen, die bei bakteriellen Infektionen eingesetzt werden. Sulfonamide werden synthetisch hergestellt. Je nach eingesetzten Syntheseverfahren oder der Herkunft der Edukte zeigen die Präparate der Hersteller charakteristische Kohlenstoffisotopenverhältnisse. Eine sechste in die Gruppe der Antibiotika einzuordnende Substanz ist Trimethoprim. Dieser Wirkstoff wurde in die Substanzliste aufgenommen, da er häufig zur Erweiterung des Wirkspektrums in Kombination mit z. B. Sulfamethoxazol verabreicht wird (Cotrimoxazol, kurz Cotrim).

Die Anwendbarkeit der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung im Bereich der Dopinganalytik wurde anhand von acht anabolen Steroiden untersucht. Als Testsubstanzen wurden Testosteron, Epitestosteron, Nandrolon, Prasteron, Androsteron, Etiocholanolon, Dihydroandrosteron und Pregnantriol charakterisiert. Diese Substanzen werden heutzutage typischerweise in der Steroiddopingkontrolle mittels GC-irMS verwendet. Anhand des Kohlenstoffisotopenverhältnisses kann zwischen natürlichen und synthetischen Steroiden unterschieden werden. Leistungssportler können auf diese Weise der unerlaubten Einnahme anaboler Steroide überführt werden.

Weitere Informationen zur Analytenauswahl können dem Abschlussbericht zu IGF Forschungsvorhaben 16120 N entnommen werden [2]. Eine zusammenfassende Übersicht der untersuchten Substanzen befindet sich in der Tabelle 6-1:

Tabelle 6-1: Zusammenstellung ausgewählter Testsubstanzen.

Substanzklasse	Freiname	CAS Nummer	Lieferant	Reinheit
Lebensmittel- zusatzstoffe	Coffein	58-08-2	Sigma-Aldrich	≥ 97 %
	Theophyllin	58-55-9	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Theobromin	83-67-0	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Aspartam	22839-47-0	Sigma-Aldrich	≥ 98 %
	Catechin	18829-70-4	Fluka	≥ 98,5 %
	Rutin	153-18-4	Acros Organics	≥ 97 %
Antibiotika (Sulfonamide & Trimethoprim)	Sulfadiazin	68-35-9	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Sulfamerazin	127-79-7	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Sulfamethazin	57-68-1	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Sulfathiazol	72-14-0	Fluka	≥ 98 %
	Sulfamethoxazol	723-46-6	Sigma-Aldrich	≥ 99,9 %
	Trimethoprim	738-70-5	Sigma-Aldrich	≥ 99,1 %
Anabolika (Steroide)	Testosteron	58-22-0	Sigma-Aldrich	≥ 95 %
	Epitestosteron	481-30-1	Sigma-Aldrich	≥ 95 %
	Nandrolon	434-22-0	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Prasteron	53-43-0	Sigma-Aldrich	≥ 99 %
	Androsteron	53-41-8	Acros Organics	≥ 97 %
	Etiocholanolon	53-42-9	Sigma-Aldrich	≥ 95 %
	Dihydroandrosteron	1852-53-5	Sigma-Aldrich	≥ 95 %
	Pregnantriol	1098-45-9	Sigma-Aldrich	≥ 95 %

7 Experimentelle Arbeiten

7.1 Aufbau eines Raman-Mikroskop-Spektrometers

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer effizienten online-Kopplung von Raman-Spektrometer und Hochtemperatur-HPLC. Dazu müssen niedrige Probenkonzentrationen in wässriger Lösung mit begrenzt zur Verfügung stehender Messzeit Raman-spektroskopisch erfasst werden. Da es sich bei der Raman-Spektroskopie um eine relativ unempfindliche Messmethode handelt, wurde für dieses Vorhaben ein sehr empfindliches und überaus lichtstarkes Raman-Spektrometer konzipiert. Alle Komponenten des Spektrometer-Aufbaus wurden hinsichtlich einer hohen Quanteneffizienz ausgewählt und dann modular zu einer sehr offen gestalteten Raman-Messanordnung zusammengeführt. Dieser flexible Eigenbau ermöglicht eine schrittweise Erweiterung und Optimierung der Apparatur und erleichtert somit die Integration des Raman-Spektrometers zwischen Hochtemperatur-HPLC und irMS.

Als Basiskomponenten für den Raman-Spektrometer-Aufbau werden ein diodengepumpter Festkörperlaser, ein Transmissionsgitter-Monochromator und eine Tieftemperatur-Detektorkamera eingesetzt. Die Gerätespezifikationen laut Herstellerangaben sind im Anhang in Kapitel 11.1 tabellarisch hinterlegt.

7.1.1 Der Laser

Bei dem Lasersystem handelt es sich um das Modell Millennium Pro 2s der Firma Newport / Spectra-Physics (siehe Abbildung 7-1). Das System setzt sich aus einem 19 Zoll Gehäuse (*Model J20I, Internal Diode Laser, Power Supply*), einem Laserkopf (*Millennia Pro 2s Laser Head*) und einem Steuergerät (*Millennia Controller*) zusammen [66].

In dem dem 19 Zoll Gehäuse ist neben der Stromversorgung die Pumplaserdiode mit einer Emissionswellenlänge von 809 nm und einer maximalen Laserleistung von 20 W integriert. Das Pumplaserlicht wird über ein 4 Meter langes, mehradriges Glasfaserbündel zum Laserkopf geleitet. Im Laserkopf befindet sich der optische Resonator mit dem optisch aktiven Lasermedium und einem frequenzverdoppler-Kristall.

Als aktives Lasermedium dient ein Neodym-dotierter Ytterbium Vanadat-Kristall (Nd:YVO_4). Aufgrund des sehr hohen Wirkungsquerschnittes für die stimulierte Emission ($> 50\%$) und eines hohen Absorptionskoeffizienten sowie einer großen Absorptionsbandbreite bei Pumpwellenlängen im roten und nahinfraroten Spektralbereich zählt Nd:YVO_4 zu den effizientesten Laser-Kristallen, die derzeit für diodengepumpte Festkörperlaser verfügbar sind.

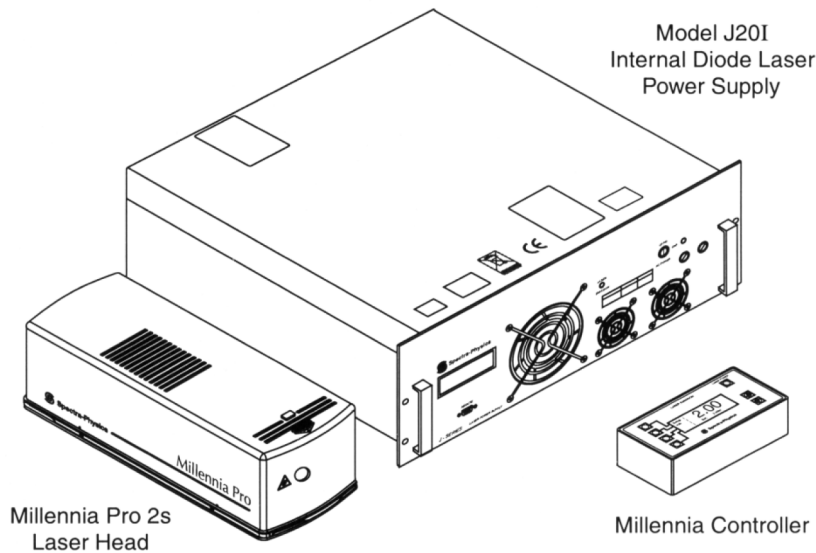


Abbildung 7-1: Millennia Pro 2s Lasersystem.

Bei voller Pumpleistung der Laserdiode (809 nm, 20 W) emittiert der Nd:YVO_4 -Kristall die 1064 nm Laserlinie mit ca. 10 W. Über einen frequenzverdoppler-Kristall aus Lithium Triborat (LBO) wird aus der fundamentalen Emissionswellenlänge die grüne Ausgangslaserwellenlänge von 532 nm erzeugt. Da es sich bei dem Millennia Pro 2s um eine rein luftgekühlte Version des Lasersystems handelt, wurde die maximale Ausgangsleistung auf 2 W CW (Continuous Wave, Dauerstrich) runtergeregelt. Bei Zuschaltung einer optionalen Wasserkühlung kann das Lasersystem auch mit einer Ausgangsleistung von 5 W betrieben werden.

Die Abbildung 7-2 zeigt den optischen Aufbau des Laserresonators im Laserkopf des Millennia Pro 2s. Aufgrund der sich kreuzenden Lichtwege bezeichnet der Hersteller den Laserresonator als „X-cavity resonator“, wodurch eine sehr kompakte Bauform des Laserkopfes erreicht wird. Die Einkopplung des Pump Laserlichts (*Diode Pump Light from FCbar*) in den Nd:YVO_4 -Kristall erfolgt über einen dichroitischen Spiegel.

Dieser spezielle Dichroit zeigt eine sehr hohe Transmission für die Diodenwellenlänge bei 809 nm und gleichzeitig eine sehr hohe Reflektivität für 1064 nm. Insgesamt wird mit Hilfe von fünf Spiegeln ein X-förmiger Laserresonator speziell für die Emissionswellenlänge von 1064 nm aufgebaut. Begrenzt wird der Resonator durch zwei Hochleistungsspiegel (*High Reflector*) mit einer Reflektivität von mehr als 99,99 %.

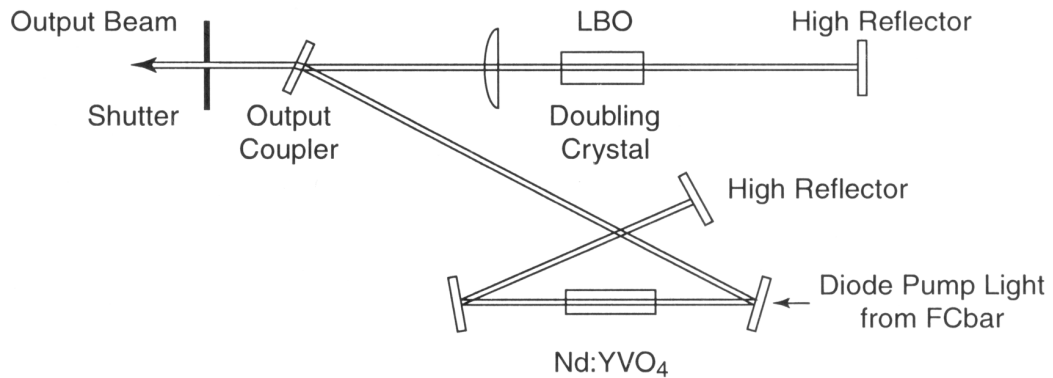


Abbildung 7-2: Optischer Aufbau im Laserkopf des Millennia Pro 2s.

Der frequenzverdoppler-Kristall (*LBO Doubling Crystal*) befindet sich innerhalb des Laserresonators zwischen High Reflector und Auskoppelspiegel (*Output Coupler*). Bei dem Auskoppelspiegel handelt es sich um einen dichroitischen Spiegel, der eine hohe Transmission für 532 nm besitzt und eine hohe Reflexion für 1064 nm. Das innerhalb der Kavität erzeugte grüne Laserlicht kann somit den optischen Resonator als Laserstrahl (*Output Beam*) verlassen, während das Licht bei 1064 nm zurückgehalten wird. Kurz vor Austritt aus dem Laserkopfes wird das Laserlicht durch einen 90° Polarisationsdreher angepasst und zu mehr als 99 % vertikal polarisiert.

Der Millennia Pro 2s ist ein speziell für wissenschaftliche Fragestellungen konzipiertes Lasersystem, das sich neben ausreichender Laserleistung insbesondere durch eine hohe Leistungsstabilität ($\pm 1\%$) und eine sehr hohe Strahlqualität (TEM_{00} , $M^2 < 1,1$) auszeichnet. Der Millennia Pro 2s ist für den Einsatz im Rahmen dieser Arbeit ideal geeignet und stellt die optimale Laserlichtquelle dar.

7.1.2 Der Monochromator

Als Monochromator dient das Modell HoloSpec f/1.8i VPT System™ der Firma Kaiser Optical Systems, Inc. (KOSI) [67]. Das System basiert auf der 1990 erstmals von KOSI eingeführten „Volume Phase Technology“ (VPT™). Dazu wird anstelle eines standardmäßigen Reflexionsgitters ein holographisches Volumen-Transmissions-gitter (Volume Phase Holographic Grating, VPH™) verwendet. Das VPH-Gitter besteht aus einer photosensitiven Gelatine-Schicht, die auf eine

Quarzglasplatte aufgetragen wird. Anschließend wird die Gelatine mit zwei kohärenten Laserstrahlen bearbeitet und ein sich periodisch wiederholendes holographisches Interferenzstreifenmuster eingetragen. Die gewünschte Modulation der Brechungsindexänderung erfolgt durch das Einlegen in einer Serie chemischer Bäder. Zum Schutz der Gelatine-Schicht wird das Gitter mit einer zweiten Quarzglasplatte versiegelt. Die gleiche Technologie wird im Übrigen auch zur Herstellung der von KOSI eingebauten SuperNotchPlus™-Filter angewandt. Die Abbildung 7-3 zeigt den Aufbau des HoloSpec f/1.8 VPT System™ im Detail.



Abbildung 7-3: Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VPT System™, oben: geschlossen, unten: geöffnet.

1: Eingangsapertur, 2: Photoobjektiv 1 (Pentax TV LENS 50 mm, 1:1,4), 3: KOSI SuperNotchPlus™-Filter (532 nm), 4: Photoobjektiv 2 (Pentax TV LENS 50 mm, 1:1,4), 5: Spalt (100 μ m), 6: Photoobjektiv 3 (Nikon AF Nikkor 85 mm, 1:1,8 D), 7: KOSI Holographisches Volumen-Transmissionsgitter (HSG-532-LF), 8: Photoobjektiv 4 (Nikon AF Nikkor 85 mm, 1:1,4 D), 9: Adapterplatte CDD-Detektor, 10: Basisplatte.

Der HoloSpec f/1.8i lässt sich prinzipiell in zwei Sektionen einteilen. Die laufenden Nummern 1 bis 5 beschreiben die Vormonochromator-Einheit, in der das Raman-Streulicht von Laserlinie, Rayleigh-Streuung und Falschlicht bereinigt wird. Dazu wird das durch die Eingangsapertur (1) eintretende Licht von dem ersten Photoobjektiv (2) parallelisiert und dann durch den SuperNotchPlus™-Filter (3) geleitet. Der Filter blockiert die Anregungswellenlänge bei 532 nm mit

einer optischen Dichte von $OD > 6$ – die spektrale Bandbreite beträgt $< 350 \text{ cm}^{-1}$. Das Raman-Streulicht passiert den Notch-Filter und wird von dem zweiten Photoobjektiv (4) auf den $100 \mu\text{m}$ breiten Spalt (5) fokussiert. Im zweiten Segment (lfd. Nr. 6 bis 9) erfolgt dann die spektrale Zerlegung des Raman-Streulichts. Dazu wird der Spalt mittels des dritten Photoobjektivs (6) auf das VPH-Gitter (7) projiziert und nach spektraler Zerlegung über einen Beugungswinkel von 90° vom vierten Photobjektiv (8) auf den CCD-Chip der Detektor-Kamera abgebildet. Bei dem eingebauten Gitter handelt es sich um das Modell HSG-532-LF, mit dem laut Herstellerangaben der gesamte niederfrequente Spektralbereich zwischen -29 und 2388 cm^{-1} erfasst werden kann.

7.1.3 Der Detektor

Zur Detektion des Raman-Streulichts wird die CCD-Kamera Newton DU920P-BV der Firma Andor Technology verwendet (siehe Abbildung 7-4) [68]. Der Silizium-Chip besitzt 1024×255 aktive Pixel mit einer Pixelgröße von jeweils $26 \times 26 \mu\text{m}$. Der Detektor erreicht im sichtbaren Spektralbereich bei 550 nm eine Quanteneffizienz $> 95 \%$.



Abbildung 7-4: Andor Technology CCD-Kamera Newton DU920P-BV.

Zur Unterdrückung des thermischen Rauschens lässt sich der CCD-Chip mit drei eingebauten Peltierelementen auf $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ kühlen. Bei Bedarf kann durch Zuschaltung einer Wasserkühlung auch auf $-100 \text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt werden.

7.1.4 Aufbau des Raman-Mikroskop-Spektrometers

Nach Beschreibung der drei Basiskomponenten befasst sich dieses Kapitel mit dem Lichtweg im modular aufgebauten Raman-Mikroskop-Spektrometer, sowie mit der Erklärung weiterer optischer Komponenten. Ein Foto des Spektrometer-Aufbaus in der Schrägansicht zeigt die Abbildung 7-5. Die optische Wegführung des Laseranregungslichtes und des Raman-Streulichtes lässt sich anhand der grün und rot gestrichelten Linien verfolgen.

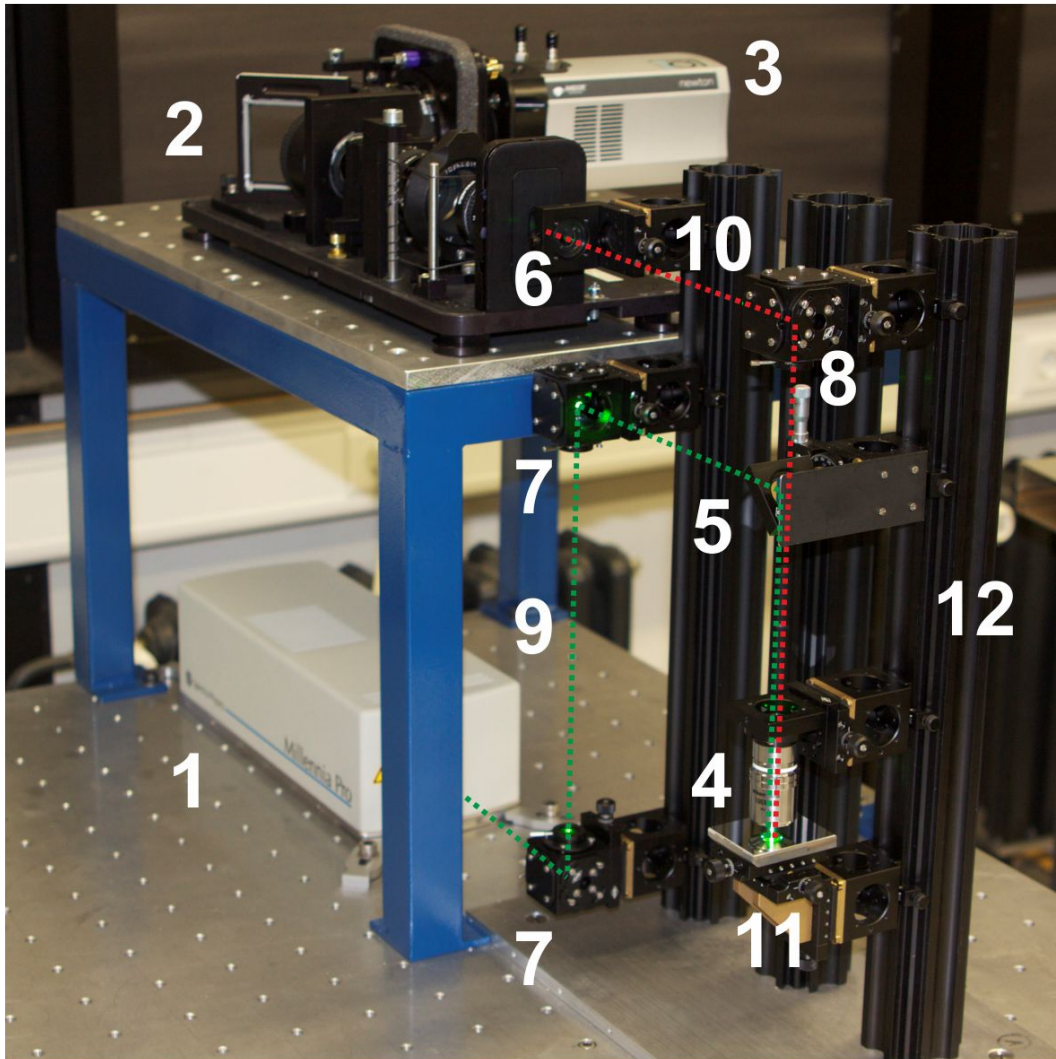


Abbildung 7-5: Schrägansicht des modular aufgebauten Raman-Mikroskop-Spektrometers.

1: Diodengepumpter Festkörperlaser (532 nm, 2 Watt), 2: Volumentransmissionsgitter-Monochromator (hier offen dargestellt), 3: Tieftemperatur CCD-Detektor, 4: Mikroskopobjektiv 5: Dichroitischer Strahlteiler, 6: Achromatische Linse (f=35mm), 7: Laser-Umlenkspiegel, 8: VIS-Umlenkspiegel, 9: Lichtweg Anregungslaser (grün), 10: Lichtweg Raman-Streulicht (rot), 11: Probenisch, 12: Strahlführungssystem

Um das Raman-Mikroskop-Spektrometer weitgehend flexibel zu gestalten, wurde das optische Strahlführungssystem SYS 40 der Firma OWIS aus Aluminium verwendet. An drei senkrecht stehenden Profilrohren mit Schwalbenschwanzführungen können Reiter bewegt und arretiert werden. Die optischen

Komponenten werden zusammen mit Mikropositionierelementen an die Reiter adaptiert und können somit leicht an beliebige Positionen geführt und präzise zueinander ausgerichtet werden.

Die Abbildung 7-6 zeigt eine schematische Darstellung des Spektrometer-Aufbaus. Das Laserlicht (grün dargestellt) wird mittels zweier Laserspiegel auf einen Strahlteiler justiert. Bei den Laserspiegeln handelt es sich um dielektrische Interferenzspiegel der Firma Qioptiq Photonics (Modell: Laser Mirror DLHS532).

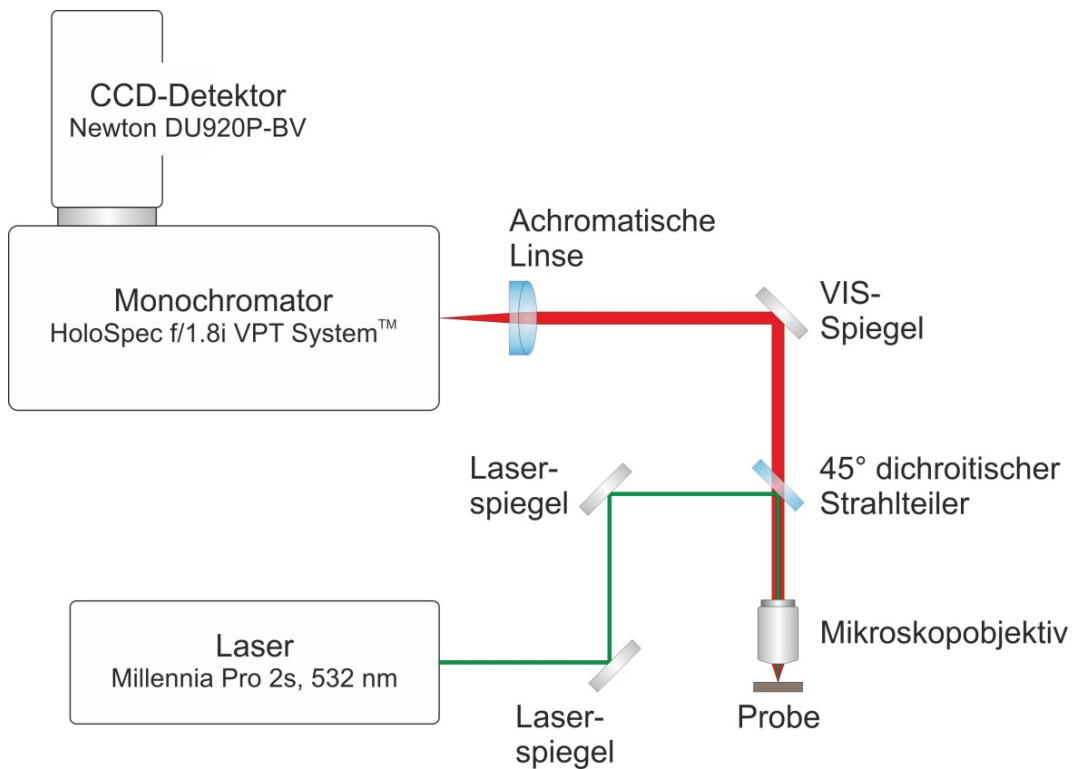


Abbildung 7-6: Schematische Darstellung des modular aufgebauten Raman-Mikroskop-Spektrometers.

Die Umlenkspiegel zeigen bei 0° und speziell bei 45° Einfallswinkel eine sehr hohe Reflektivität für 532 nm von mehr als 99,8 % (siehe Anhang, Kapitel 11.2, Tabelle 11-2, Abbildung 11-9). Für eine präzise Positionierung und Winkeleinstellung des Laserstrahls wurden die Laserspiegel auf passende Justier Vorrichtungen von Qioptiq Photonics (Modell: Adjustable mirror insert 30) platziert. Die Einstellung erfolgt mittels Feingewindeschrauben über drei Achsen.

Der dichroitische Strahlteiler der Firma Semrock / IDEX Corporation (Modell: LPD01-532RU-25) reflektiert unter einem Einfallswinkel von 45° das vertikal polarisierte Laserlicht mit mehr als 98 % in Richtung Mikroskopobjektiv. Von diesem wird das Laserlicht auf die Probe fokussiert.

Der Aufbau eines Raman-Mikroskop-Spektrometers unter Verwendung eines Mikroskopobjektives lohnt sich in zweierlei Hinsicht. Zum einen wird eine extrem hohe Photonendichte im Fokus des Laserlichtes erzeugt, die sich proportional

verstärkend auf die Intensität des Raman-Effektes auswirkt. Zum anderen lässt sich mit einem Mikroskopobjektiv mit hoher numerischer Apertur ein großer Ausschnitt des nach allen Seiten emittierten Streulichts erfassen. Dadurch kann ein relativ hoher Anteil des im Fokus erzeugten Raman-Streulichtes für die spektrale Analyse genutzt werden.

Die soeben genannten Vorteile wirken sich direkt auf die Empfindlichkeit des Raman-Spektrometers aus. Einen weiteren Vorteil stellt die hohe Ortsauflösung dar, die durch den Raman-Mikroskop-Aufbau erzielt wird. Dazu kann die Probe mit einem manuell justierbaren XYZ-Probentisch (OWIS SYS 40, Miniaturverschiebetische MVT 40B-Z, drei Stück) mit einer Einstellempfindlichkeit von 1 μm durch den Laserfokus gefahren werden.

Bei dem verwendeten Objektiv handelt es sich um ein Nikon CF IC EPI Plan SLWD (SLWD: Super Long Working Distance) mit einer 100-fach Vergrößerung (siehe Anhang, Kapitel 11.2, Tabelle 11-2, Abbildung 11-4). Das gegen unendlich korrigierte Hochleistungsobjektiv verfügt mit einer numerischen Apertur von 0,73 (objektseitiger Gesamtöffnungswinkel = $93,77^\circ$) über einen verhältnismäßig großen Arbeitsabstand von 4,7 mm.

Das im Fokus erzeugte Raman-Streulicht (rot dargestellt) wird von dem Mikroskopobjektiv erfasst und als Parallelstrahl zurück zum dichroitischen Strahlteiler geleitet. Für das zum Laserlicht frequenzverschobene Raman-Streulicht ist der dichroitische Strahlteiler über einen Wellenlängenbereich zwischen 538,9 und 824,8 nm mit einer Transmission größer 93 % spezifiziert. Die entsprechenden Spezifikationen und eine Transmissionskurve sind im Anhang, Kapitel 11.2, Tabelle 11-2 in der Abbildung 11-6 hinterlegt.

Nach Passieren des Strahlteilers wird das Raman-Streulicht über einen VIS-Spiegel in Richtung Monochromator reflektiert und mit einer achromatischen Linse in die Eingangsöffnung fokussiert. Bei dem VIS-Spiegel handelt es sich um einen silberbeschichteten Breitbandspiegel der Firma Qioptiq Photonics. Die Silber-Vorderflächenreflexionsschicht (RAGV coating) garantiert vom sichtbaren bis in den infraroten Spektralbereich zwischen 500 nm und 12 μm eine Reflektivität von mindestens 96 % (siehe Anhang, Kapitel 11.2, Tabelle 11-2, Abbildung 11-10, „HR range“). Die typischen Reflexionswerte werden in der Abbildung 11-10 laut Hersteller besser durch den schwarzen Kurvenverlauf dargestellt. Demnach kann für den in dieser Arbeit genutzten Spektralbereich des Raman-Streulichtes zwischen 532 und 610 nm (das entspricht 2400 cm^{-1} relativ zur Anregungswellenlänge), eine Reflektivität zwischen 97,5 und 98 % erreicht werden. Wie die beiden Laserspiegel sitzt auch der VIS-Spiegel auf der Justiervorrichtung „Adjustable mirror insert 30“ von Qioptiq Photonics. In

Kombination mit dem Strahlführungssystem von OWIS lässt sich das Raman-Streulicht genau axial zum Monochromator ausrichten.

Die Einkopplung des Raman-Streulichtes in den Monochromator erfolgt über ein achromatisches Linsensystem der Firma Edmund Optics. Durch die Verklebung von zwei computeroptimierten optischen Komponenten zum Zweilinser wird eine hinreichende Korrektur der sphärischen und chromatischen Aberration erreicht. Der Achromat besitzt eine beidseitige Antireflexbeschichtung für den sichtbaren Spektralbereich. Laut Herstellerangabe beträgt zwischen 425 und 675 nm und bei einem Einfallswinkel von 0° die Reflexion an jeder Oberfläche weniger als 0,4 %. Die entsprechende Reflexionskurve und sonstige technische Spezifikationen sind im Anhang hinterlegt (Kapitel 11.2, Tabelle 11-2, Abbildung 11-7 und Abbildung 11-8).

Im Monochromator wird das Raman-Streulicht spektral zerlegt und anschließend auf dem CCD-Chip der Detektor-Kamera abgebildet. Die Datenerfassung erfolgt mit Hilfe der Spektroskopie-Software „Andor SOLIS“, Version 4.19.30001.7.

7.2 Erstellung einer Referenz-Raman-Spektrendatenbank

Wie bereits in Kapitel 5.1 diskutiert, liegt eine der primären Herausforderungen in der Raman-spektroskopischen Detektion geringer Substanzkonzentrationen in der wässrigen mobilen Phase der Hochtemperatur-HPLC. Wird in der geplanten Kopplung die Erfassungsgrenze des Raman-Detektors ausgereizt, kann eine Identifikation der Analytsubstanzen unter Umständen nur anhand einiger stark ausgeprägter Schlüsselbanden erfolgen. Um dann die eindeutige Zuordnung der Raman-Signale vornehmen zu können, wird im Vorfeld eine Referenz-Raman-Spektrendatenbank aller projektrelevanten Substanzen erstellt. Dazu wurden die nach Kapitel 6 ausgewählten Analyten mit dem Raman-Mikroskop-Spektrometer (siehe Kapitel 7.1) vermessen.

Die Raman-Spektren sind dem Anhang unter Kapitel 11.4 beigelegt. Zehn der insgesamt zwanzig Substanzen zeigten bei der Anregungswellenlänge von 532 nm eine Untergrundemission, die allerdings meist so schwach war, dass die Raman-Messungen nicht beeinträchtigt wurden. Probleme gab es lediglich in der Substanzklasse der Lebensmittelzusatzstoffe. Bei den Proben Rutin, Catechin und Theobromin wurde eine sehr ausgeprägte Fluoreszenzemission beobachtet, durch die die Raman-Signale teilweise überlagert wurden. Während Rutin eine native Fluoreszenz zeigt, resultiert diese bei Catechin und Theobromin aus Verunreinigungen der Proben. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei genannten Proben um extrahierte Naturstoffe handelt, deren Reinheit zwischen 97 und 99 % lag.

7.2.1 Zuordnung von Schlüsselbanden am Beispiel von Testosteron, Epitestosteron und Prasteron

Mit Hilfe der Raman-Spektroskopie lassen sich Substanzen mit unterschiedlicher Molekülstruktur und funktionellen Gruppen sehr leicht unterscheiden. So zeigt die erstellte Referenz-Raman-Spektrendatenbank deutlich, dass zwischen den drei Substanzklassen sehr starke Veränderungen der Raman-Signale in Lage und Intensität auftreten. Innerhalb der Substanzklassen sind die Unterschiede in einigen Spektren nicht immer auf den ersten Blick ersichtlich. Während Konstitutionsisomere mit identischer Summen- und Strukturformel aber unterschiedlicher Lage der funktionellen Gruppen noch recht gut zu unterscheiden sind, führt die Vermessung von Stereoisomeren zu stark ähnelnden Raman-Spektren. Oft erlaubt die Raman-Spektroskopie bei genauer Betrachtung der Spektren sogar hier eine Identifikation von Isomerenpaaren.

Dazu soll exemplarisch am Beispiel von Testosteron, Epitestosteron und Prasteron gezeigt werden, wie eine entsprechende Zuordnung von Schlüsselbanden die Unterscheidung der Substanzen ermöglicht. Die Zuordnung erfolgt nach *B. Schrader* und *E. Steigner*, die die Charakterisierung wichtiger Schlüsselbanden anhand der Raman-spektroskopischen Vermessung von 80 Steroiden bereits 1970 publiziert haben [69, 70].

In der Abbildung 7-7 ist das Referenz-Raman-Spektrum von Testosteron dargestellt, das sich in mehrere farblich markierte Frequenzbereiche unterteilen lässt. Zwischen 200 und 1350 cm^{-1} befindet sich der sogenannte „Fingerprint“-Bereich, hier gelb hinterlegt. Diese Raman-Übergänge resultieren vornehmlich aus den Gerüstschwingungen sowie der Lage der Substituenten. In ihrer Gesamtheit betrachtet und unter Berücksichtigung von Lage und relativer Intensität können die Banden als „Fingerabdruck“ eines Moleküls betrachtet werden. Im Vergleich mit Referenzspektren lässt dieser Frequenzbereich eine eindeutige Identifikation einer Substanz zu.

Zwischen 1330 und 1470 cm^{-1} befinden sich die grün markierten CH_2 - und CH_3 -Deformationsschwingungen. Die stärkste Bande zwischen 1440 und 1460 cm^{-1} wird von *Schrader* und *Steigner* als Bezugslinie für die Ermittlung der Intensität der Raman-Übergänge im Steroid-Spektrum genutzt und als „Bande bei 1450 cm^{-1} “ bezeichnet. Im Spektrum rot und blau hinterlegt finden sich die Schwingungen der Doppelbindung bei 1614 cm^{-1} und die der Keto-Gruppe bei 1657 cm^{-1} wieder. Die CH- und OH-Valenzschwingungen befinden sich zwischen 2800 und 3650 cm^{-1} und damit außerhalb des aufgenommenen Frequenzbereichs.

Zur weiteren Auswertung wird zunächst überprüft, ob die „Bande bei 1450 cm^{-1} “ die stärkste Bande im Spektrum darstellt. Dies kann im Falle des Testosterons verneint werden, da sich sowohl links- als auch rechtsseitig von 1450 cm^{-1} intensivere Raman-Übergänge befinden. Dabei sind die Banden bei 1614 und 1657 cm^{-1} bis zu zehnmal stärker ausgeprägt als die „Bande bei 1450 cm^{-1} “ und es liegen zudem normale bis starke Übergänge bei 951 , 1234 , 1284 cm^{-1} und zwischen 1330 und 1360 cm^{-1} vor. Diese Konstellation lässt laut *Schrader* und *Steigner* auf die konjugierte Δ^4 -3-Keto-Verbindung⁶ im A-Ring des Testosterons schließen.

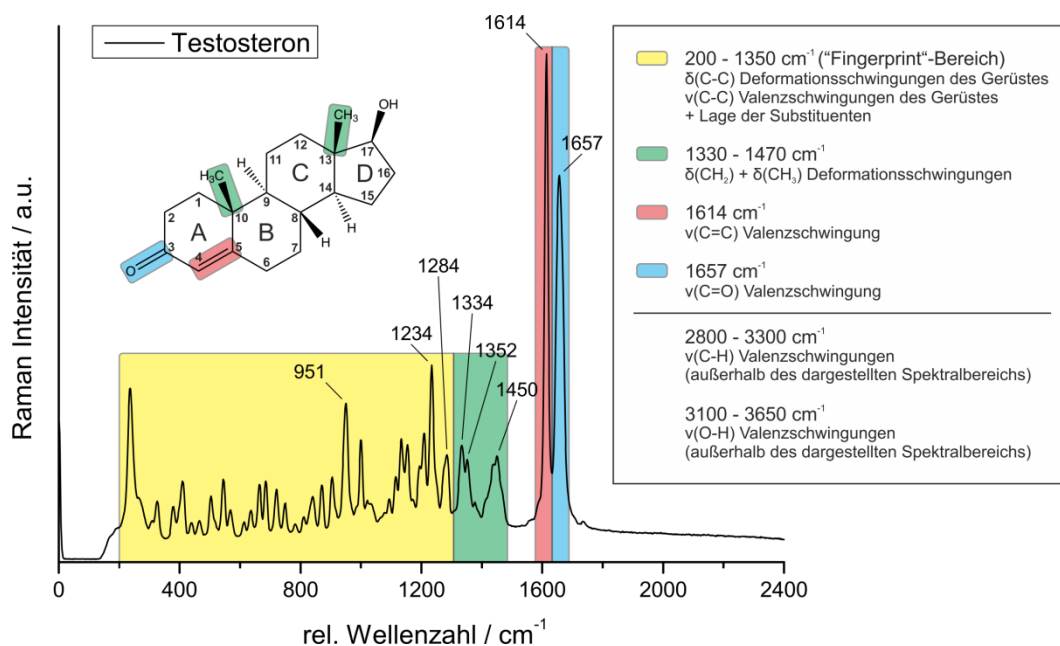


Abbildung 7-7: Referenz-Raman-Spektrum von Testosteron und Zuordnung von Schlüsselbanden.

Im Vergleich zu Testosteron zeigt die Abbildung 7-8 das Referenz-Raman-Spektrum von Prasteron mit den entsprechend farblich markierten Bereichen und funktionellen Gruppen. Prasteron und Testosteron sind Stellungsisomere, bei denen die Keto- und Hydroxygruppe in Ihren Positionen vertauscht vorliegen. Zudem sitzt die Doppelbindung des Prasterons zwischen dem fünften und sechsten C-Atom des B-Ringes und liegt im Gegensatz zu Testosteron isoliert vor.

⁶ Mit Δ werden ungesättigte Bindungen deklariert – die Bezeichnung „ Δ^4 -3-Keto-“, bezieht sich auf den blau und rot hinterlegten Strukturbereich und benennt die Keto-Gruppe am dritten sowie die Doppelbindung am vierten C-Atom, die in Konjugation zueinander stehen. Seit 1989 wird die Verwendung der Δ -Nomenklatur laut IUPAC nicht mehr empfohlen [71] IUPAC, Moss G.P., NOMENCLATURE OF STEROIDS (Recommendations 1989), Pure & Appl. Chem., 61 (1989) 1783-1822.

Die „Bande bei 1450 cm^{-1} “ zeigt im Prasteron-Spektrum die stärkste Intensität. Nach *Schrader* und *Steigner* lassen die Banden bei 1672 und 1734 cm^{-1} , sowie das Vorhandensein der beiden mittelstarken bis starken Banden bei 588 und 693 cm^{-1} die Schlussfolgerung zu, dass es sich nur um ein Steroid mit isolierter Doppelbindung **und** isolierter Keto-Gruppe handeln kann. Die Lage der Bande bei 1734 cm^{-1} erlaubt zudem die Lokalisierung der Keto-Gruppe am siebzehnten C-Atom des D-Fünfrings. Über die Lage der isolierten Doppelbindung lassen sich allerdings anhand des Raman-Spektrums alleine keine Aussagen treffen.

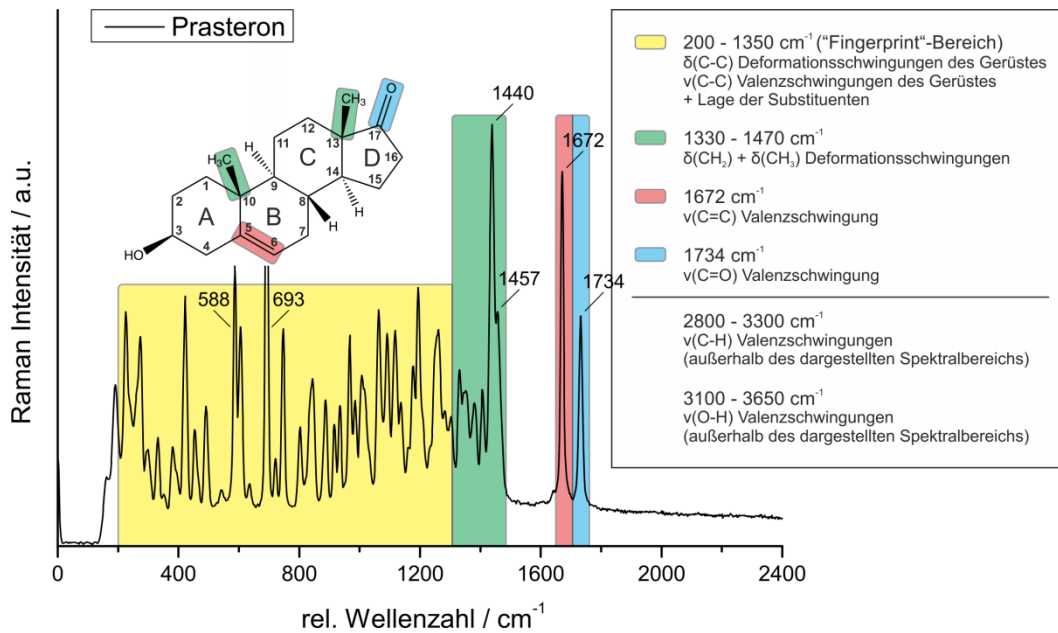


Abbildung 7-8: Referenz-Raman-Spektrum von Prasteron und Zuordnung von Schlüsselbanden.

Wie gezeigt, lassen sich Testosteron und Prasteron mit Hilfe der Raman-Spektroskopie relativ leicht unterscheiden. Die Abbildung 7-9 zeigt das Referenz-Raman-Spektrum von Epitestosteron. Im Falle der beiden Diastereo-isomeren Epitestosteron und Testosteron gestaltet sich die Unterscheidung anhand der recht ähnlichen Spektren durchaus schwieriger. Der einzige Unterschied in der Struktur der Moleküle liegt in der räumlichen Stellung der Hydroxygruppe am siebzehnten C-Atom des D-Fünfrings (Epitestosteron: **17 α -Hydroxy**androst-4-en-3-on; Testosteron: **17 β -Hydroxy**androst-4-en-3-on).

Wie auch schon beim Testosteron führt die Charakterisierung der Raman-Banden nach *Schrader* und *Steigner* zu einem Steroid mit konjugierter Δ^4 -3-Keto-Verbindung im A-Ring. Die äußerst schwachen Verschiebungen in den Raman-Frequenzen der funktionellen Gruppen lassen keine eindeutige Identifizierung bzw. Unterscheidung zwischen Epitestosteron und Testosteron zu.

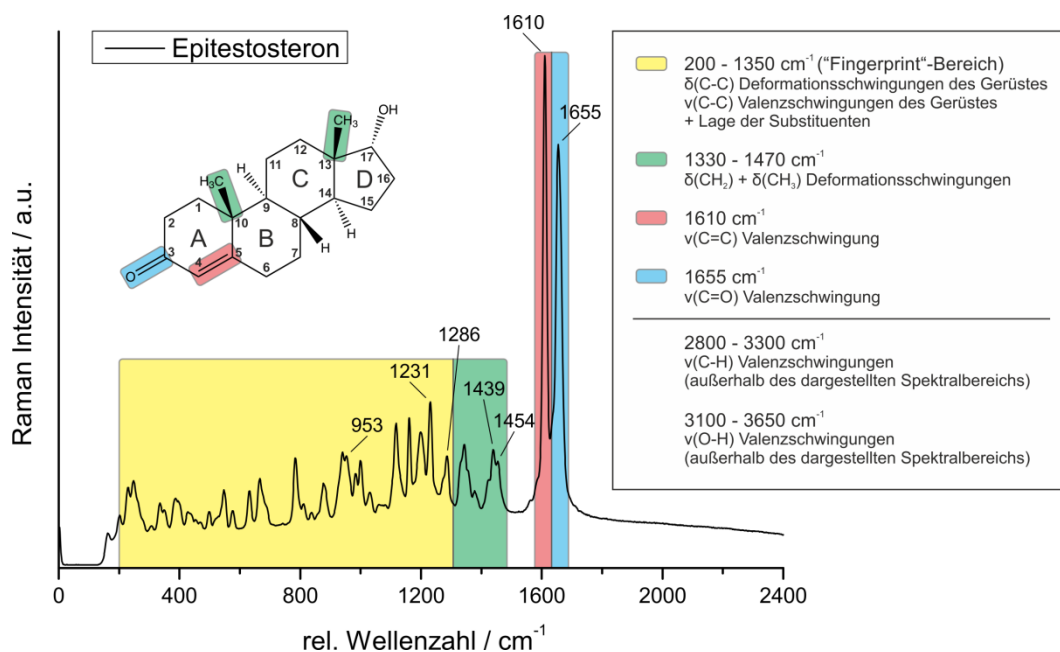


Abbildung 7-9: Referenz-Raman-Spektrum von Epitestosteron und Zuordnung von Schlüsselbanden.

Die eindeutige Zuordnung von Schlüsselbanden kann an dieser Stelle nur anhand des „Fingerprint“-Bereiches erfolgen. Zur besseren Darstellung wurden die Raman-Spektren von Epitestosteron und Testosteron zunächst Basislinien-korrigiert und anschließend übereinandergelegt. Die Abbildung 7-10 zeigt einen Ausschnitt der beiden Spektren zwischen 600 und 900 cm⁻¹.

Ein signifikanter Frequenzbereich findet sich zwischen 700 und 800 cm⁻¹. Testosteron (roter Kurvenverlauf) zeigt bei 720 und 750 cm⁻¹ zwei mittelstark ausgeprägte Raman-Übergänge. Bei Epitestosteron (schwarzer Kurvenverlauf) hingegen liegt zwischen 700 und 760 cm⁻¹ eine Lücke vor. Umgekehrt besitzt Epitestosteron eine starke Bande bei 784 cm⁻¹, während Testosteron bei 783 cm⁻¹ nur einen sehr schwach ausgeprägten Raman-Übergang aufweist.

Das Beispiel Epitestosteron / Testosteron zeigt eindrucksvoll, dass die Änderung der räumlichen Stellung einer einzelnen funktionellen Gruppe Einfluss auf die Gerüstschwingungen der gesamten Molekülstruktur nimmt. Charakteristische Veränderungen in den Schwingungsfrequenzen zeigen sich daher vornehmlich im „Fingerprint“-Bereich des Raman-Spektrums.

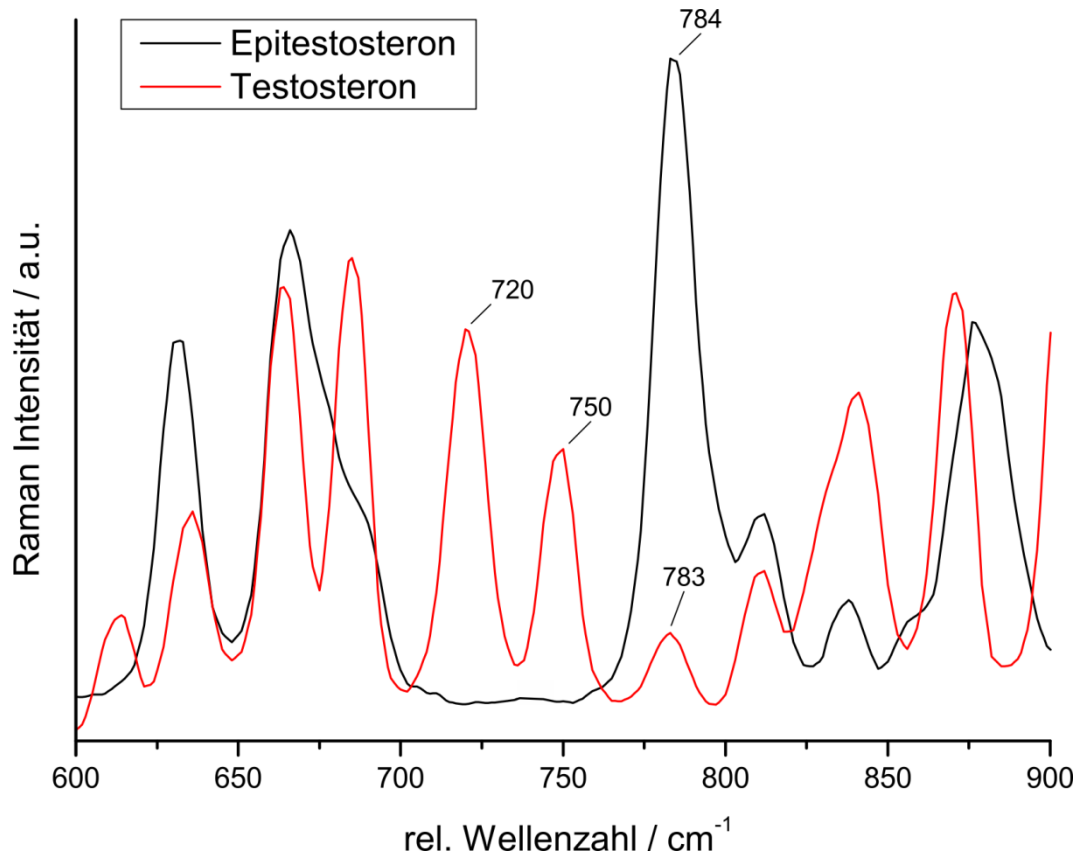


Abbildung 7-10: Referenz-Raman-Spektren von Epitestosteron und Testosteron (600 bis 900 cm⁻¹).

Somit stellt die Raman-Spektroskopie für diese Substanzklasse eine äußerst effektive Methode zur Strukturaufklärung dar, die in der Lage ist, selbst stark ähnelnde Strukturisomere zu unterscheiden. Anhand der erstellten Referenz-Raman-Spektrendatenbank kann in der späteren Kopplung mit der Flüssigchromatographie eine schnelle und eindeutige Identifikation der aufgetrennten Substanzen erfolgen.

7.3 Entwicklung des Raman-Detektors für die Flüssigchromatographie

Wie bereits in Kapitel 5 diskutiert, unterliegt die experimentelle Umsetzung des Raman-Detektors einigen Rahmenbedingungen, die für eine problemlose Integration zwischen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Isotopenverhältnis-Massenspektrometer beachtet werden müssen. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben, wurden bei der Entwicklung der Durchflusszelle zwei unterschiedliche Konzepte verfolgt. Zunächst wurde getestet, inwieweit sich die Raman-Mikroskopie zur Online-Vermessung der mobilen Phase eignet. Alternativ dazu wurde ein experimenteller Aufbau unter Verwendung eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters realisiert.

7.3.1 Experimenteller Ansatz unter Einsatz der Raman-Mikroskopie

Wie schon in Kapitel 7.1.4 erwähnt, bietet die Raman-Mikroskopie den Vorteil einer hohen Ortsauflösung, da das Laserlicht fokussiert und damit ein Großteil des Raman-Streulichts in einem kleinen Volumen (unterer μm^3 -Bereich) erzeugt wird. Die Raman-Mikroskopie eignet sich demnach sehr gut, um innerhalb typischer HPLC-Kapillar-Innendurchmesser (100 bis 200 μm) zu messen. Voraussetzung dafür ist im Prinzip lediglich die Verwendung einer mit optischem Fenster ausgestatteten Kapillare, die zwischen HT-HPLC und IRMS integriert werden kann. Entsprechende Kapillaren sind z. B. von der Firma Molex / Polymicro Technologies erhältlich und werden üblicherweise im Rahmen der Kapillarelektrophorese für UV-Absorptions- oder Fluoreszenzmessungen eingesetzt [72]. Die Kapillaren bestehen aus Quarzglas (Fused Silica Capillary Tubing), besitzen extrem glatte, säuregeätzte Innenwände und zeigen eine ausreichend hohe Druckstabilität für flüssigchromatographische Anwendungen. Verfügbare Innendurchmesser zwischen 50 und 250 μm ermöglichen eine problemlose Integration zwischen die hier verwendete HT-HPLC/irMS-Kopplung. Zur Raman-spektroskopischen Vermessung der mobilen Phase, bzw. der aufgetrennten Einzelsubstanzen, kann die Kapillare direkt auf den XYZ-Probentisch des Raman-Mikroskop-Spektrometers befestigt werden. Anschließend wird das Zentrum der Kapillare in den Laserfokus justiert.

Dieser experimentelle Ansatz wurde im Vorfeld durch eine recht einfach gehaltene Machbarkeitsanalyse geprüft. Dazu wurde das modular aufgebaute Raman-Mikroskop-Spektrometer hinsichtlich seiner Messempfindlichkeit bei verdünnten wässrigen Proben getestet. Als Testsubstanz wurde Coffein verwendet, da für diese Substanz bereits eine Abschätzung der zu erreichenden Peak-Konzentrationen nach chromatographischer Trennung vorgenommen wurde (siehe Kapitel 5.1).

Die Konzentration der Stammlösung wurde mit 1 g L^{-1} angesetzt. Davon ausgehend wurde die Konzentration schrittweise in einer 1:1-Verdünnung solange halbiert, bis die Detektionsgrenze für das Raman-Mikroskop-Spektrometer erreicht wurde. Die Raman-spektroskopische Vermessung der verdünnten Coffein-Lösungen erfolgte in einer Quarzglasküvette, die mittels Probentisch in den Laserfokus justiert wurde. Zur Ermittlung der maximalen Messempfindlichkeit des Raman-Mikroskop-Spektrometers wurde die maximale Laserleistung von 2 Watt eingestellt. Die verfügbare Messzeit wird, wie bereits in Kapitel 5.2 diskutiert, durch die Peak-Breiten der HT-HPLC begrenzt und wurde dementsprechend auf 10 Sekunden festgelegt. Die Abbildung 7-11 zeigt die gemessenen Raman-Spektren der Coffein-Lösungen mit Konzentrationen von 500, 250 und 125 mg L^{-1} .

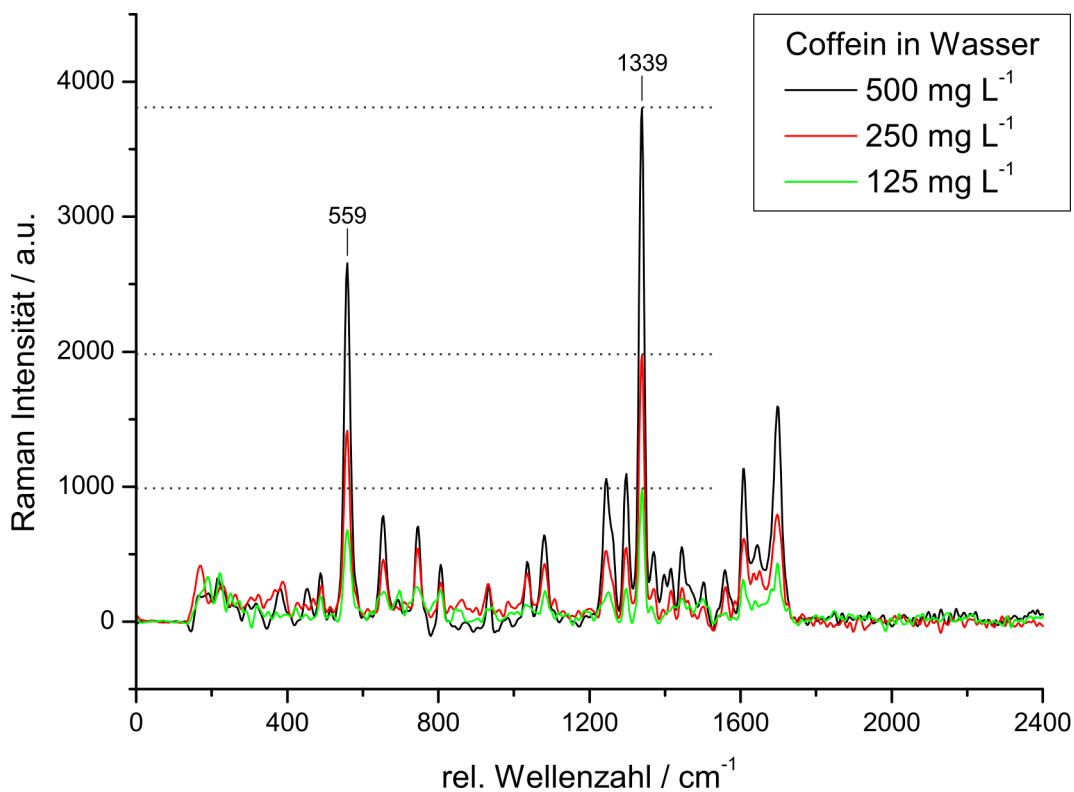


Abbildung 7-11: Raman-Spektren von Coffein in Wasser mittels Raman-Mikroskop-Spektrometer in einer Quarzglasküvette. Konzentrationsansätze: 500 , 250 und 125 mg L^{-1} ; Laserausgangsleistung: 2 W ; Messzeit: 10 s ; Differenzspektrum gegen Wasser; basislinienkorrigiert; 5 Punkte FFT-Filter geglättet.

Die stark ausgeprägten Raman-Signale des Coffeins bei 559 und 1339 cm^{-1} sind im Spektrum markiert und können bei weiterer Verdünnung gut verfolgt werden. Die Konzentrationsabhängigkeit der Bandeintensität bei 1339 cm^{-1} wird durch die horizontal gestrichelten Linien verdeutlicht. Die Konzentrationsreihe zeigt sehr schön die lineare Beziehung zwischen Konzentration und Raman-Intensität. Bis zu einer Konzentration von 125 mg L^{-1} ($6,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) sind fast alle Raman-Übergänge des Coffeins messbar.

In Abbildung 7-12 ist das Raman-Spektrum von Coffein in Wasser bei einer Konzentration von $62,5 \text{ mg L}^{-1}$ dargestellt. Hier können bei entsprechender Datenaufbereitung (Differenzspektrum gegen Wasser, Basislinienkorrektur und 5 Punkte FFT-Filter Glättung mittels Origin Pro 8.5G) nur die starken Schlüsselbanden bei 559 und 1339 cm^{-1} mit einem Signal-/Rauschverhältnis von 5:1 gut herausgearbeitet werden. Mittelstark ausgeprägte Raman-Übergänge, z. B. bei 1700 cm^{-1} , liegen mit einem S/N-Verhältnis von 2:1 an der Detektionsgrenze des hier verwendeten Raman-Mikroskop-Spektrometers. Eine weitere Verdünnung der Coffein-Lösung auf $31,25 \text{ mg L}^{-1}$ konnte nicht mehr erfasst werden.

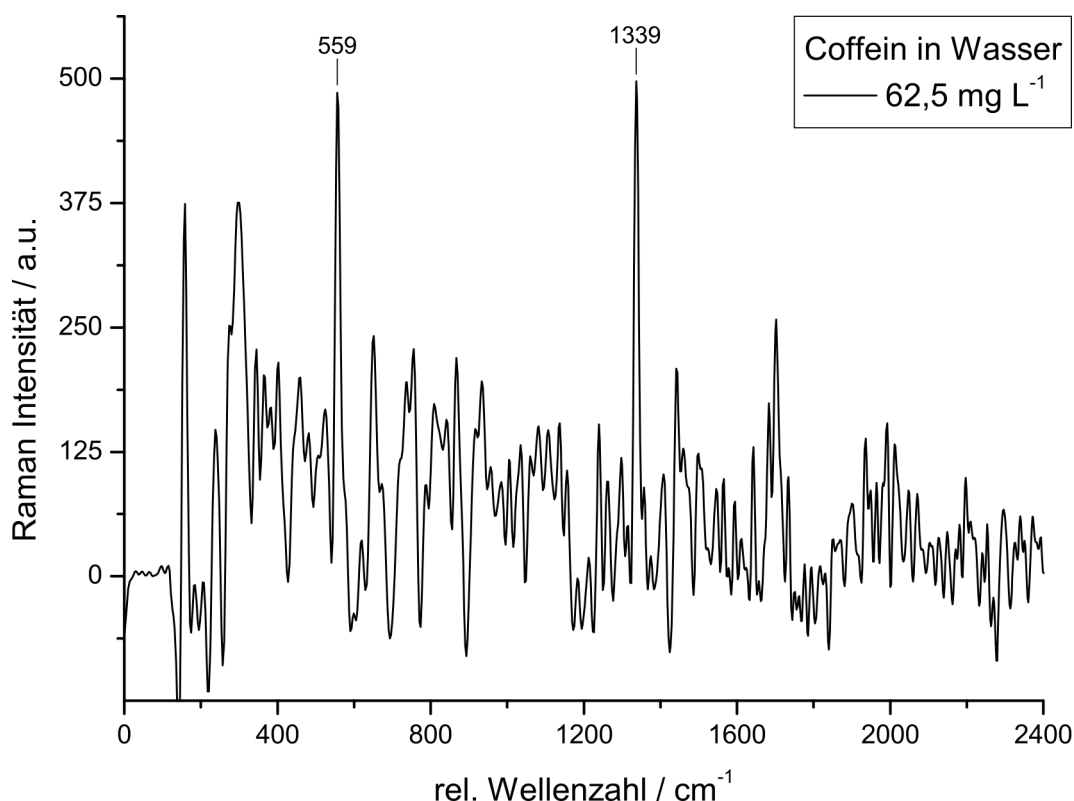


Abbildung 7-12: Raman-Spektrum von Coffein in Wasser mittels Raman-Mikroskop-Spektrometer in einer Quarzglasküvette. Konzentrationsansatz: $62,5 \text{ mg L}^{-1}$; Laserausgangsleistung: 2 W; Messzeit: 10 s; Differenzspektrum gegen Wasser; basislinienkorrigiert; 5 Punkte FFT-Filter geglättet.

Bei einer Laserausgangsleistung von 2 Watt und einer Messzeit von 10 Sekunden wurde für das Raman-Mikroskop-Spektrometer eine Nachweisgrenze von ca. 50 mg L^{-1} (für Coffein) festgelegt. Verglichen mit der Zielnachweisgrenze von 1 mg L^{-1} (Peak-Konzentration nach chromatographischer Trennung, siehe Kapitel 5.1) ist das Raman-Mikroskop-Spektrometer mindestens um den Faktor 50 zu unempfindlich. Der Einsatz einer Durchflusszelle mit optischem Fenster in Kombination mit der Raman-Mikroskopie ist daher für das geplante Kopplungsverfahren nicht geeignet.

7.3.2 Experimenteller Ansatz unter Einsatz eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters

Als Alternative zur Raman-Mikroskopie wurde ein experimenteller Ansatz auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters gewählt und durch Multireflexion eine allgemeine Verstärkung der Quanteneffizienz erreicht. Bei entsprechender Adaption kann der Flüssigkern-Lichtwellenleiter in Form einer Kapillare als Raman-Durchflusszelle konzipiert werden. Dabei werden sowohl das Laserlicht als auch das Raman-Streulicht längsseitig über die Stirnflächen der Kapillare ein- bzw. ausgekoppelt. Voraussetzung für den optimalen Lichttransport ist die Totalreflexion an der Innenwand der Kapillare. Dazu muss das Kapillarmaterial einen niedrigeren Brechungsindex besitzen als sein flüssiger Kern, der im Falle der Kopplung mit der wässrigen mobilen Phase der HT-HPLC bei $n_D = 1,33$ liegt. Die folgenden Kapitel beschreiben die Funktionsweise des Flüssigkern-Lichtwellenleiters sowie den experimentellen Aufbau einer auf Totalreflexion basierenden Raman-Durchflusszelle im Detail.

7.3.2.1 DuPont™ Teflon® AF

Ein für den Einsatz als Flüssigkern-Lichtwellenleiter geeignetes Material wird von der Firma DuPont™ produziert und ist unter dem Handelsnamen Teflon® AF erhältlich [47-49]. Das Copolymer aus 2,2-bistrifluormethyl-4,5-difluor-1,3-dioxol (PDD) und Tetrafluorethylen (TFE) besitzt eine völlig amorphe Struktur und zeigt einige besondere optische Eigenschaften, wie z. B. eine hohe Transparenz vom ultravioletten ($T_{300\text{nm}} \geq 90\%$, $d = 220\ \mu\text{m}$) bis in den nahinfraroten Spektralbereich ($T_{400-2000\text{nm}} \geq 95\%$, $d = 220\ \mu\text{m}$). Zurzeit bietet DuPont™ zwei Sorten Teflon® AF an, die sich im Mischungsverhältnis der Monomereinheiten PDD und TFE unterscheiden.

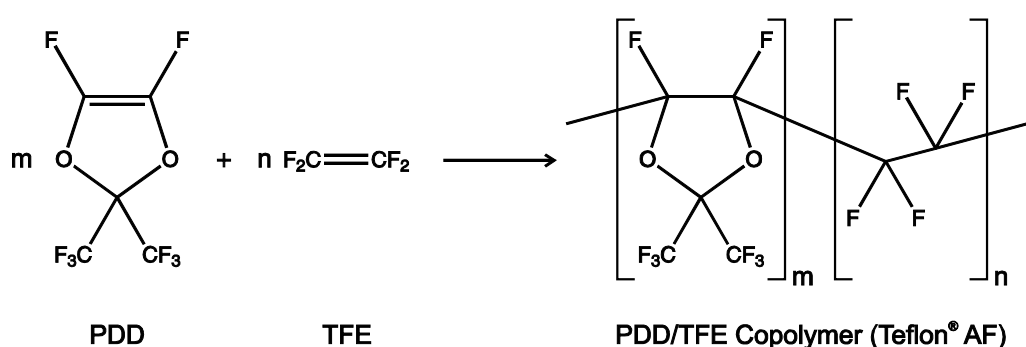


Abbildung 7-13: Copolymerisation von PDD und TFE zu Teflon® AF.

Teflon® AF 1600 wird mit einem PDD-Anteil im Copolymer von 65 mol% hergestellt und zeigt einen Brechungsindex bei $n_D = 1,31$. In Teflon® AF 2400 liegt der PDD-Anteil mit 87 mol% deutlich höher. Laut DuPont™ besitzt Teflon® AF 2400 mit $n_D = 1,29$ den derzeit niedrigsten Brechungsindex für ein organisches Feststoffpolymer.

Die Kombination aus optischer Transparenz und niedrigem Brechungsindex prädestiniert Teflon® AF für die Anwendung als Flüssigkern-Lichtwellenleiter. Eine weiterführende Beschreibung dieses Materials befindet sich im Anhang unter Kapitel 11.3.

7.3.2.2 Kapillaren aus Teflon® AF

Während DuPont™ sein Produkt nur als Granulat oder in Fluorkohlenwasserstoffen gelöst anbietet, gibt es weltweit nur zwei Unternehmen, die sich auf die Weiterverarbeitung von Teflon® AF zu Kapillaren spezialisiert haben (Stand: August 2013). Dabei handelt es sich um die Firmen Random Technologies LLC, San Francisco (USA) und Biogeneral, Inc., San Diego (USA). Im Rahmen dieser Arbeit wurden von beiden Unternehmen Kapillaren aus Teflon® AF 2400 bezogen. Hinsichtlich einer problemlosen Kopplung mit der HT-HPLC wurde bei der Auswahl von Innen- und Außendurchmesser darauf geachtet, dass die Maße möglichst nah bei den gebräuchlichen HPLC-Standardgrößen liegen. Es wurden insgesamt vier Kapillarstücke verwendet, deren Spezifikationen in der Tabelle 7-1 dargestellt sind.

Tabelle 7-1: Verwendete Kapillaren aus Teflon® AF 2400.

Interne Bezeichnung	Lieferant	Innendurchmesser (µm)	Außendurchmesser (µm)	Länge (cm)
01RT171	Random Technologies	171	353	66
02RT250	Random Technologies	250	362	45
01BG250	Biogeneral	250	500	100
02BG360	Biogeneral	360	890	100

7.3.2.3 Funktionsprinzip des Flüssigkern-Lichtwellenleiters

In diesem Kapitel wird die Arbeitsweise des Flüssigkern-Lichtwellenleiters am Beispiel einer mit Wasser gefüllten Kapillare aus Teflon® AF 2400 demonstriert. Weitere Informationen zu den physikalischen Eigenschaften Teflon® AF beschichteter Kapillaren und deren Einsatz als Flüssigkern-Lichtwellenleiter können den Publikation nach und Dress und Franke sowie Altkorn und Koev entnommen werden [51, 52].

Die Abbildung 7-14 zeigt einen schematischen Längsschnitt der von Random Technologies bezogenen Kapillare 01RT171 mit einem Innendurchmesser von $171\ \mu\text{m}$ und einem Außendurchmesser von $353\ \mu\text{m}$. Die Länge des dargestellten Kapillarausschnittes beträgt $1\ \text{mm}$.

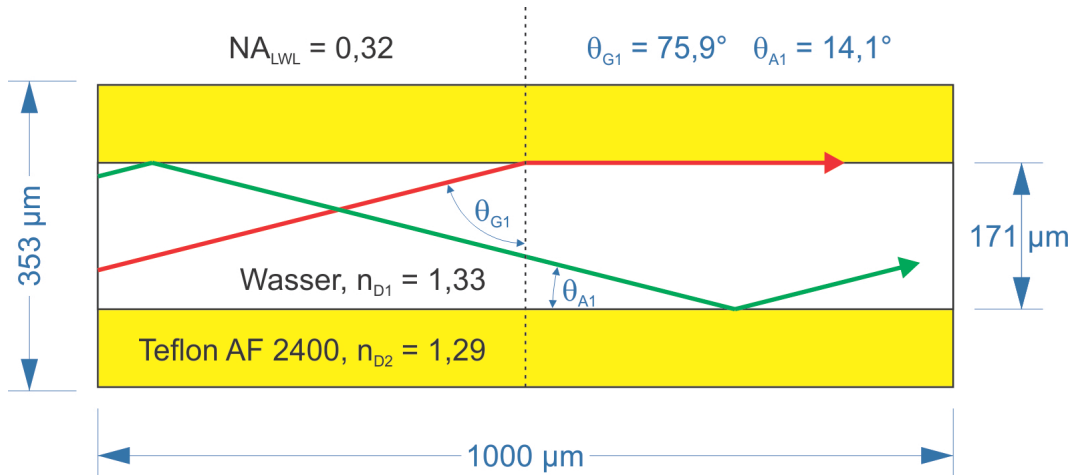


Abbildung 7-14: Funktionsprinzip des wassergefüllten Flüssigkern-Lichtwellenleiters 01RT171 bei Totalreflexion an der Kapillarinnenwand.

n_D : Brechungsindex bei $589\ \text{nm}$ (Natrium-D-Linie) und einer Temperatur von $20\ ^\circ\text{C}$, NA_{LWL} : Numerische Apertur des Lichtwellenleiters, θ_G : Grenzwinkel der Totalreflexion (Kritischer Winkel), θ_A : Maximaler Akzeptanzwinkel.

Das Wasser entspricht in dieser Konstellation dem optisch dichteren Medium mit einem Brechungsindex von $n_{D1} = 1,33$ und erfüllt somit die Aufgabe des lichtleitenden Faserkerns. Die Totalreflexion findet an der Grenzfläche zum optisch dünneren Medium statt, das aus Teflon® AF 2400 mit einem Brechungsindex von $n_{D2} = 1,29$ besteht. Die Wellenlängenabhängigkeit des Brechungsindex von Wasser und Teflon AF 2400 spielt für den in dieser Arbeit verwendeten Spektralbereich zwischen 532 und $610\ \text{nm}$ nur eine untergeordnete Rolle. Im Falle von Wasser liegt der Brechungsindex für $532\ \text{nm}$ bei $n_{532} = 1,3337$ und sinkt bei $610\ \text{nm}$ auf $n_{610} = 1,3320$. Teflon AF 2400 zeigt über den gesamten Spektralbereich zwischen 532 und $610\ \text{nm}$ einen relativ konstanten Brechungsindex kleiner $1,29$ [73].

In der Zeichnung wird der Lichttransport durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter schematisch durch die beiden Pfeile gekennzeichnet. Dargestellt durch den roten Pfeil trifft das Licht unter dem Grenzwinkel der Totalreflexion θ_{G1} auf die Innenwand der Teflon® AF Kapillare und wird vom Lot (gestrichelte Linie) weg gebrochen, also in Richtung Faserkern.

Der reflektierte Lichtstrahl setzt seinen Weg senkrecht zum Lot fort und verläuft entlang der Grenzfläche von Wasser und Kapillareninnenwand. Der Grenzwinkel der Totalreflexion lässt sich nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz (Formel 9) auf $\theta_{G1} = 75,9^\circ$ berechnen:

$$\theta_{G1} = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (9)$$

- θ_{G1} : Grenzwinkel der Totalreflexion (Kritischer Winkel) an der Kapillar-Innenwand
 n_1 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums (für Wasser: $n_1 = 1,33$)
 n_2 : Brechungsindex des optisch dünneren Medium (für Teflon® AF 2400: $n_2 = 1,29$)

Formel 9: Berechnung des Grenzwinkels der Totalreflexion im LWL an der Kapillar-Innenwand.

Mit dem grünen Pfeil wird bei Totalreflexion an der Innenwand der Teflon-Kapillare der idealisierte Lichtweg durch den Flüssigkern dargestellt. Der maximal zulässige Akzeptanzwinkel des Lichtwellenleiters lässt sich direkt aus dem Grenzwinkel der Totalreflexion mit $\theta_{A1} = 14,1^\circ$ bestimmen (Formel 10):

$$\theta_{A1} = 90^\circ - \theta_{G1} \quad (10)$$

- θ_{A1} : Maximaler Akzeptanzwinkel des Lichtwellenleiters bei Totalreflexion an der Kapillar-Innenwand (Grenzfläche Wasser / Teflon® AF 2400)
 θ_{G1} : Grenzwinkel der Totalreflexion (Kritischer Winkel) an der Kapillar-Innenwand

Formel 10: Berechnung des maximalen Akzeptanzwinkels im LWL bei Totalreflexion an der Kapillar-Innenwand.

Alle Lichtstrahlen, die in Winkeln zwischen 0° und $14,1^\circ$ auf die Kapillareninnenwand treffen, werden mittels Totalreflexion weitgehend verlustfrei durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter transportiert. Die Lichtsammelfähigkeit von Faseroptiken wird in der Lichtwellenleitertechnik üblicherweise als numerische Apertur angegeben und lässt sich für den Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach Formel 11 berechnen:

$$NA_{LWL} = n_L \cdot \sin \theta_{A1} = \sqrt{n_1^2 - n_2^2} \quad (11)$$

- NA_{LWL} : Numerische Apertur des Lichtwellenleiters
 n_L : Brechungsindex des lichtleitenden Mediums (für Wasser: $n = 1,33$)
 θ_{A1} : Maximaler Akzeptanzwinkel des Lichtwellenleiters bei Totalreflexion an der Kapillar-Innenwand (Grenzfläche Wasser / Teflon® AF 2400)
 n_1 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums (für Wasser: $n_1 = 1,33$)
 n_2 : Brechungsindex des optisch dünneren Medium (für Teflon® AF 2400: $n_2 = 1,29$)

Formel 11: Berechnung der numerischen Apertur des Flüssigkern-Lichtwellenleiters.

Die numerische Apertur der mit Wasser gefüllten Kapillare aus Teflon® AF 2400 beträgt $NA_{LWL} = 0,32$. Diese liegt im Vergleich zu handelsüblichen Lichtwellenleitern aus Quarzglas mit typischer $NA_{LWL} = 0,22$ deutlich höher.

Treffen Lichtstrahlen in einem steileren Winkel als der maximale Akzeptanzwinkel auf die Kapillarinnenwand, so durchtreten sie die Grenzfläche, und durchlaufen den Kapillarmantel bis hin zur Außenwand. Grenzt diese an Luft, erfolgt für bestimmte Einfallswinkel Totalreflexion. Die Abbildung 7-15 zeigt anhand der violetten Pfeile den möglichen Strahlenverlauf bei Totalreflexion an der Außenseite der Teflon® AF Kapillare.

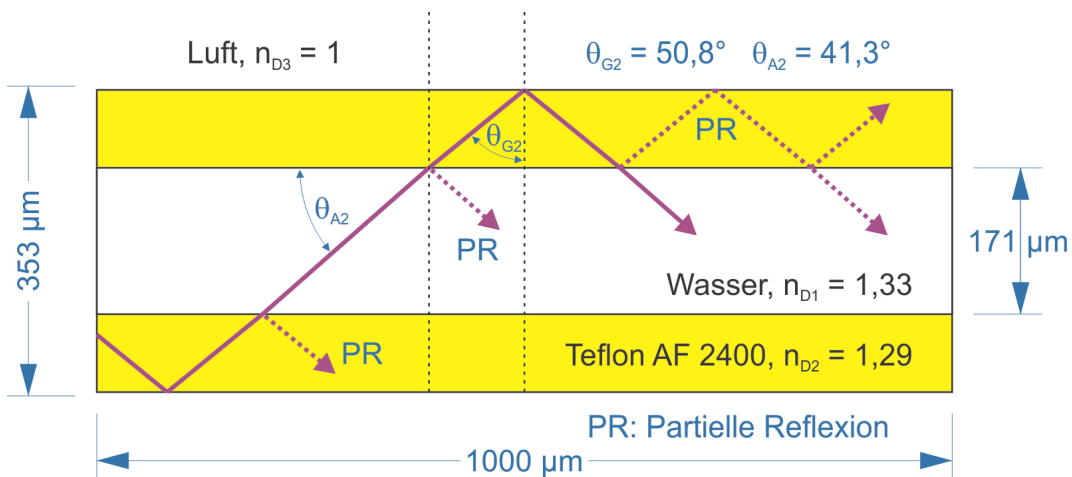


Abbildung 7-15: Funktionsprinzip des wassergefüllten Flüssigkern-Lichtwellenleiters 01RT171 bei Totalreflexion an der Kapillaraußenwand.

n_D : Brechungsindex bei 589 nm (Natrium-D-Linie) und einer Temperatur von 20 °C, NA_{LWL} : Numerische Apertur des Lichtwellenleiters, θ_G : Grenzwinkel der Totalreflexion (Kritischer Winkel), θ_A : Maximaler Akzeptanzwinkel, PR: Partielle Reflexion.

Für die Grenzfläche Teflon® AF 2400 und Luft ergibt sich nach Formel 12 ein Grenzwinkel der Totalreflexion von $\theta_{G2} = 50,8^\circ$.

$$\theta_{G2} = \arcsin\left(\frac{n_3}{n_2}\right) \quad (12)$$

θ_{G2} : Grenzwinkel der Totalreflexion (Kritischer Winkel) an der Kapillar-Außenwand

n_2 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums (für Teflon® AF 2400: $n_2 = 1,29$)

n_3 : Brechungsindex des optisch dünneren Medium (für Luft: $n_3 = 1$)

Formel 12: Berechnung des Grenzwinkels der Totalreflexion im LWL an der Kapillar-Außenwand.

Aus diesem Wert lässt sich der entsprechende Akzeptanzwinkel im lichtleitenden Flüssigkern mit $\theta_{A2} = 41,3^\circ$ bestimmen (Formel 13):

$$\theta_{A2} = 90^\circ - \arcsin\left(\sin \theta_{G2} \cdot \frac{n_2}{n_1}\right) \quad (13)$$

θ_{A2} : Maximaler Akzeptanzwinkel des Lichtwellenleiters bei Totalreflexion an der Kapillar-Außenwand (Grenzfläche Teflon® AF 2400 / Luft)

θ_{G2} : Grenzwinkel der Totalreflexion an der Kapillar-Außenwand

n_1 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums (für Wasser: $n_1 = 1,33$)

n_2 : Brechungsindex des optisch dünneren Medium (für Teflon® AF 2400: $n_2 = 1,29$)

Formel 13: Berechnung des maximalen Akzeptanzwinkels im LWL bei Totalreflexion an der Kapillar-Außenwand.

Demnach werden Lichtstrahlen, die zwischen den beiden Akzeptanzwinkeln θ_{A1} und θ_{A2} , also zwischen $14,1^\circ$ und $41,3^\circ$ den Flüssigkern-Lichtwellenleiter durchlaufen, die Kapillar-Innenwand zunächst passieren und erst an der Kapillar-Außenwand totalreflektiert. Diese Form des Lichttransports unterliegt allerdings Reflexionsverlusten, die insbesondere beim Wiedereintritt in den Flüssigkern eine Rolle spielen. Bei jedem Durchtritt von Licht durch die Grenzfläche Wasser / Teflon® AF 2400 unterliegt ein geringer Teil des Lichtes der Reflexion. Die partielle Reflexion (PR) wird in der Abbildung 7-15 durch die gestrichelten Pfeile dargestellt. Ein Teil des Lichts breitet sich demnach innerhalb der Kapillarwand aus und dieser Anteil wächst mit der Anzahl der Reflexionen, sprich mit der Länge des Flüssigkern-Lichtwellenleiters. Verstärkt werden die Verluste zusätzlich aufgrund der prinzipiell zwar geringen aber aufgrund der erhöhten Wegstrecke doch merkbaren Absorption des Teflons von ca. 5 % pro 220 μm Schichtdicke im sichtbaren Spektralbereich [48].

7.3.2.4 Einkopplung des Laserlichtes in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter

Bei der Adaption des Flüssigkern-Lichtwellenleiters als Durchfluss-Messzelle wurde neben optischen Aspekten besonders auf Druckstabilität und Totvolumenfreiheit geachtet. Die zwei letztgenannten Kriterien lassen sich gut realisieren, wenn auf handelsübliche Komponenten der HPLC-Technik zurückgegriffen wird. Daher wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei dem die optische Kopplung über ein Edelstahl-T-Stück der Firma Upchurch Scientific®/ IDEX Health & Science LLC erfolgte.

Verwendet wurde das Model „U-428 Stainless Steel Tee“ mit Durchgangsbohrungen von 500 µm Durchmesser und einem vom Hersteller ausgewiesenen Flussvolumen (swept volume) von 0,57 µL. Die Abbildung 7-16 zeigt einen Querschnitt des verwendeten T-Stücks unter Berücksichtigung der tatsächlichen Größenverhältnisse.

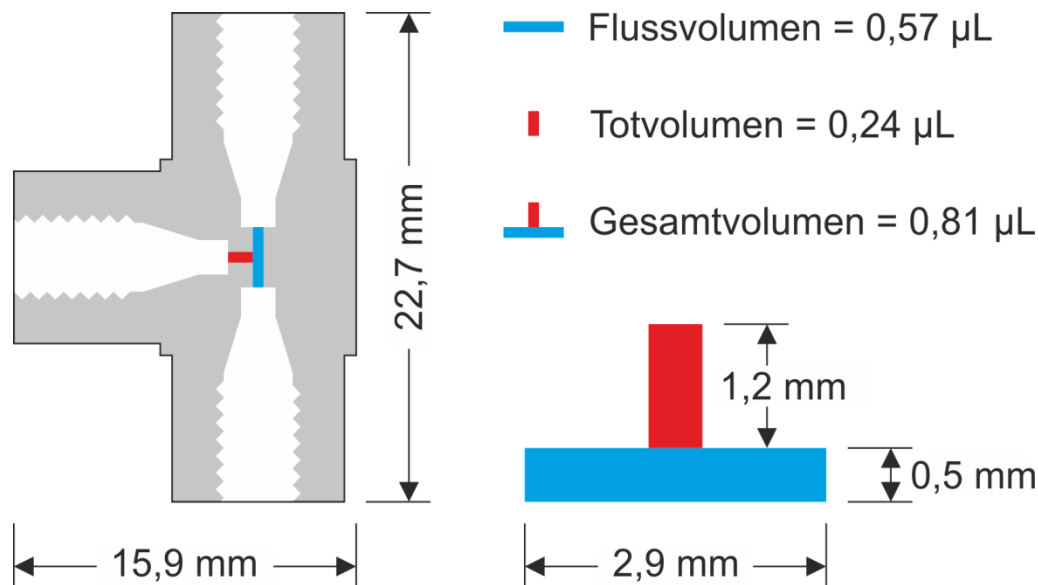


Abbildung 7-16: Schematischer Querschnitt und Bemaßung des T-Stücks „U-428 Stainless Steel Tee“ der Firma Upchurch Scientific® / IDEX Health & Science LLC.

Das Flussvolumen entspricht der geraden Längsbohrung im T-Stück und wird durch die blaue Fläche markiert. Aus den Angaben von Flussvolumen und Bohrungsdurchmesser lässt sich die Bohrtiefe der Längsbohrung auf 2,9 mm berechnen. Unter der Annahme eines symmetrischen Aufbaus ergibt sich für den seitlichen Kanal eine Bohrtiefe von 1,2 mm. Somit lässt sich das in der Zeichnung rot markierte Totvolumen auf 0,24 µL berechnen. Das Gesamtvolumen des T-Stücks liegt dementsprechend bei 0,81 µL.

Die Abbildung 7-17 zeigt die Funktionsweise des Edelstahl-T-Stücks „U-428 Stainless Steel Tee“ im Allgemeinen sowie die optische Anpassung zur Laserlicht-Einkopplung. Die linke Seite der Abbildung stellt den üblichen Fall einer Kopplung von drei HPLC-Kapillaren dar. Die Kapillaren (rot) besitzen einen genormten Außendurchmesser von 1/16 Zoll (1,5875 mm). Sie werden durch „Fittings“, bestehend aus „Ferrule“ (gelb) und „Nut“ (grau) in das T-Stück gepresst. Je nach eingesetztem Material (z. B. PEEK, Tefzel®, Edelstahl) lassen sich druckdichte Einschraubverbindungen realisieren, die Gegendrücken bis über 1000 bar standhalten.

Des Weiteren zeigen die Abbildung 7-17 sowie in vergrößerter Ansicht die Abbildung 7-18 (siehe Nummerierungen im weiteren Textverlauf) wie das Laserlicht über die Längsbohrung des T-Stücks in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter eingekoppelt wird.

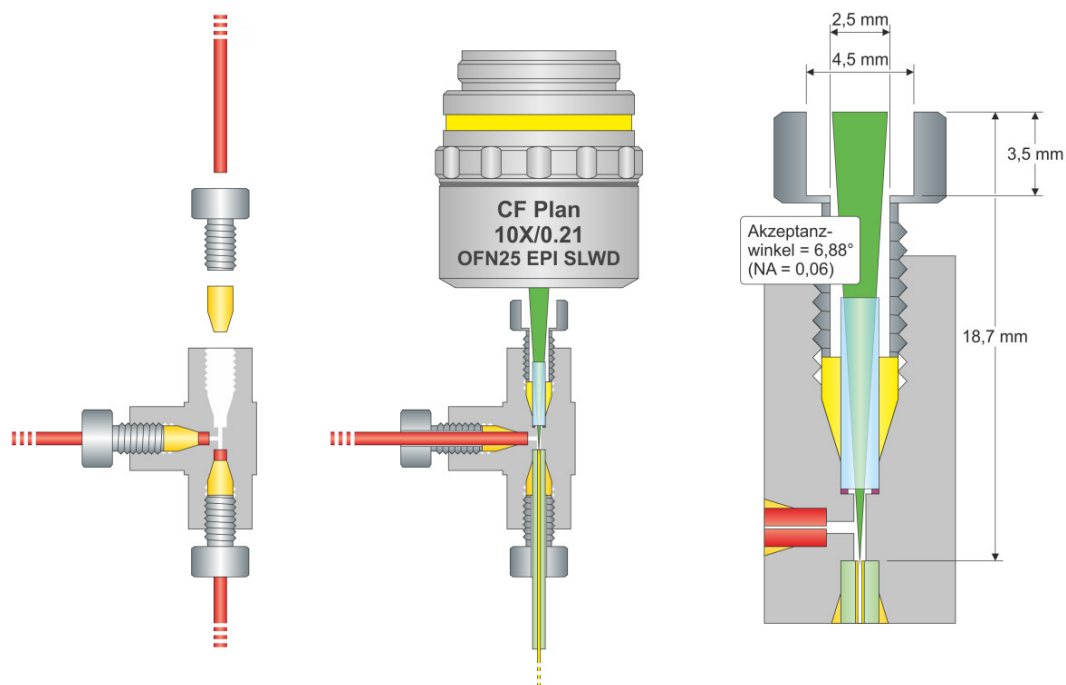


Abbildung 7-17: Einkopplung des Laserlichtes in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter mittels modifiziertem HPLC Edelstahl T-Stück „U-428 Stainless Steel Tee“.

Dazu wird die obere Seite des T-Stücks mit einem Quarzstab (Suprasil® 300) der Firma Hilgenberg GmbH als optisches Fenster verschlossen. Der Quarzstab (3) besitzt laut Herstellerangabe einen runden Außendurchmesser von $1,575 \text{ mm} \pm 0,025$ und passt somit genau in die $1/16''$ Aufnahmefassung des Edelstahl-T-Stücks (5). Die Befestigung und Abdichtung erfolgt mittels Tefzel®-Ferrule (2) und Edelstahleinschraubung. Die Stirnflächen des Quarzstabs sind plan und beidseitig optisch poliert (Feuerpolitur). Zum Schutz der inneren Stirnfläche sitzt zwischen Quarzstab und Edelstahleinfassung ein Dichtring (4) aus FEP (Perfluorethylenpropylen-Copolymer). Dieser wurde aus einem $200 \mu\text{m}$ breiten Abschnitt eines Tubing Sleeves mit 1 mm Innendurchmesser und $1/16''$ Außendurchmesser hergestellt.

In den unteren Zugang des T Stücks wird der Flüssigkern-Lichtwellenleiter (7) aus Teflon® AF 2400 (Modell: 01RT171, siehe Tabelle 7-1) mit einem Innendurchmesser von $171 \mu\text{m}$ adaptiert. Der geringe Außendurchmesser der Teflon® AF Kapillare von $353 \mu\text{m}$ wird mit einem passenden Mantelkapillar-Stück (Tubing Sleeve aus Teflon-FEP, 8) an das Edelstahl-T-Stück angepasst. Der Tubing Sleeve besitzt einen Innendurchmesser von $381 \mu\text{m}$ und einem Außendurchmesser von $1/16''$. Die Befestigung erfolgt mittels Fitting bestehend aus Tefzel®-Ferrule (2)

und Edelstahleinschraubung. Um eine Verstopfung des T-Stücks zu vermeiden, muss bei der Adaption darauf geachtet werden, dass die Teflon® AF Kapillare bündig mit dem Tubing Sleeve abschließt und nicht in die Durchgangsbohrung des T-Stücks hineinrutscht.

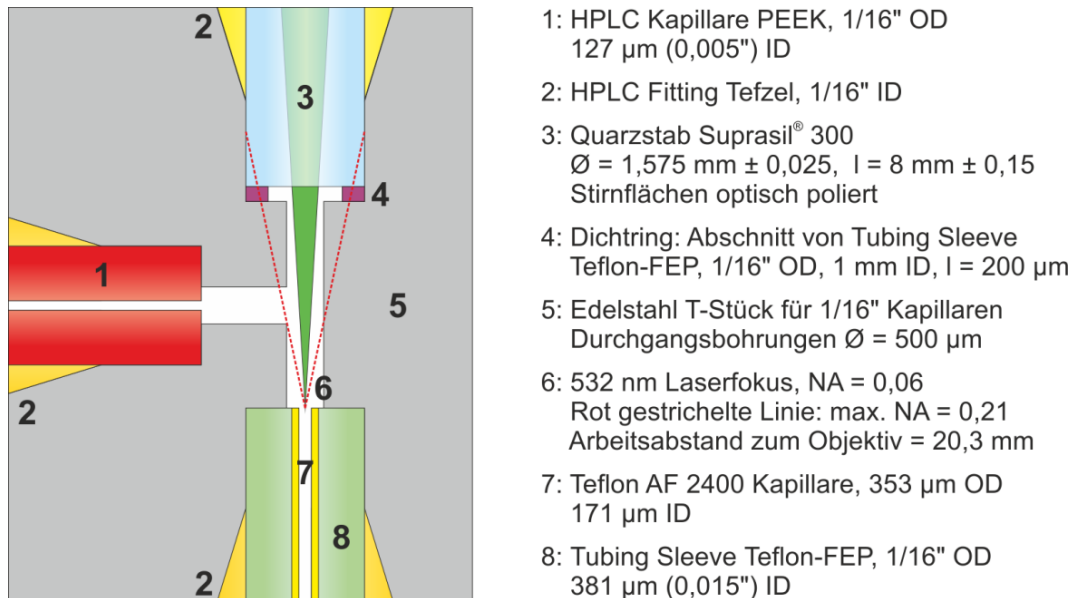


Abbildung 7-18: Detailzeichnung zur Einkopplung des Laserlichtes in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter.

Die Flüssigkeit bzw. die mobile Phase der HT-HPLC wird mittels PEEK-Kapillare (1) mit einem 127 µm Innen- und 1/16" Außendurchmesser in das T-Stück eingespeist und fließt über einen 90°-Winkel in Richtung Teflon® AF Kapillare (7). Das Flussvolumen stellt demnach nicht wie vom Hersteller vorgesehen die Längsbohrung im T-Stück dar (siehe Abbildung 7-16), sondern verläuft über Eck. Das Totvolumen befindet sich demnach im Kanal unterhalb des optischen Fensters. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus des T-Stücks bleibt der für das Flussvolumen berechnete Wert von 0,57 µL bestehen. Allerdings erhöht sich das Totvolumen im T-Stück (0,24 µL) um das Innenvolumen des Dichtrings, das sich auf 0,16 µL berechnet. Damit berechnet sich das Gesamttotvolumen der Adaption auf 0,4 µL.

Der Abstand von der Oberkante der Edelstahleinschraubung bis zur Stirnfläche der Teflon® AF Kapillare beträgt nach dem Zusammenbau 18,7 mm. Über diese Distanz muss das Laserlicht (6) möglichst verlustfrei unter Vermeidung von Randkontakten in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter fokussiert werden. Dazu wird ein spezielles Mikroskopobjektiv der Firma Nikon, Modell CF IC EPI Plan SLWD 10XA, verwendet (siehe Anhang, Kapitel 11.2, Tabelle 11-2, Abbildung 11-5). Das Objektiv mit 10-fach Vergrößerung besitzt einen sehr großen Arbeitsabstand von 20,3 mm bei einer numerischen Apertur von NA = 0,21. Das entspricht einem maximalen Akzeptanzwinkel von 24,24°, der für die verlustfreie Einkopplung in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter deutlich zu groß ist (siehe rot gestrichelte Linie

in Abbildung 7-18). Dieser Öffnungswinkel wird allerdings nur bei vollständiger Ausleuchtung der Eintrittspupille des Mikroskopobjektives mit einem Durchmesser von 8,5 mm erreicht. Im Experiment trifft der Laserstrahl ohne vorherige Aufweitung mit einem gemessenen Strahldurchmesser von 2,9 mm auf die Eintrittspupille. An der Austrittspupille wurde der Strahldurchmesser auf 2,5 mm bestimmt. Mit einem Arbeitsabstand von 20,3 mm ergibt sich für die Laserlicht-Einkopplung eine numerische Apertur von $NA = 0,06$ mit einem Öffnungswinkel von $6,88^\circ$. Unter diesem Winkel kann die Längsbohrung im T-Stück, die selbst einen maximalen Akzeptanzwinkel von annähernd 10° ($NA = 0,086$) zulässt, kontaktfrei überbrückt werden. Des Weiteren wurde in einem ersten Schritt die gesamte Edelstahleinschraubung von standardmäßig 1,7 mm auf 2,5 mm aufgebohrt. Danach wurde eine im Durchmesser 4,5 mm breite und 3,5 mm tiefe Zweitbohrung in den Schraubenkopf eingebracht (siehe Abbildung 7-17, rechts). Da der Quarzstab die Funktion eines optischen Fensters übernimmt, wurde darauf geachtet, dass das Laserlicht diesen von Stirnfläche zu Stirnfläche ohne Randkontakte passiert. Dementsprechend wurde die optimale Länge des Quarzstabes auf 8 mm berechnet und von der Firma Hilgenberg GmbH mit einer Genauigkeit von $8 \text{ mm} \pm 0,15$ produziert.

Mit den vorgenommenen Modifikationen lässt sich ein handelsübliches Edelstahl-T-Stück aus der HPLC-Technik für die Einkopplung des Laserlichtes in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter verwenden. Die optische Kopplung erfolgt dabei weitestgehend verlustfrei – somit kann eine hohe Photonendichte im Flüssigkern-Lichtwellenleiter erzeugt werden. Zudem ist die Art des Aufbaus unter Erhalt der standardisierten HPLC-Verbindungstechnik extrem druckstabil und damit hinsichtlich der Kopplung mit der HT-HPLC optimal geeignet.

Als nachteilig ist bei diesem Aufbau das zusätzliche Totvolumen zu benennen, das mit Integration des Dichtringes entsteht. Insbesondere die Stufenkante, die beim Übergang von der 0,5 mm Durchgangsbohrung des T-Stücks zum 1 mm großen Innendurchmesser des Dichtringes entsteht, ist hinsichtlich möglicher Memory-Effekte alles andere als optimal zu bewerten. Zudem konnte beobachtet werden, dass unerwünschte Gaseinschlüsse in der mobilen Phase im Totvolumen verbleiben. Diese sammeln sich als Gasblase direkt unterhalb des optischen Fensters an und führen zu einem starken Einbruch der Laserleistung im Flüssigkern-Lichtwellenleiter. An dieser Stelle besteht in nachfolgenden Arbeiten Optimierungsbedarf.

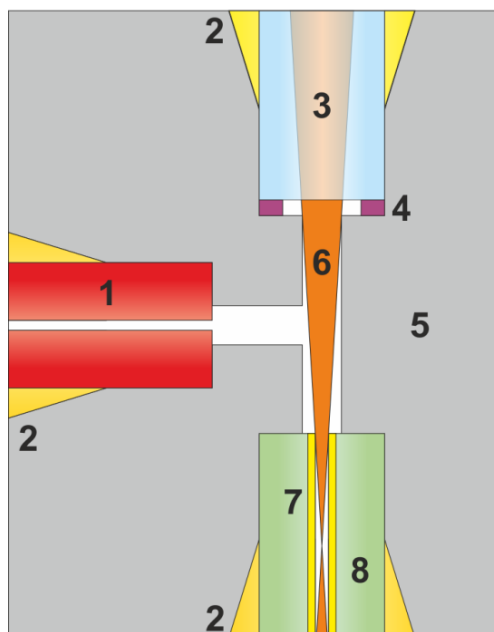
7.3.2.5 Auskopplung des Raman-Streulichtes aus dem Flüssigkern-Lichtwellenleiter

Die Auskopplung des Raman-Streulichtes kann prinzipiell von beiden Seiten des Flüssigkern-Lichtwellenleiters erfolgen. Das rückwärts gerichtete Raman-Streulicht lässt sich z. B. mit dem Mikroskopobjektiv sammeln, das auch zur Einkopplung des Laserlichtes verwendet wird. Entsprechend dem Lichtweg im Raman-Mikroskop-Spektrometer (siehe Abbildung 7-6) kann das Raman-Streulicht über den dichroitischen Strahlteiler zur Monochromator/Detektor-Einheit geführt und spektral analysiert werden. Alternativ lässt sich aber auch das vorwärts gerichtete Raman-Streulicht am anderen Ende des Flüssigkern-Lichtwellenleiters abnehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu ein zweites Edelstahl-T-Stück in den Aufbau integriert und das Raman-Streulicht direkt mit einem passenden Lichtwellenleiter aus Quarzglas abgenommen und zur Monochromator/Detektor-Einheit geführt.

Die Abbildung 7-19 zeigt beide Konzepte zur Auskopplung des Raman-Streulichtes im Vergleich. Die Lichtsammelleistung beider Methoden wird maßgeblich vom zulässigen Akzeptanzwinkel der Längsbohrung im T-Stück (5) begrenzt. Unter der Voraussetzung, dass der Flüssigkern-Lichtwellenleiter (7) vollständig gerade im T-Stück adaptiert ist, passiert Licht (6), das den Flüssigkern-Lichtwellenleiter unterhalb eines Gesamtöffnungswinkels von 10° verlässt, die Längsbohrung im T-Stück ohne Wandkontakte. Die Abnahme des vorwärts gerichteten Raman-Streulichtes mittels Lichtwellenleiter (9) bietet allerdings den Vorteil, dass die Stirnfläche der Quarzfaser unmittelbar vor die Durchgangsbohrung adaptiert werden kann. Wie die rechte Seite der Abbildung 7-19 zeigt, wurde dazu eine Quarzfaser der Firma *Laser Components GmbH* verwendet. Das Modell HCG-M0550T besitzt einen lichtleitenden Faserkern mit einem Durchmesser von $550\ \mu\text{m}$ und deckt die $500\ \mu\text{m}$ Durchgangsbohrung des T-Stücks vollständig ab. Idealerweise ist eine optische Politur der Faserstirnfläche ohne vorheriges Abziehen des schützenden Kunststoffmantels (in der Abbildung blau dargestellt) möglich. Somit behält der Lichtwellenleiter seine Stabilität und kann ohne Beschädigung fest in das T-Stück gepresst werden. Mit einem Außendurchmesser des Lichtwellenleiters von $750\ \mu\text{m}$ eignet sich zur Dichtung in das T-Stück ein Tubing Sleeve (10) mit einem handelsüblichen Innendurchmesser von $785\ \mu\text{m}$ und einem Außendurchmesser von $1/16''$. Im Vergleich zum Quarzstab (3) kann bei der Quarzfaser auf einen Dichtring (4) verzichtet und ein zusätzliches Totvolumen vermieden werden.

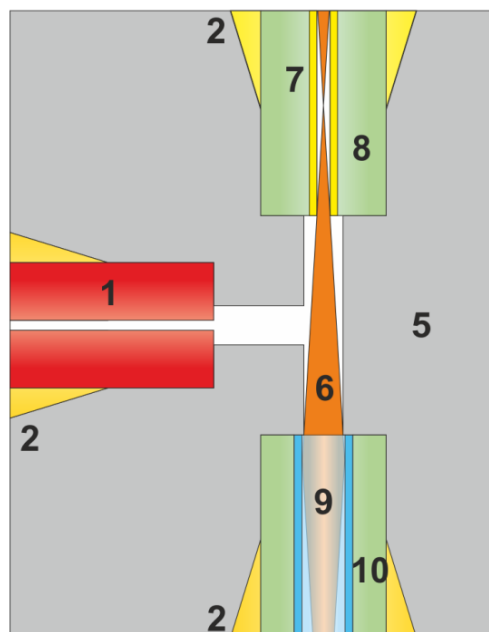
Der Einsatz des Lichtwellenleiters mit einer numerischen Apertur von $NA = 0,22$ sowie die Positionierung des Faserendes in Kontakt mit der Durchgangsbohrung ermöglicht im Vergleich zur „Glasstab-Version“ eine leicht erhöhte Lichtsammelleistung. Dies erklärt sich mit der Tatsache, dass ein gewisser Anteil des Raman-Streulichtes die Durchgangsbohrung auch unter Reflexion an der Innenwand überbrückt. Alles Licht, das die Stirnfläche der Glasfaser mit einer numerischen Apertur von $NA \leq 0,22$ erreicht, kann weitestgehend verlustfrei zum Monochromator transportiert werden. Im Falle der Streulichtabnahme mittels Glasstab kann ein Großteil des reflektiert austretenden Lichtes aufgrund der veränderten Strahlenverläufe nicht vom Mikroskopobjektiv abgebildet werden.

Abnahme des rückwärts gerichteten Raman-Streulichtes mittels Glasstab und Mikroskopobjektiv



- 1: HPLC Kapillare PEEK, 1/16" OD
127 μm (0,005") ID
- 2: HPLC Fitting Tefzel, 1/16" ID
- 3: Quarzstab Suprasil® 300
 $\varnothing = 1,575 \text{ mm} \pm 0,025$, $l = 8 \text{ mm} \pm 0,15$
Stirnflächen optisch poliert
- 4: Dichtring: Abschnitt von Tubing Sleeve
Teflon-FEP, 1/16" OD, 1 mm ID, $l = 200 \mu\text{m}$
- 5: Edelstahl T-Stück für 1/16" Kapillaren
Durchgangsbohrungen $\varnothing = 500 \mu\text{m}$

Abnahme des vorwärts gerichteten Raman-Streulichtes mittels Glasfaser über ein zweites T-Stück



- 6: Raman-Streulicht, $NA = 0,086$
Akzeptanzwinkel = 10°
- 7: Teflon AF 2400 Kapillare, 353 μm OD
171 μm ID
- 8: Tubing Sleeve Teflon-FEP, 1/16" OD
381 μm (0,015") ID
- 9: Quarzfaser Laser Components GmbH
HCG-M0550T, 750 μm OD, 550 μm ID
- 10: Tubing Sleeve PEEK, 1/16" OD
785 μm (0,031") ID

Abbildung 7-19: Darstellung von zwei Konzepten zur Auskopplung des Raman-Streulichtes aus dem Flüssigkern-Lichtwellenleiter.

Neben den genannten Vorteilen birgt der Einsatz des Lichtwellenleiters allerdings auch Nachteile, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen. Bei Raman-Streulichtabnahme mittels Glasstab erzeugt das Mikroskopobjektiv in Kombination mit dem achromatischen Linsensystem vorm Monochromator eine

Zwischenabbildung von der Stirnfläche des Flüssigkern-Lichtwellenleiters. Die Zwischenabbildung wird in die Ebene der Eingangsapertur des HoloSpec Monochromators justiert und 1:1 auf den 100 μm breiten Spalt abgebildet. Entscheidend für den Anteil des nutzbaren Streulichtes ist daher die Größe der Zwischenabbildung. Das gegen unendlich korrigierte Nikon CF IC EPI Plan SLWD 10XA Mikroskopobjektiv besitzt eine 10-fach Vergrößerung, die allerdings nur in Kombination mit den in Nikon-Mikroskopen standardmäßig eingebauten Tubuslinsen mit 200 mm Brennweite erreicht wird. Der in diesem Aufbau verwendete Achromat besitzt eine Brennweite von 35 mm. Nach den Gesetzen der linearen Optik ergibt sich dann für die Zwischenabbildung eine Vergrößerung um den Faktor 1,75. Die Stirnfläche des Flüssigkern-Lichtwellenleiters mit einem Durchmesser von 171 μm wird demnach mit ziemlich genau 300 μm Durchmesser auf den Eintrittspalt des Monochromators abgebildet. Dementsprechend können ca. 43 % des gesammelten Raman-Streulichtes den Spalt passieren und zur weiteren spektralen Analyse genutzt werden.

Wird das Raman-Streulicht mittels Lichtwellenleiter abgenommen, entspricht die Stirnfläche des Faserkerns der Zwischenabbildung im Monochromator. Dazu wird die Quarzfaser mittels Standard F-SMA (SMA 905) in die Ebene der Eingangsapertur des HoloSpecs fixiert und die Stirnfläche 1:1 auf den Eintrittspalt abgebildet. Mit einem Kerndurchmesser von 550 μm lässt sich berechnen, dass nur etwa 23 % des Raman-Streulichtes den Spalt passieren – also knapp halb so viel wie bei Abnahme mittels Glasstab und Mikroskopobjektiv.

Ein weiterer Nachteil entsteht bei Abnahme des vorwärts gerichteten Streulichtes dadurch, dass das Laserlicht nahezu verlustfrei den Flüssigkern-Lichtwellenleiter durchläuft und zusammen mit dem Raman-Streulicht in die Glasfaser eintritt. Hier erzeugt das Laserlicht eine starke Raman-Streuung des Quarzmaterials der Abnahmefaser, die als permanentes Untergrundsignal von der Detektor-Kamera mit erfasst wird. Der Problematik widmen sich im speziellen die Kapitel 7.3.2.7 und 7.3.2.8 mit der weiteren Optimierung des Raman-Detektors unter Verwendung optischer Filter.

In der Summe hat sich gezeigt, dass bei Einsatz eines Lichtwellenleiters ein wenig mehr Raman-Streulicht gesammelt wird, als bei dem alternativen Konzept mittels Mikroskopobjektiv und Glasstab. Daher wurde trotz der genannten Nachteile das vorwärts gerichtete Raman-Streulicht mittels Lichtwellenleiter abgenommen und die Durchflusszelle mit zwei Edelstahl T-Stücken aufgebaut. Die Abbildung 7-20 zeigt den finalen Aufbau der Raman-Durchflusszelle unter Verwendung einer 40 cm langen Teflon® AF 2400 Kapillare (01RT171) als Flüssigkern-Lichtwellenleiter.

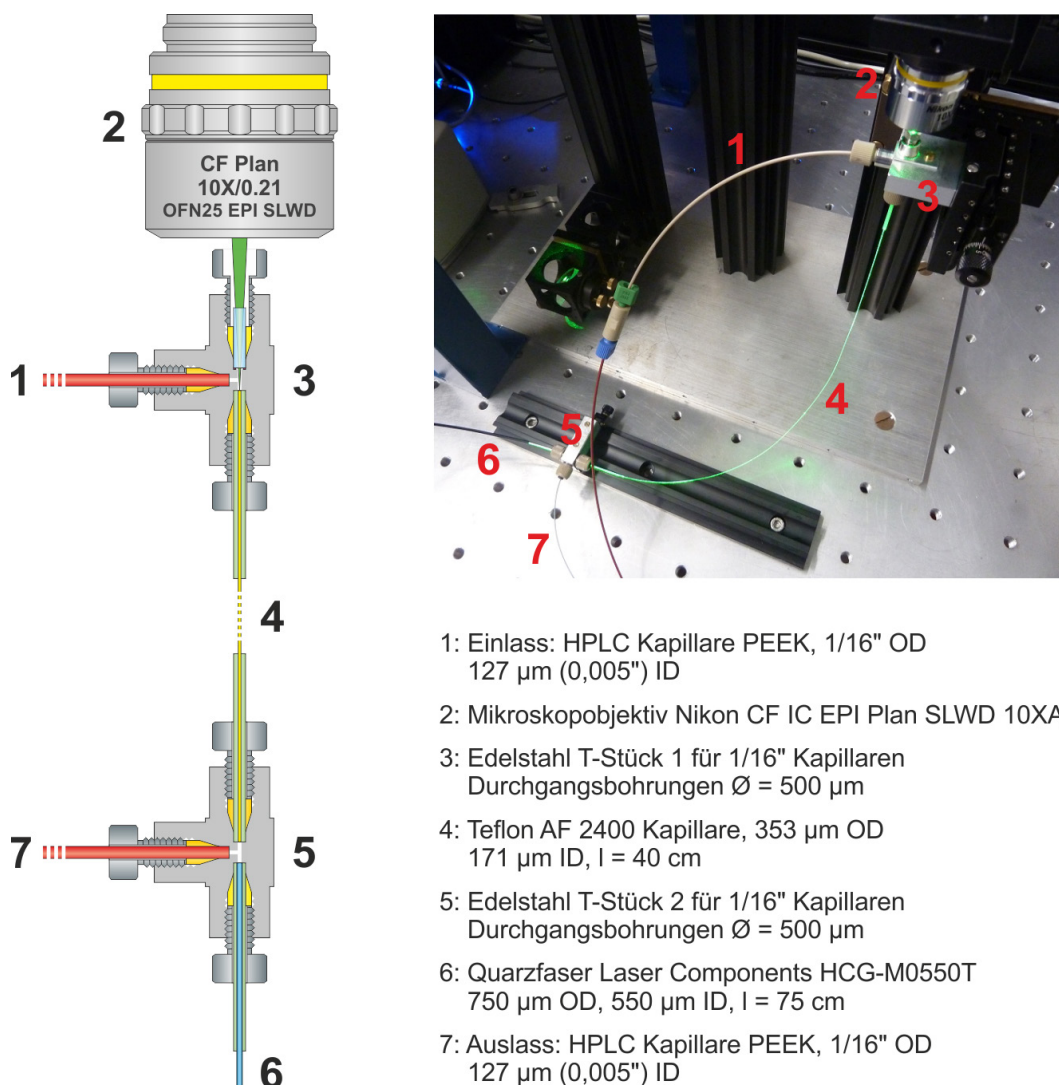


Abbildung 7-20: Finaler Aufbau der Raman-Durchflusszelle mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter.

Das Gesamtvolumen der Raman-Durchflusszelle setzt sich aus Flussvolumen und Totvolumen zusammen. Die beiden T-Stücke (3 und 5) besitzen zusammen ein Flussvolumen von 1,14 µL (je 0,57 µL). Dazu kommt das Volumen des Flüssigkern-Lichtwellenleiters, das 2,92 µL beträgt. Das Gesamtflussvolumen kann auf 4,06 µL berechnet werden. Das Totvolumen im Einkoppel-T-Stück (3) beträgt insgesamt 0,4 µL (0,16 µL anteilig durch den Dichtring), im Auskoppel-T-Stück (5) befindet sich ein Totvolumen von 0,24 µL. Das Gesamttotvolumen liegt

daher bei 0,64 μL . Das Gesamtvolumen der Raman-Durchflusszelle kann auf 4,7 μL berechnet werden und liegt damit im Bereich gängiger UV-Durchflusszellen für die HPLC. Das vorgegebene Maximalvolumen von 5 μL (siehe Kapitel 5.3) wurde sogar leicht unterschritten.

7.3.2.6 Raman-Testmessung an einer wässrigen Coffein-Lösung

Für eine erste Testmessung wurde der Flüssigkern-Lichtwellenleiter mit einer hoch konzentrierten wässrigen Coffein-Lösung von 10 g L^{-1} befüllt. Die Injektion erfolgte manuell über den Einlass (1) mittels handelsüblicher Polypropylen-Spritze und entsprechendem Spritzenadapter aus PEEK (Modell: Upchurch / IDEX P-659 F Luer to 10-32 F²). Das gemessene Raman-Spektrum ist in der Abbildung 7-21 dargestellt und zeigt die auffällig stark ausgeprägten Raman-Übergänge von Quarzglas bei 450, 491, 605, 800, 1057 und 1194 cm^{-1} . Auch die Rayleigh-Streuung bei einer zum Anregungslicht verschobenen relativen Wellenzahl von 0 cm^{-1} wird trotz des blockenden Notch-Filters im HoloSpec-Monochromator, mit einer optischen Dichte von $\text{OD} \geq 6$, verhältnismäßig intensiv detektiert. Die Messung bestätigt die bereits angesprochene Problematik, dass das Laserlicht von der Glasfaser quasi verlustfrei direkt zur Monochromator/Detektor-Einheit geführt wird. Dabei entsteht auch das starke Untergrund-Raman-Signal des lichtleitenden Quarzfaserkerns.

Für die Aufnahme des gezeigten Spektrums wurde der Laser auf 50 mW eingestellt. Die Belichtungszeit des Detektors betrug 1 s. Höhere Werte führten aufgrund des hohen Untergrundes zu einer Überbelichtung des CCD-Chips der Detektor-Kamera insbesondere im niederfrequenten Spektralbereich bis etwa 550 cm^{-1} .

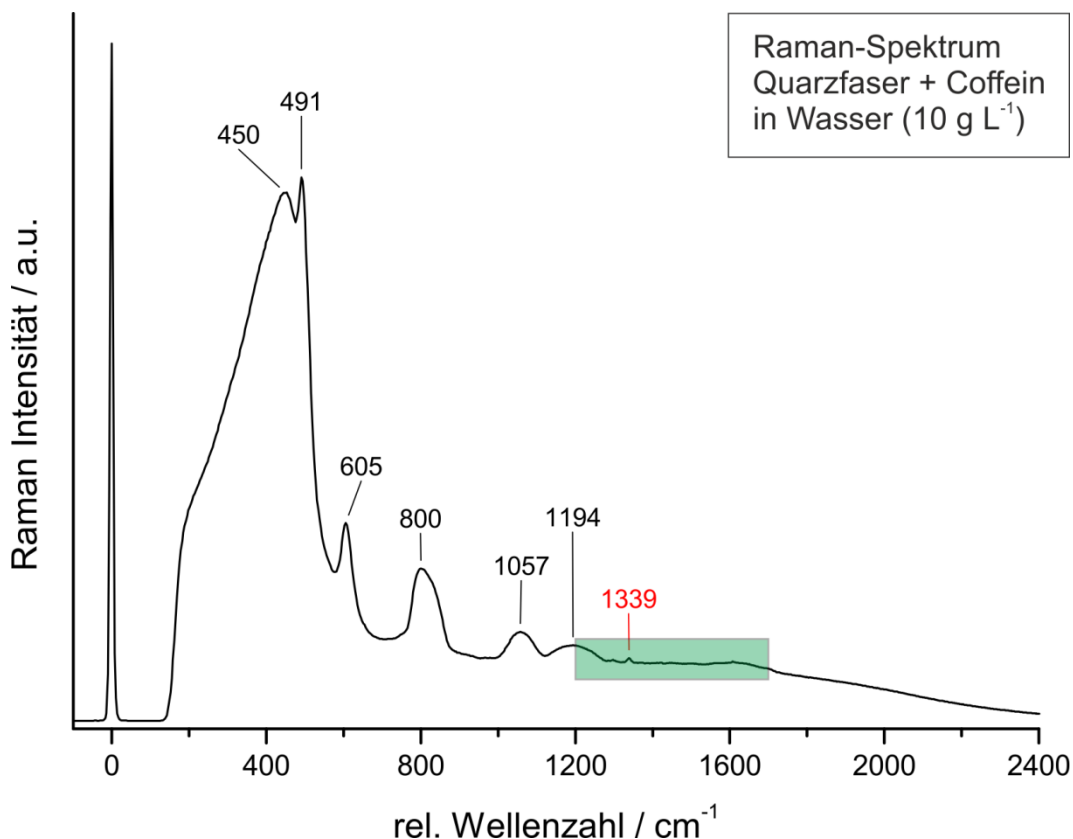


Abbildung 7-21: Raman-Spektrum von Coffein in Wasser mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach dem Aufbau der Abbildung 7-20. Konzentration: 10 g L^{-1} ; Laserleistung: 50 mW; Messzeit: 1 s.

Neben den Raman-Übergängen von Quarzglas lässt sich im Spektrum auch das prägnante Raman-Signal von Coffein bei 1339 cm^{-1} erkennen (rot markiert). Der Bereich zwischen 1200 und 1700 cm^{-1} (grün markierte Fläche) ist vergrößert in Abbildung 7-22 dargestellt. Alle Banden des Coffeins können in dem dargestellten Frequenzbereich eindeutig identifiziert werden. Das Signal bei 1339 cm^{-1} zeigt eine Zählrate von 9255 cps (Counts per second). Ein direkter Vergleich der Mess-Empfindlichkeit zwischen dem Aufbau mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter und dem Raman-Mikroskop-Spektrometer nach Kapitel 7.3.1 ist an dieser Stelle nicht möglich, da Coffein-Konzentration, Laserleistung und Detektionszeit stark voneinander abweichen. Allerdings lässt der lineare Zusammenhang zwischen den genannten Parametern und der Raman-Intensität bzw. der Raman-Zählrate eine grobe Abschätzung zu. Anhand der drei Coffein-Spektren in Abbildung 7-11 (Seite 46), die mittels Raman-Mikroskop-Spektrometer aufgenommen wurden, kann die erwartete Intensität der Raman-Bande bei 1339 cm^{-1} für eine Coffein-Konzentration von 10 g L^{-1} bei einer

Laserleistung von 50 mW und einer Detektionszeit von 1 s entsprechend umgerechnet werden. Unter diesen Vorgaben ergibt sich für den Raman-Übergang bei 1339 cm^{-1} eine Zählrate von 200 cps. Damit liegt die Raman-Intensität bei Verwendung des Flüssigkern-Lichtwellenleiters (9255 cps) etwa 46mal höher.

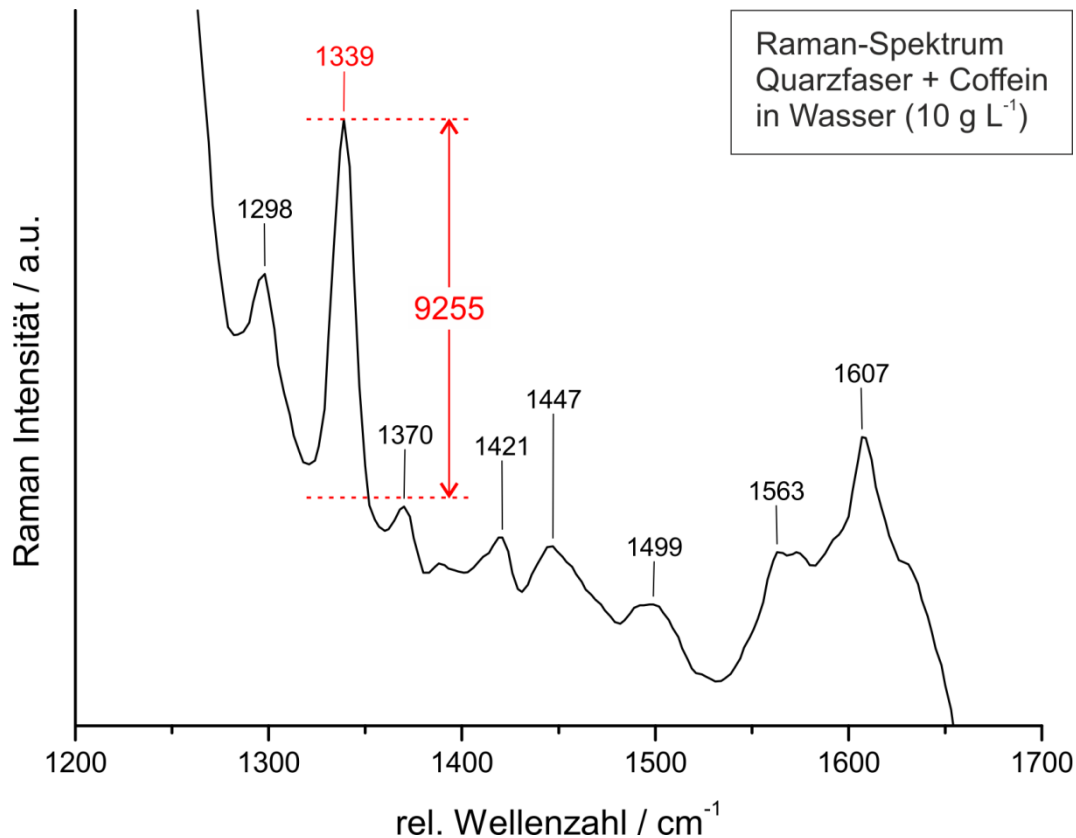


Abbildung 7-22: Raman-Spektrum von Coffein in Wasser mittels Flüssigkern-Lichtwellenleiter nach dem Aufbau der Abbildung 7-21. Konzentration: 10 g L^{-1} ; Laserleistung: 50 mW; Messzeit: 1 s.

Das Ergebnis zeigt im Ansatz, dass die Technologie der Raman-Durchflusszelle auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters großes Potential für die Untersuchung von niedrig konzentrierten Flüssigkeiten bietet. Um die Leistungsfähigkeit des Detektors weiter auszureizen, sprich höhere Laserleistungen und Detektionszeiten zu ermöglichen, muss das störende Untergrund-Raman-Signal der Quarzfaser so weit wie möglich unterdrückt werden.

7.3.2.7 Vergütung des Auskoppel-Lichtwellenleiters mit einem Langpass-Kantenfilter zur Raman-Streulichtabnahme

Heutzutage werden Lichtwellenleiter in vielen Bereichen der Raman-Spektroskopie standardmäßig eingesetzt. Das gilt sowohl für die Zuführung des Laserlichts zur Probe als auch für die Abnahme des erzeugten Raman-Streulichts. Bei solchen fasergekoppelten Raman-Spektrometer-Systemen wird vor die Raman-Streulicht-Abnahmefaser meist ein Langpass- oder Notch-Filter platziert, der die Anregungswellenlänge blockiert, das frequenzverschobene Raman-

Streulicht jedoch weitestgehend passieren lässt. So kann die Entstehung eines unerwünschten Quarz-Raman-Signals in der Streulicht-Abnahmefaser fast vollständig verhindert werden.

Bei dem hier beschriebenen Aufbau muss ein solcher Kantenfilter in das T-Stück direkt vor der Raman-Abnahmefaser integriert werden. Aufgrund der geringen Dimensionen und des daraus resultierenden Platzmangels wurde der optische Filter direkt auf die planpolierte Stirnfläche des Lichtwellenleiters aufgebracht. Die Abbildung 7-23 zeigt das Funktionsprinzip eines mit einem Kantenfilter beschichteten Lichtwellenleiters zur Raman-Streulicht-Abnahme, der den zuvor unbeschichteten Lichtwellenleiter im Edelstahl T-Stück ersetzt.

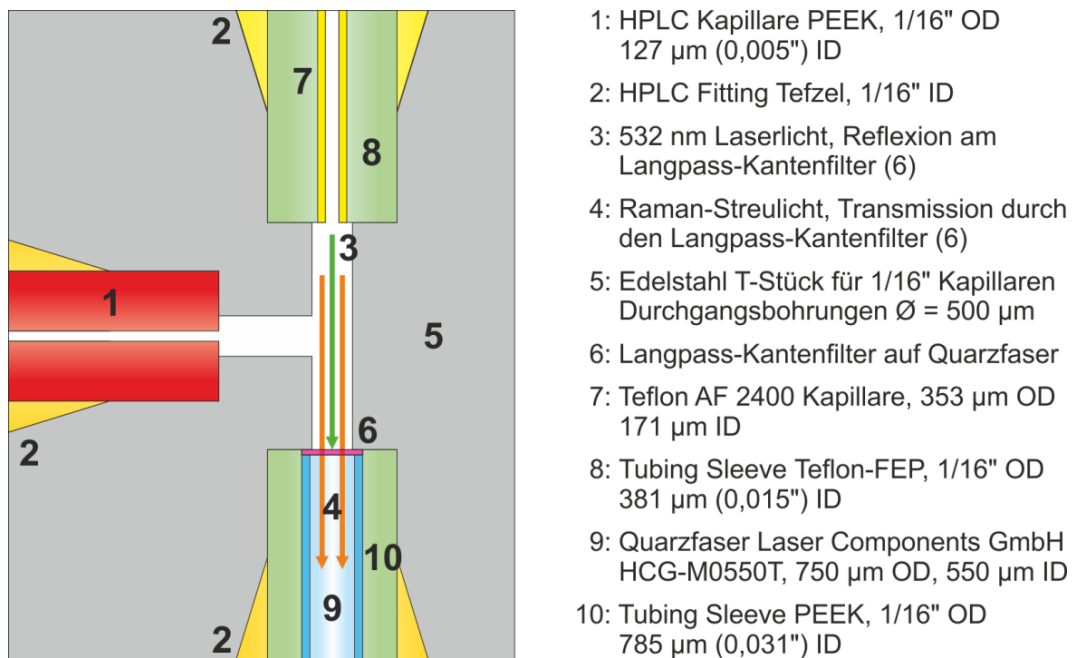


Abbildung 7-23: Abnahme des vorwärts gerichteten Raman-Streulichtes mittels einer mit Langpass-Kantenfilter vergüteten Glasfaser.

Die Laseranregungswellenlänge mit 532 nm (3) wird an der Filterschicht (6) geblockt, bzw. reflektiert, während das Raman-Streulicht (4) nahezu ungehindert passiert und vom Lichtwellenleiter (9) in Richtung Monochromator/Detektor-Einheit transportiert wird.

Mit der Entwicklung dieses speziellen Kantenfilters wurde die Firma *Laser Components GmbH* beauftragt. Zur Fertigung wurde die Stirnfläche des Lichtwellenleiters laut Herstellerangabe mit mehr als 40 übereinander liegenden Interferenzschichten bedampft. Die Abbildung 7-24 zeigt zwei Nahaufnahmen des hergestellten Langpass-Kantenfilters auf der Stirnfläche des freistehenden Faserendes einer HCG-M0550T Quarzfasers.

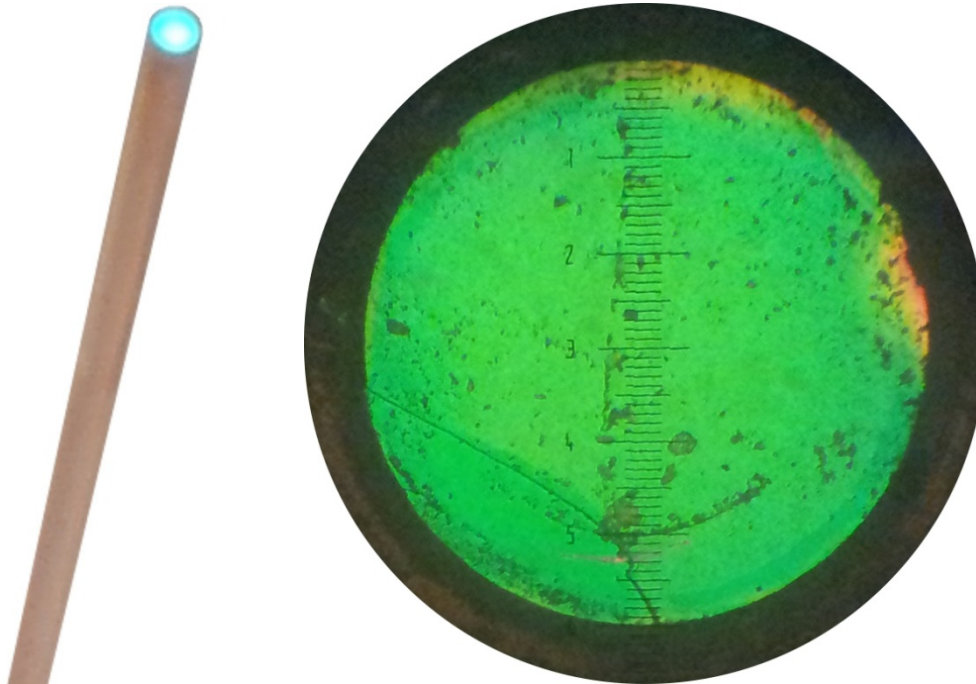


Abbildung 7-24: Links: Freistehendes Faserende einer HCG-M0550T der Firma *Laser Components GmbH* mit Langpass-Kantenfilter beschichteter Stirnfläche (Fasermantel *nicht* abgezogen), Rechts: Mikroskop-Aufnahme der beschichteten Stirnfläche von oben (100-fache Vergrößerung).

Die von *Laser Components* berechneten Spezifikationen sahen eine Reflexion der Laserwellenlänge bei 532 nm von mehr als 99 % vor. Ab 550 nm wurde eine Transmission von ca. 50 % erwartet und zwischen 560 und 950 nm sollte die durchschnittliche Transmission größer 95 % betragen. Eine entsprechende Transmissionskurve der Faserbeschichtung wurde dem Angebot von *Laser Components* beigelegt und kann der Abbildung 7-25 entnommen werden.

Die tatsächlich erzielten Ergebnisse der Faserbeschichtung sind in der Abbildung 7-26 anhand zweier Transmissionskurven dargestellt. Bei dem schwarzen Graphen handelt es sich um die Beschichtung einer SMA-Stecker-gefassten Glasfaser, welche als Referenz dient. Die Lage der optischen Kante ist in diesem Fall recht gut getroffen – die bei 550 nm angestrebte Transmission von 50 % liegt bei 547 nm.

Bezogen auf die Anregungswellenlänge von 532 nm können Raman-Spektren daher ab 515 cm^{-1} mit einer Transmission von 50 % erhalten werden. Laut Angebot soll die Transmission zwischen 560 nm (940 rel. cm^{-1}) und 950 nm im Durchschnitt mehr als 95 % betragen. Tatsächlich wurde ab 570 nm eine Transmission von über 90 % gemessen, die allerdings ab 618 nm unter 80 % und ab 641 nm sogar unter 70 % fällt. Des Weiteren sollte laut Angebot die Laserwellenlänge von 532 nm mit über 99 % reflektiert werden – in Realität werden vom Kantenfilter etwa 95 % des Laserlichts reflektiert.

Pos 1, R>99% @ 532nm; T>95% average 560nm -950nm; AOI 0°; HIGH POWER IAD Coating on fiber

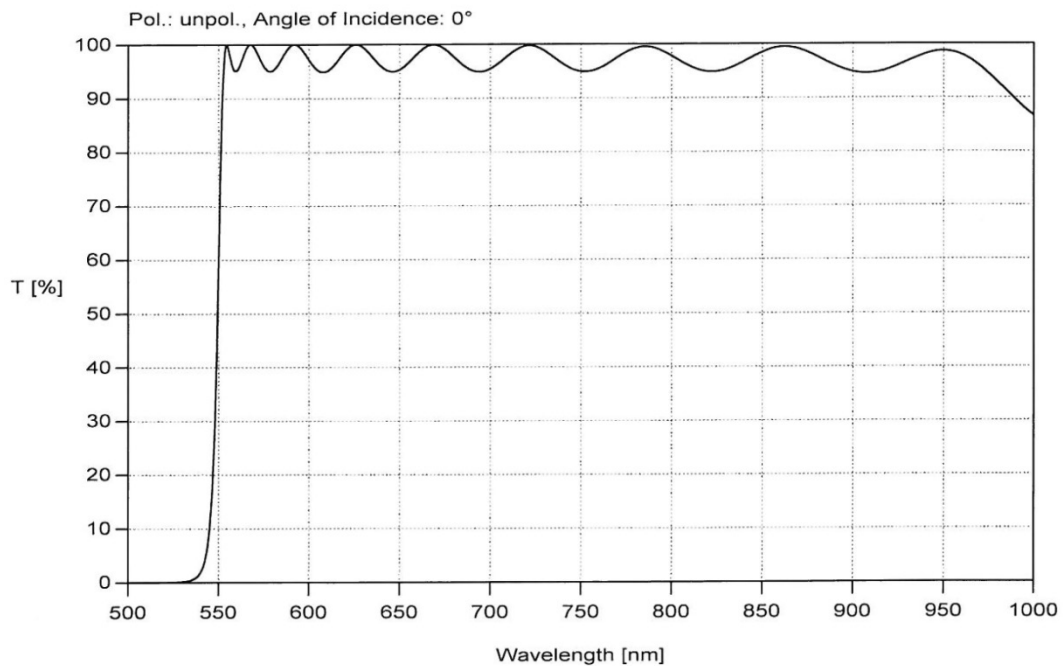


Abbildung 7-25: Transmissionskurve der Faserbeschichtung laut Berechnung von Laser Components.

Die rote Kurve zeigt die Transmission einer ungefassten, frei stehenden Glasfaser, wie sie für die Adaption an die Raman-Durchflusszelle benötigt wird. Im Vergleich zum SMA-gefassten Faserende ist die Lage der optischen Kante um 38 nm in Richtung höherer Wellenlängen verschoben – eine Transmission von 50 % wird erst ab 585 nm erreicht. Unter diesen Umständen können Raman-Spektren mit 50 % Transmission erst ab 1703 cm^{-1} aufgenommen werden. Eine Transmission von 90 % wird ab 590 nm, entsprechend 1848 cm^{-1} , beobachtet.

Der Lichtwellenleiter ist daher für den Einsatz im Raman-Detektor unbrauchbar, da ein wichtiger Frequenzbereich des Raman-Streulichts blockiert wird und nicht zur Strukturaufklärung herangezogen werden kann. Der ungenutzte Spektralbereich umfasst in die ersten 1700 cm^{-1} im Raman-Spektrum.

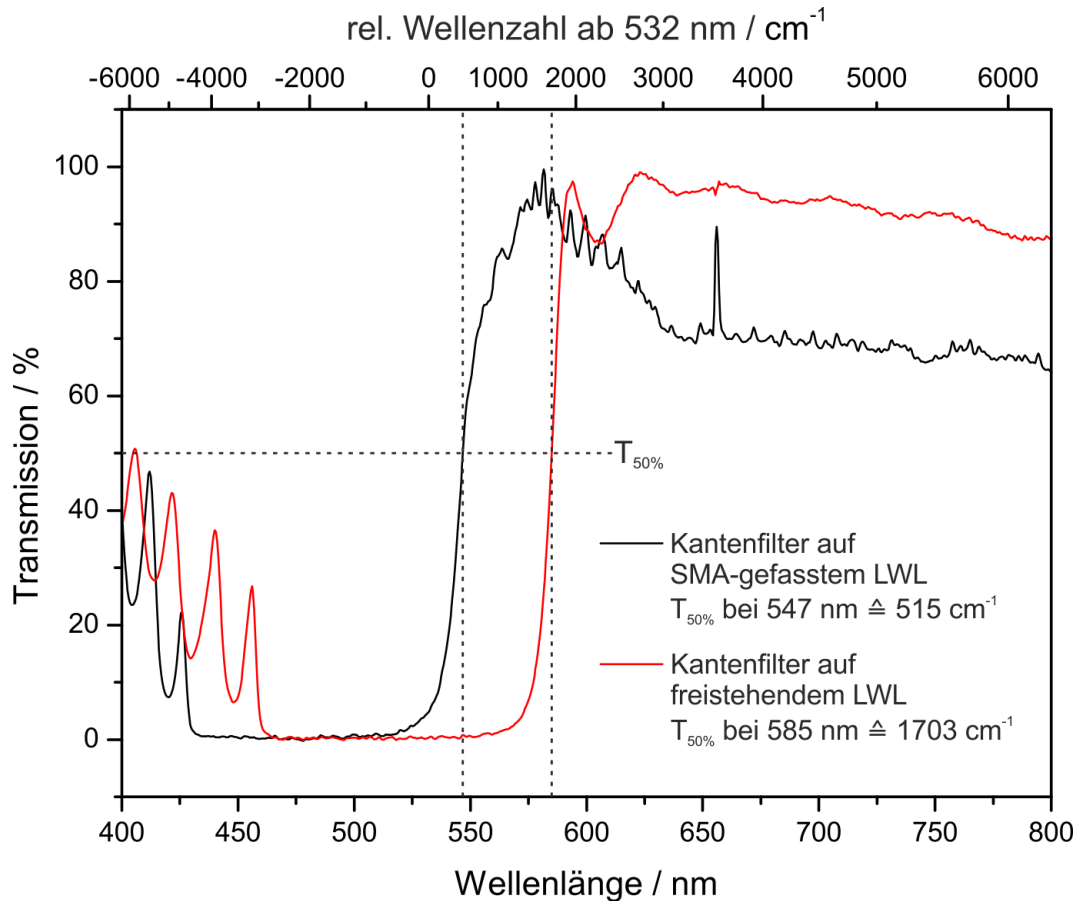


Abbildung 7-26: Transmissionsspektren der mit Kantenfilter beschichteten Lichtwellenleiter zur Raman-Streulicht-Abnahme.

Der Fehler konnte später auf eine Dejustage des Beschichtungswinkels der freistehenden Faserstirnflächen zurückgeführt werden. Aufgrund des hohen technischen Aufwands für die Entwicklung einer geeigneten Faserhalterung und den damit verbundenen Einrichtungskosten der Beschichtungsanlage, wurde eine weitere Optimierung hinsichtlich der Lage der optischen Kante nicht durchgeführt.

7.3.2.8 Integration eines zusätzlichen Kantenfilters in den Monochromator

Da das Konzept zur Beschichtung des Auskoppel-Lichtwellenleiters nicht realisiert werden konnte, wurde zur Unterdrückung der beiden prägnanten Glas-Raman-Signale bei 450 und 491 cm^{-1} , sowie der Rayleigh-Streuung bei 0 cm^{-1} , ein Langpass-Kantenfilter (siehe Anhang, Kapitel 11.2) hinter den Auskoppel-Lichtwellenleiter platziert. Die Adaption des Kantenfilters erfolgte innerhalb des Monochromators zwischen Eingangsobjektiv und Notch-Filter. Der gewählte

Langpassfilter blockiert unterhalb von 550 nm mit einer optischen Dichte von 4 und lässt oberhalb von 550 nm (ab 590 rel. cm^{-1}) etwa 99 % des Raman-Streulichts passieren. Die Abbildung 7-27 zeigt das Raman-Signal des Auskoppel-Lichtwellenleiters vor und nach Integration des Langpass-Kantenfilters in den Monochromator.

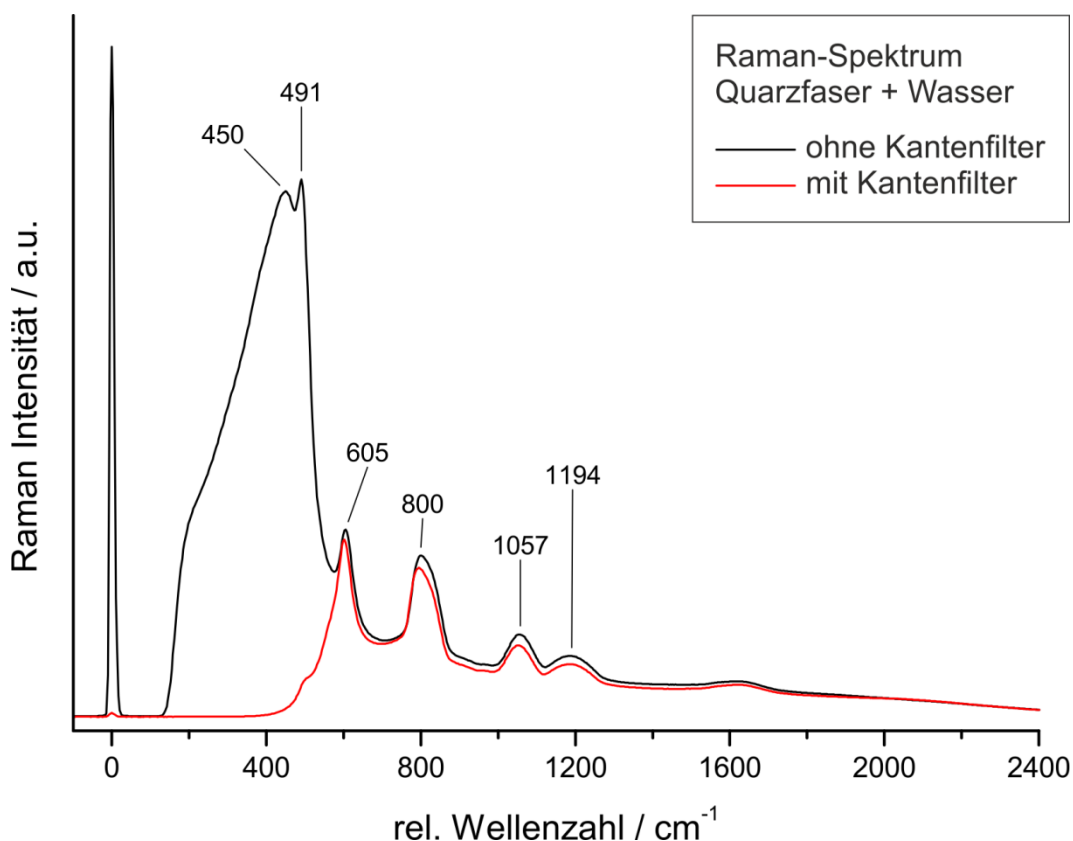


Abbildung 7-27: Raman-Signal des Auskoppel-Lichtwellenleiters; schwarz: ohne zusätzlichen Kantenfilter im Monochromator, rot: mit zusätzlichem Kantenfilter im Monochromator. Laserleistung: 50 mW, Detektionszeit: 1s.

Der schwarze Kurvenverlauf zeigt dabei das ungefilterte Raman-Spektrum mit der Rayleigh- / Laserlinie bei 0 cm^{-1} sowie den beiden stark ausgeprägten Raman-Banden bei 450 und 491 cm^{-1} . Nach Einbau des Kantenfilters (roter Kurvenverlauf) sind diese Signale fast vollständig unterdrückt und die Bande bei 491 cm^{-1} ist nur noch als schwache Schulter im Raman-Spektrum erkennbar.

Mit der Integration des Kantenfilters wurde eine Kompromisslösung in Kauf genommen. Einerseits können so die stark ausgeprägten Untergrundsignale aus dem Spektrum entfernt werden, so dass jetzt wesentlich mehr Laserleistung und Belichtungszeit genutzt werden kann, bevor der CCD-Chip der Detektor-Kamera in die Sättigung läuft. Die Maßnahme führt also zu einer Steigerung der Empfindlichkeit. Andererseits wird ein Informationsverlust hingenommen, da die ersten 590 cm^{-1} im Raman-Spektrum nicht mehr für die spektrale Analyse der Zielsubstanzen zur Verfügung stehen.

7.4 Vermessung eines Coffein-Peaks zur Bestimmung der Nachweisgrenze im Durchflussverfahren

In diesem Kapitel wird die Nachweisgrenze des entwickelten Raman-Detektors für eine wässrige Coffeinelösung bestimmt. Hinsichtlich der späteren Kopplung mit der Hochtemperatur-HPLC werden die Raman-spektroskopischen Messungen im Durchflussverfahren durchgeführt und ein Coffein-Peak, ähnlich wie bei einer chromatographischen Trennung, generiert. Die zur Verfügung stehende Messzeit wird dabei durch Peak-Breite und Flussrate bestimmt. Den experimentellen Aufbau zeigt die Abbildung 7-28.

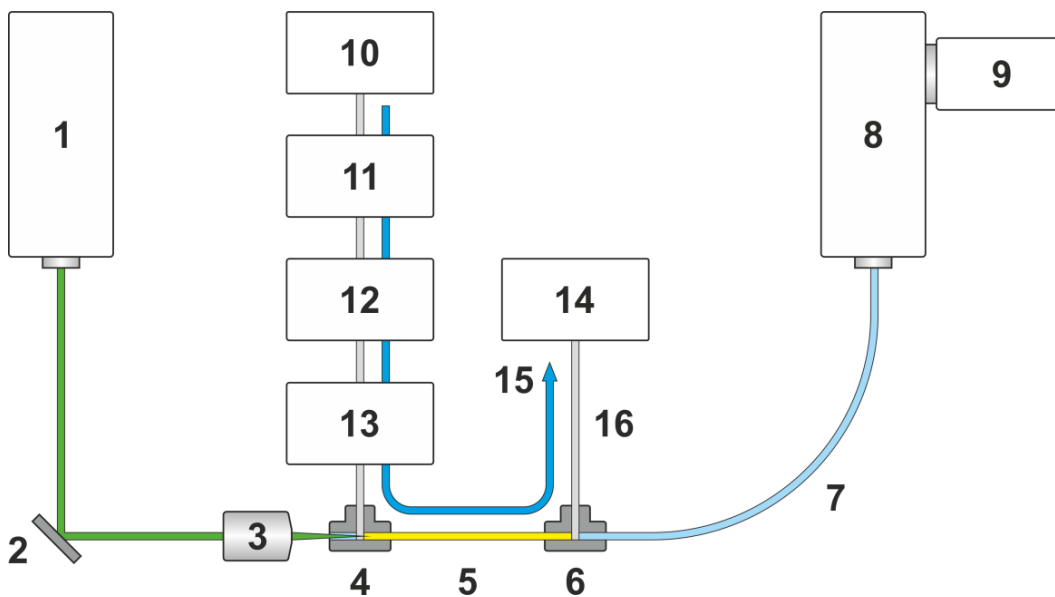


Abbildung 7-28: Experimenteller Aufbau für die Raman-spektroskopische Vermessung eines Coffein-Peaks zur Bestimmung der Nachweisgrenze im Durchflussverfahren.

1: Diodengepumpter Festkörperlaser (Newport / Spectra-Physics Millennia Pro 2s, 532 nm, 2 Watt), 2: Laserspiegel, 3: Mikroskopobjektiv (Nikon CF IC EPI Plan SLWD 10XA), 4: Edelstahl T-Stück 1 mit Fenster (Upchurch Scientific®/ IDEX Health & Science LLC U-428 Stainless Steel Tee), 5: Flüssigkern-Lichtwellenleiter (Random Technologies Teflon AF 2400 Kapillare, $l = 40$ cm, ID = 171 μm , OD = 353 μm), 6: Edelstahl T-Stück 2, 7: Lichtwellenleiter (Laser Components HCG-M0550T, $l = 75$ cm, ID = 550 μm , OD = 750 μm), 8: Monochromator (Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VPT System™), 9: CCD-Detektor (Andor Technology Newton DU920P-BV), 10: HPLC-Pumpe (Shimadzu LC-10ADvp), 11: Injektor (Rheodyne® 7725i), 12: Säulenofen (Jetstream II Plus) mit HPLC-Säule (ZirChrom®-PBD, 150 \times 3,0 mm; 5 μm), 13: UV/Vis Diodenarray-Detektor (Thermo TSP SpectraSYSTEM UV6000LP), 14: Abfallbehälter, 15: Flussrichtung der mobilen Phase, 16: PEEK Kapillaren (ID = 127 μm , OD = 1/16").

Kern des Raman-Detektors bildet die Raman-Durchflusszelle mit Flüssigkern-Lichtwellenleiter (4-6). Eine Detailzeichnung kann der Abbildung 7-20 aus Kapitel 7.3.2.5 entnommen werden. Der Transport der wässrigen mobilen Phase durch das Kapillarsystem erfolgt mittels HPLC-Pumpe (10). Zwischen Pumpe und Raman-Durchflusszelle werden ein Handinjektor (11), ein Säulenofen mit HPLC-Säule (12) sowie ein UV/Vis-Diodenarray-Detektor (13) geschaltet. Zur Verbindung der einzelnen Komponenten werden PEEK-Kapillaren (16) mit

127 μm Innendurchmesser verwendet. Die mobile Phase gelangt über das T-Stück 1 (4) in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter (5) und verlässt diesen über das T-Stück 2 (6) in Richtung Abfallbehälter (14). Das Laserlicht (grüne Linie) wird mittels Mikroskopobjektiv (3) über das T-Stück 1 in den Flüssigkern-Lichtwellenleiter fokussiert. Am anderen Ende wird das Raman-Streulicht über das T-Stück 2 mit einem Lichtwellenleiter (7) abgenommen und zur spektralen Analyse zur Monochromator/Detektor-Einheit (8, 9) geleitet. Die Abbildung 7-29 zeigt eine Fotografie des beschriebenen Laboraufbaus.

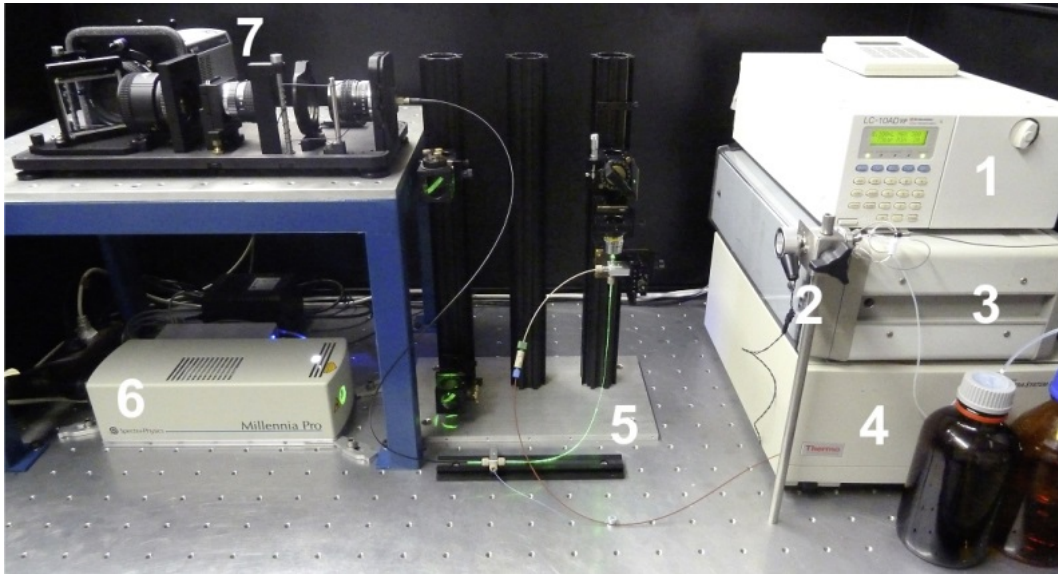


Abbildung 7-29: Laborfotographie des experimentellen Aufbaus zur Raman-spektroskopischen Vermessung eines Coffein-Peaks im Durchflussverfahren (die Abdeckung des Monochromators ist entfernt).

1: HPLC-Pumpe (Shimadzu LC-10ADvp), 2: Injektor (Rheodyne® 7725i), 3: Säulenofen (Jetstream II Plus) mit HPLC-Säule (ZirChrom®-PBD, 150 × 3,0 mm; 5 μm), 4: UV/Vis Diodenarray-Detektor (Thermo TSP SpectraSYSTEM UV6000LP), 5: Flüssigkern-Lichtwellenleiter (Random Technologies Teflon AF 2400 Kapillare, l = 40 cm, ID = 171 μm , OD = 353 μm), 6: Diodengepumpter Festkörperlaser (Newport / Spectra-Physics Millennia Pro 2s, 532 nm, 2 Watt), 7: Monochromator/Detektor-Einheit (Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VPT System™ & Andor Technology Newton DU920P-BV).

Zur Bestimmung der Raman-spektroskopischen Nachweisgrenze wurden jeweils 5 μL unterschiedlich konzentrierter Stammlösungen mittels Handinjektor in den Fluss injiziert. Die Flussrate der wässrigen mobilen Phase wurde auf 1 mL min^{-1} eingestellt. Die zeitliche Verfolgung und Charakterisierung des Coffein-Peak-Profiles zur Bestimmung der durchschnittlichen Peak-Konzentration (Definition Peak-Konzentration: siehe Kapitel 5.1) erfolgte mit dem Diodenarray-Detektor anhand des UV-Absorptionssignals bei 254 nm. Die Abbildung 7-30 zeigt exemplarisch das ausgelesene Coffein-Signal, das bei einer Konzentration der Stammlösung von 200 mg L^{-1} aufgenommen wurde.

Das Coffein eluiert zwischen 2,2 und 2,6 Minuten in einem Zeitraum von 24 Sekunden von der Chromatographie-Säule. Das Peak-Maximum liegt bei 2,39 Minuten. Bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} ergibt sich daraus ein Peak-Volumen von 0,4 mL. Mit der auf die Säule aufgegebenen Gesamtmenge von $1 \mu\text{g}$ Coffein (ermittelt aus der Konzentration der Stammlösung und dem Injektionsvolumen) lässt sich eine durchschnittliche Peak-Konzentration von $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ berechnen.

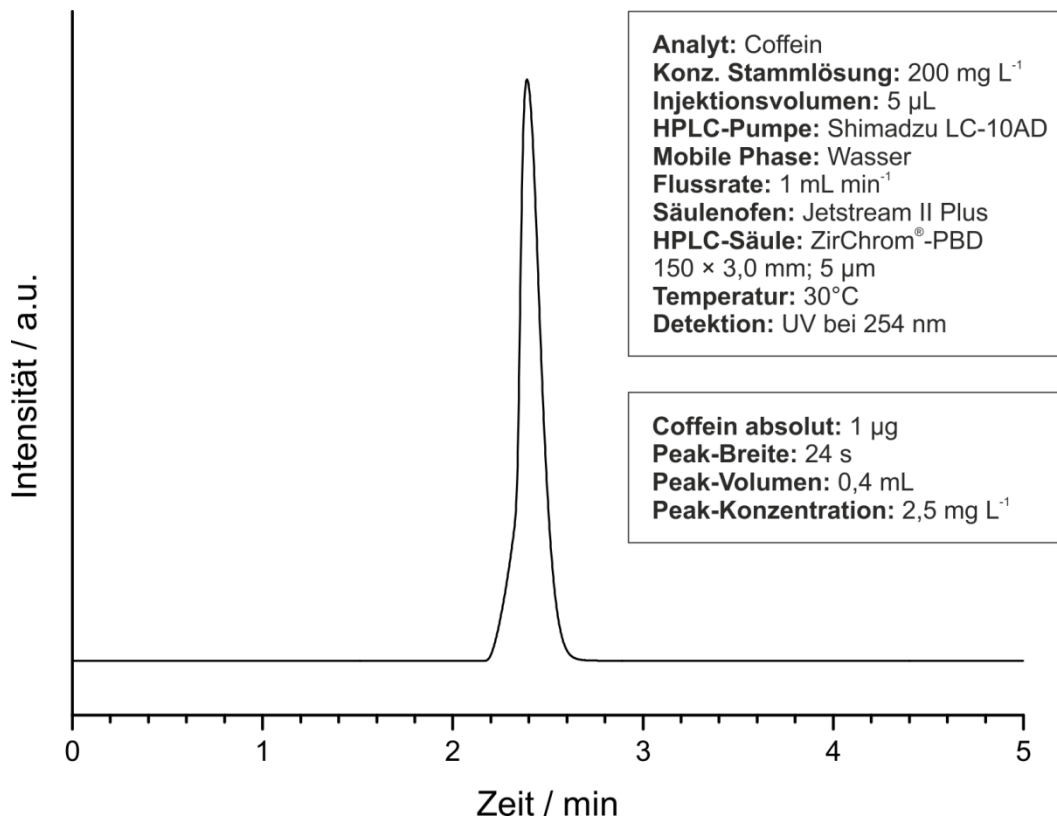


Abbildung 7-30: Zeitliche Verfolgung des Coffein-Signals bei 254 nm mittels UV/Vis-Diodenarray-Detektor.

Unmittelbar hinter dem Diodenarray-Detektor erfolgt die Raman-Detektion im Flüssigkern-Lichtwellenleiter. Hinsichtlich der ermittelten Coffein-Peak-Breite von 24 Sekunden wurde die Belichtungszeit des Raman-CCD-Detektors auf 10 Sekunden eingestellt und über die Dauer der chromatographischen Trennung (5 Minuten) hintereinander 30 Raman-Spektren aufgenommen. Dadurch wird gewährleistet, dass sich für mindestens eine Raman-Messung das Coffein über die gesamten 10 Sekunden im Flüssigkern-Lichtwellenleiter befindet.

Bei den aufgenommenen Coffein-Raman-Spektren handelt es sich um untergrundkorrigierte Raman-Spektren, die gegen das Raman-Spektrum der reinen mobilen Phase, in diesem Fall Wasser, differenziert worden sind. Die Subtraktion der Spektren erfolgte dabei direkt im CCD-Detektor. Das besonders starke Untergrund-Raman-Signal von Quarzglas, das von dem Abnahme-Lichtwellenleiter erzeugt wird, kann allerdings nie vollständig korrigiert werden. Dies ist auf eine Brechungsindexerhöhung der mobilen Phase zurückzuführen,

die aus den anteiligen Analyt-Molekülen resultiert. Während sich der Coffein-Peak durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter bewegt, kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des Akzeptanzwinkels der Totalreflexion, der im Peak-Maximum zu einem gesteigerten Lichttransport durch den Flüssigkern-Lichtwellenleiter führt. Aus diesem Grund wurden die Differenz-Raman-Spektren nachträglich einer softwarebasierten Basislinienkorrektur (*OriginPro 8.5G*) unterzogen. Die Abbildung 7-31 zeigt exemplarisch das erhaltene Online Raman-Spektrum von Coffein bei einer Peak-Konzentration von 25 mg L^{-1} .

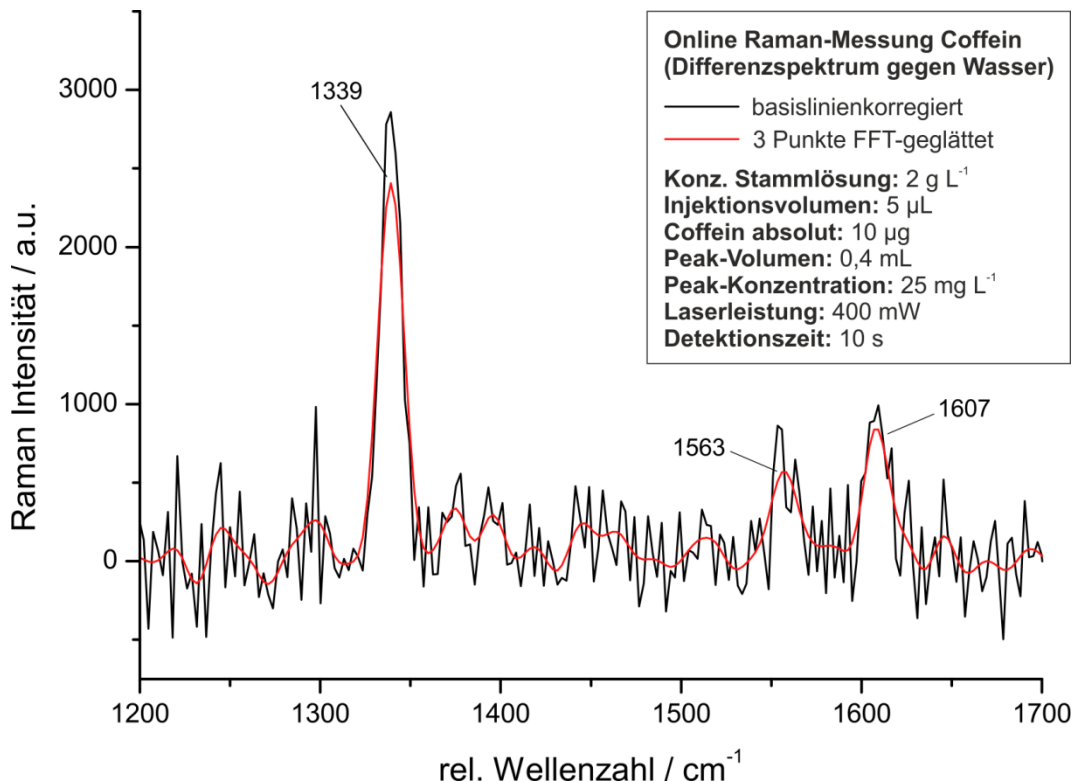


Abbildung 7-31: Online Raman-Messung von Coffein in Wasser bei einer Peak-Konzentration von 25 mg L^{-1} . Der schwarze Kurvenverlauf zeigt das basislinienkorrigierte Differenz-Raman-Spektrum von Coffein, bei dem roten Kurvenverlauf wurde eine 3 Punkte Glättung mittels schneller Fourier-Transformation (FFT: Fast Fourier Transform) durchgeführt (*OriginPro 8.5G*). In dem dargestellten Spektralbereich zwischen 1200 und 1700 cm^{-1} können drei Raman-Signale des Coffeins bei 1339 , 1563 und 1607 cm^{-1} identifiziert werden. Der Frequenzbereich kleiner 1200 cm^{-1} ist aufgrund der starken Untergrund-Raman-Signale des Abnahme-Lichtwellenleiters nicht zugänglich und wurde daher ausgeblendet.

Nach der beschriebenen Vorgehensweise zur Bestimmung der Peak-Konzentration mittels Diodenarray-Detektor und der Auswertung der Differenz-Raman-Spektren durch eine softwarebasierte Basislinienkorrektur sowie FFT-Glättung, wurde die Detektionsgrenze für Coffein anhand der prägnanten Raman-Bande bei 1339 cm^{-1} bestimmt. Die Messergebnisse sind in der Abbildung 7-32 dargestellt.

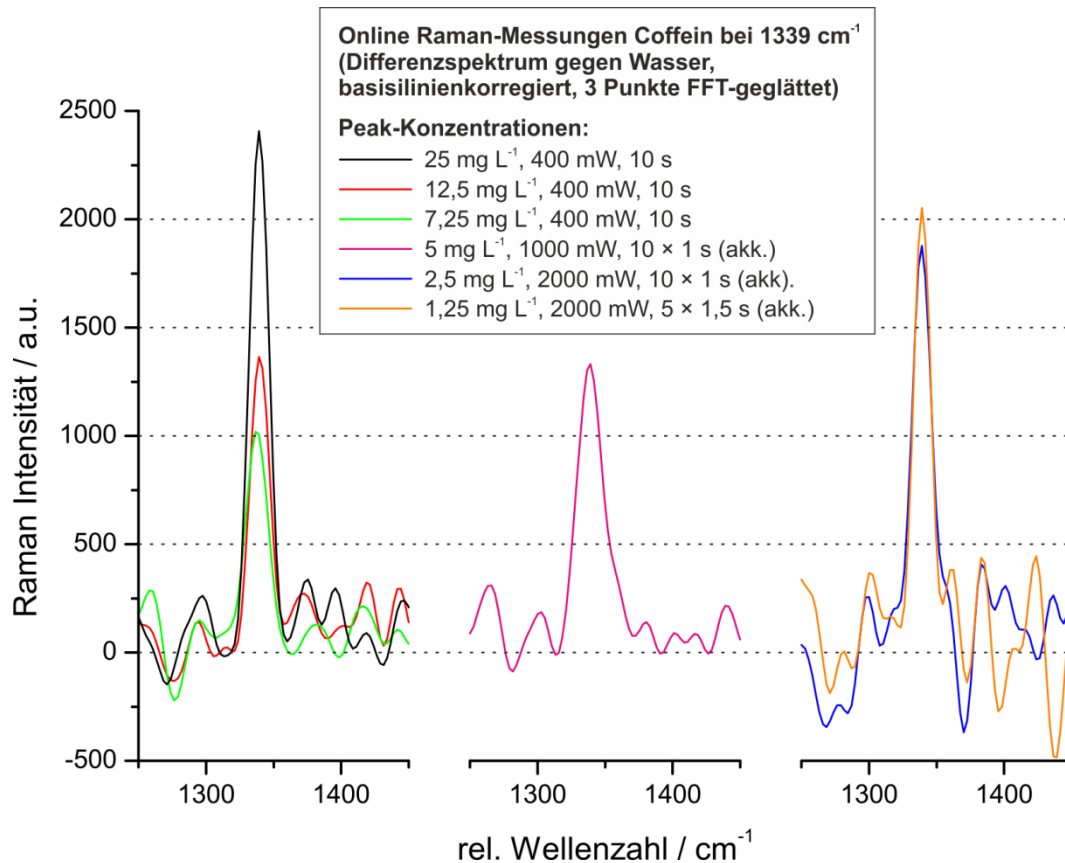


Abbildung 7-32: Online Raman-Messungen von Coffein bei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen, Verfolgung des prägnanten Raman-Signals bei 1339 cm^{-1} .

Die linke Seite der Abbildung (schwarzer, roter und grüner Kurvenverlauf) zeigt die erfassten Coffein-Signale bei 1339 cm^{-1} für Peak-Konzentrationen von 25, 12,5 und $7,25\text{ mg L}^{-1}$. Dabei betrug die Laserleistung 400 mW und die Belichtungszeit des CCD-Detektors wurde auf 10 Sekunden eingestellt. In der Mitte der Abbildung (rosa Kurvenverlauf) wurde eine Peak-Konzentration von 5 mg L^{-1} vermessen. Die Laserleistung von 400 mW reichte dazu allerdings nicht mehr aus und wurde auf 1000 mW erhöht. Dies führte dazu, dass der CCD-Chip der Detektor-Kamera bei 10 Sekunden Belichtungszeit gesättigt wurde. Daher wurden bei Laserleistungen $> 1000\text{ mW}$ mehrere Spektren mit kürzeren Belichtungszeiten zu einem Gesamtspektrum akkumuliert, in diesem Fall 10 Spektren a 1 Sekunde. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Messzeit für ein akkumuliertes Raman-Spektrum auch weiterhin nicht länger als 10 Sekunden betrug. Die rechte Seite der Abbildung 7-32 (blauer und oranger Kurvenverlauf)

zeigt die Coffein-Signale, die bei Peak-Konzentrationen von 2,5 und 1,25 mg L⁻¹ aufgenommen wurden. Bei diesen Messungen wurde die maximal zur Verfügung stehende Laserleistung von 2000 mW ausgenutzt. Bei einer Peak-Konzentration von 2,5 mg L⁻¹ wurden jeweils 10 Spektren a 1 Sekunde akkumuliert. Das beste Ergebnis konnte schließlich mit einer Einstellung von 5 Spektren a 1,5 Sekunden erzielt werden. Die Detektionsgrenze des Raman-Detektors wurde für Coffein auf 1,25 mg L⁻¹ bestimmt – das Signal zu Rausch Verhältnis lag knapp über 2:1.

In der folgenden Tabelle sind die Messergebnisse zur Bestimmung der Online-Detektionsgrenze des Raman-Detektors für Coffein anhand wichtiger Kenndaten noch einmal zusammengefasst dargestellt:

Tabelle 7-2: Messergebnisse zur Bestimmung der Online-Detektionsgrenze des Raman-Detektors am Beispiel von Coffein.

Analyt	Coffein
Injektionsvolumen	5 µL
Mobile Phase	Wasser
Flussrate	1 mL min ⁻¹
Peak-Volumen	0,4 mL

Messung Nr.	Konz. Stammlsg.	Coffein absolut	Peak-Konzentration	Laserleistung	Raman-Messzeit	SRV *
1	2 g L ⁻¹	10 µg	25 mg L ⁻¹	400 mW	10 s	10:1
2	1 g L ⁻¹	5 µg	12,5 mg L ⁻¹	400 mW	10 s	6:1
3	0,5 g L ⁻¹	2,5 µg	7,25 mg L ⁻¹	400 mW	10 s	4:1
4	0,4 g L ⁻¹	2 µg	5 mg L ⁻¹	1000 mW	10 x 1 s	4:1
5	0,2 g L ⁻¹	1 µg	2,5 mg L ⁻¹	2000 mW	10 x 1 s	3:1
6	0,1 g L ⁻¹	0,5 µg	1,25 mg L ⁻¹	2000 mW	5 x 1,5 s	2:1

* SRV: Signal-Rausch-Verhältnis

Betrachtet man die Messungen Nr. 5 und 6, erscheint es auf den ersten Blick nicht nachvollziehbar, dass mit einer geringeren Belichtungszeit von insgesamt 7,5 Sekunden für das akkumulierte Spektrum (anstelle von 10 Sekunden) eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht wurde. Allerdings muss beachtet werden, dass die Raman-Messungen zeitlich nicht genau auf die Peak-Maxima abgestimmt wurden. Aus diesem Grund kann den gemessenen Spektren nicht immer ein linearer Zusammenhang zwischen Laserleistung und Raman-Intensität entnommen werden. Kürzere Messzeiten erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass eine Raman-Messung genau dann stattfindet, während sich das Peak-Maximum und damit hohe Analyt-Konzentrationen im Flüssigkern-Lichtwellenleiter befinden. Im Idealfall müssten die Raman-Messzeiten immer an die jeweiligen Peak-Breiten, sprich an die Qualität der chromatographischen Trennung, angepasst werden.

7.5 Integration des Raman-Detektors in die HT-HPLC/irMS-Kopplung

In einem finalen Schritt wurde der entwickelte Raman-Detektor an das Institut für Instrumentelle Analytische Chemie (Leitung: Prof. Dr. Thorsten C. Schmidt) der Universität Duisburg-Essen überführt, und in eine bestehende HT-HPLC/irMS-Kopplung integriert. Eine schematische Darstellung des experimentellen Gesamtaufbaus zeigt die Abbildung 7-33.

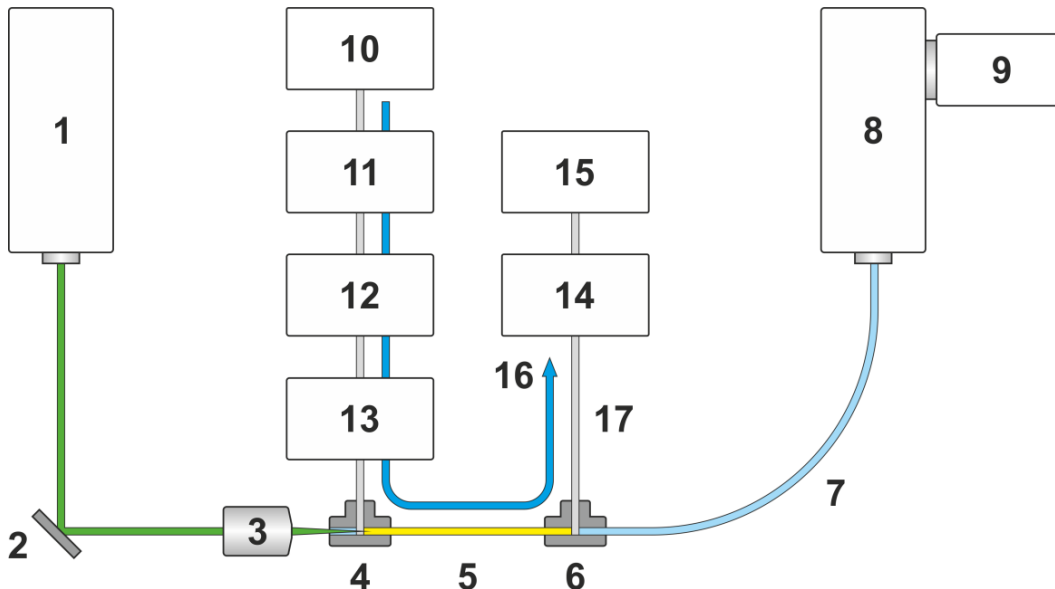


Abbildung 7-33: Experimenteller Gesamtaufbau zur Kopplung von Hochtemperatur-HPLC, Raman-Detektion und Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie.

1: Diodengepumpter Festkörperlaser (Newport / Spectra-Physics Millennia Pro 2s, 532 nm, 2 Watt), 2: Laserspiegel, 3: Mikroskopobjektiv (Nikon CF IC EPI Plan SLWD 10XA), 4: Edelstahl T-Stück 1 mit Fenster (Upchurch Scientific®/ IDEX Health & Science LLC U-428 Stainless Steel Tee), 5: Flüssigkern-Lichtwellenleiter (Random Technologies Teflon AF 2400 Kapillare, $l = 40$ cm, $ID = 171$ μm , $OD = 353$ μm), 6: Edelstahl T-Stück 2, 7: Lichtwellenleiter (Laser Components HCG-M0550T, $l = 75$ cm, $ID = 550$ μm , $OD = 750$ μm), 8: Monochromator (Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VPT System™), 9: CCD-Detektor (Andor Technology Newton DU920P-BV), 10: HPLC-Pumpe (Flux Rheos Allegro bzw. Agilent 1200 SL), 11: Autosampler (CTC Analytics HTC PAL), 12: Säulenofen (SIM HT-HPLC 200) mit HPLC-Säule (Waters XBridge BEH C_{18} , $100 \times 2,1$ mm; $3,5$ μm bzw. Waters XBridge BEH C_4 , $50 \times 2,1$ mm; $3,5$ μm), 13: UV/Vis Diodenarray-Detektor (Thermo Scientific Accela™ UV/Vis Detector), 14: Interface mit Oxidationsreaktor (Thermo Scientific LC Isolink™ Interface), 15: irMS (Thermo Scientific DELTA V™ Isotope Ratio Mass Spectrometer) 16: Flussrichtung der mobilen Phase, 17: PEEK Kapillaren ($ID = 127$ μm , $OD = 1/16''$).

Der Raman-spektroskopische Teil des Aufbaus (1-9) entspricht weiterhin den Ausführungen nach Kapitel 7.4. Ersetzt bzw. neu hinzugekommen sind die Gerätekomponenten der Hochtemperatur-HPLC sowie der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (10-15). Die Abbildung 7-34 zeigt eine Fotografie des Gesamtaufbaus der Raman-spektroskopischen Messanordnung, wie sie zum Zeitpunkt der Kopplung an der Universität Duisburg-Essen aufgebaut war.

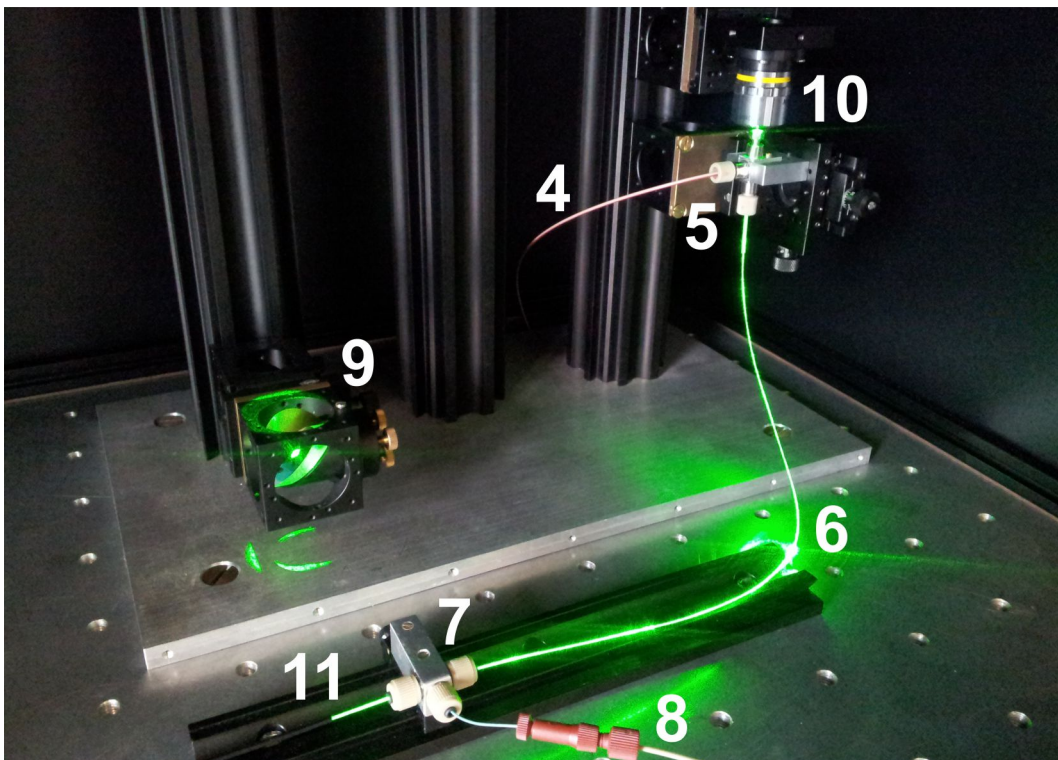
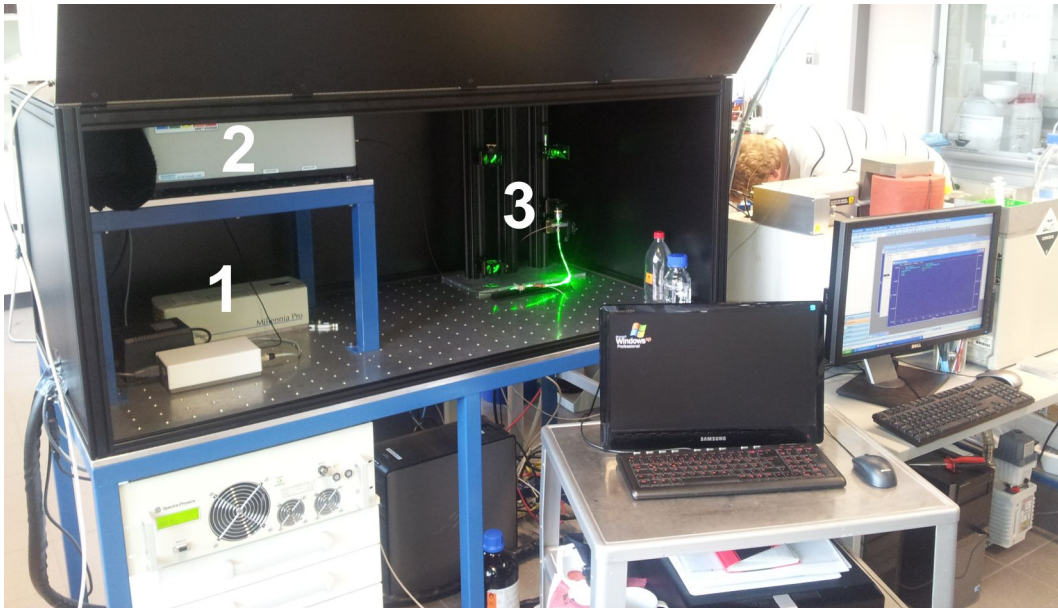


Abbildung 7-34: Photographien des Raman-Detektors im Laboraufbau zur Kopplung von Hochtemperatur-HPLC, Raman-Detektion und Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie.

1: Diodengepumpter Festkörperlaser (Newport / Spectra-Physics Millennia Pro 2s, 532 nm, 2 Watt), 2: Monochromator (Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VPT SystemTM), 3: Raman-Durchflusszelle
4: PEEK Kapillare (ID = 127 μm , OD = 1/16"), zur Zuführung der mobilen Phase von der HT-HPLC, 5: Edelstahl T-Stück 1 mit Fenster (Upchurch Scientific®/ IDEX Health & Science LLC U-428 Stainless Steel Tee), 6: Flüssigkern-Lichtwellenleiter (Random Technologies Teflon AF 2400 Kapillare, l = 40 cm, ID = 171 μm , OD = 353 μm), 7: Edelstahl T-Stück 2, 8: PEEK Kapillare zur Abführung der mobilen Phase in Richtung irMS, 9: Laserspiegel, 10: Mikroskopobjektiv (Nikon CF IC EPI Plan SLWD 10XA), 11: Lichtwellenleiter (Laser Components HCG-M0550T, l = 75 cm, ID = 550 μm , OD = 750 μm).

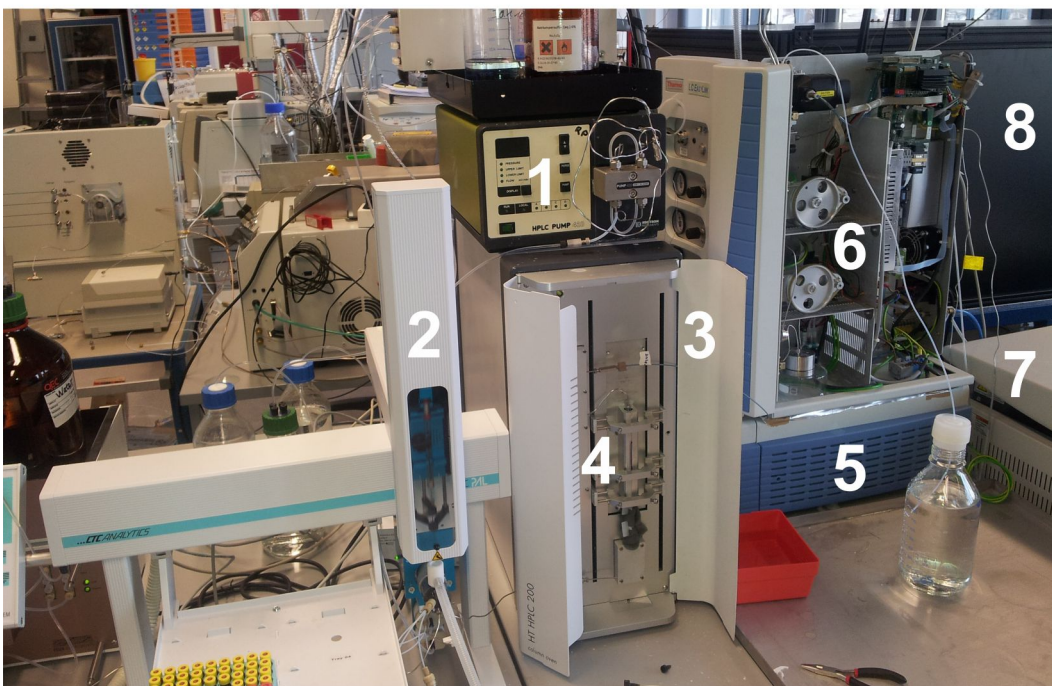
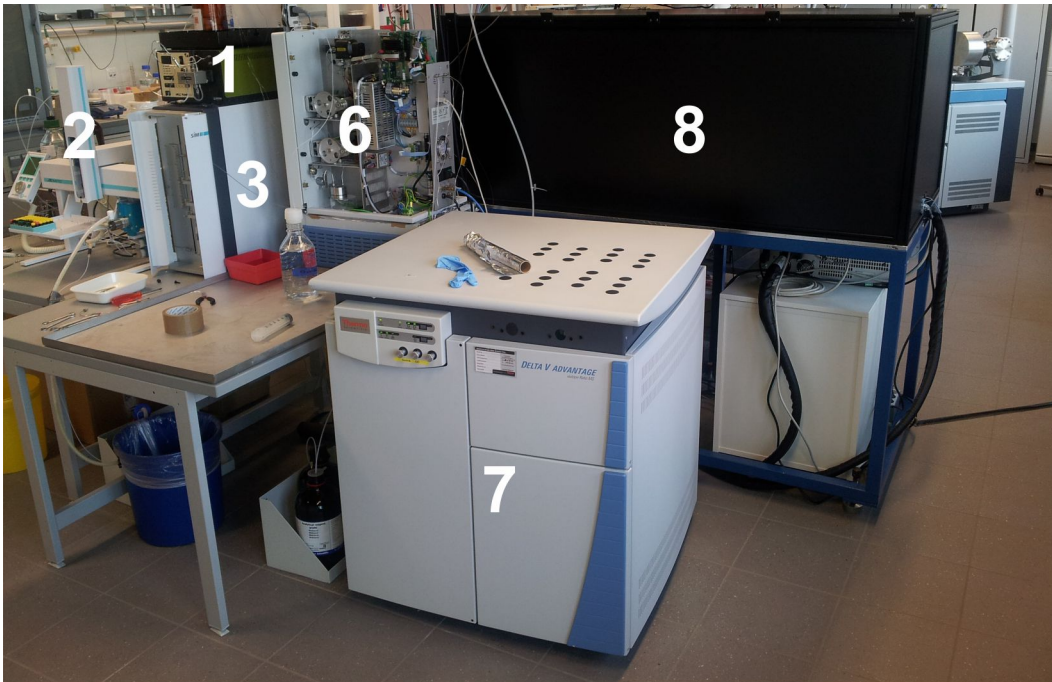


Abbildung 7-35: Photographien der HT-HPLC/irMS-Kopplung im Laboraufbau zur Kopplung von Hochtemperatur-HPLC, Raman-Detektion und Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie.

1: HPLC-Pumpe (hier dargestellt eine Kontron HPLC Pump 420; bei den experimentellen Messungen wurde diese durch eine Flux Rheos Allegro bzw. Agilent 1200 SL ersetzt), 2: Autosampler (CTC Analytics HTC PAL), 3: Säulenofen (SIM HT-HPLC 200), 4: HPLC-Säule (Waters XBridge BEH C₁₈, 100 × 2,1 mm; 3,5 µm bzw. Waters XBridge BEH C₄, 50 × 2,1 mm; 3,5 µm), 5: UV/Vis Diodenarray-Detektor (Thermo Scientific Accela™ UV/Vis Detector), 6: Interface mit Oxidationsreaktor (Thermo Scientific LC IsoLink™ Interface), 7: irMS (Thermo Scientific DELTA V™ Isotope Ratio Mass Spectrometer), 8: Einhausung des Raman-Detektors (Rückseite).

In der Abbildung 7-35 sind die Gerätekomponenten der HT-HPLC und irMS abgelichtet. Zentraler Bestandteil der HT-HPLC ist ein spezieller Säulenofen (3) der Firma SIM (Scientific Instruments Manufacturer GmbH). Der Ofen erlaubt die Einstellung schneller Temperaturgradienten von 30 °C min^{-1} in einem Temperaturbereich von 30 bis 200 °C. Eine ebenfalls sehr wichtige Komponente stellt das LC IsoLink™ Interface (6) der Firma Thermo Scientific dar, das zwischen Raman-Detektor und irMS geschaltet wird. Die Aufgabe des Interface ist die vollständige Oxidation (nasschemisch) der Analytsubstanzen zu CO_2 , sowie die anschließende Trennung von CO_2 und mobiler Phase mittels Separationsmembran. Das CO_2 wird dann weiter zur irMS (7) geleitet und das $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffisotopenverhältnis bestimmt.

8 Analyse von Substanzgemischen mit dem HT-HPLC/Raman/irMS-System

Um die Funktionsfähigkeit der Gesamtkopplung zu demonstrieren, wurden Gemische von Modellsubstanzen mit dem in Kapitel 7.5 beschriebenen Aufbau vermessen. Nach chromatographischer Trennung durch die Hochtemperatur-HPLC erfolgten im Online-Messverfahren zunächst die Raman-spektroskopische Vermessung der Einzelsubstanzen sowie anschließend die Aufklärung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse mittels irMS.

8.1 Analyse eines Gemisches von Lebensmittelzusatzstoffen

Die Charakterisierung der Lebensmittelzusatzstoffe erfolgte anhand eines Gemisches von Theobromin, Theophyllin, Catechin, Coffein, Aspartam und Rutin (siehe Kapitel 6, Analytenauswahl). Dazu wurden 10 μL einer Stammlösung mit einer Konzentration von $0,2 \text{ g L}^{-1}$ je Analyt in das Gesamtsystem injiziert. Die chromatographische Trennung ist in der Abbildung 8-1 A anhand des UV-Signals bei 254 nm dargestellt. Die entsprechenden irMS-Daten zeigt die Abbildung 8-1 B. Die drei Ausschläge innerhalb der ersten drei Minuten resultieren aus einer gezielten Einspeisung eines CO_2 -Referenzgases mit zertifizierter Isotopenverteilung. Anhand der Gaspulse können später die Analytsignale verifiziert werden.

Die Raman-spektroskopische Erfassung startet mit der Injektion des Substanzgemisches bei $t = 0 \text{ min}$. Über die Laufzeit der chromatographischen Trennung wurden alle 5 Sekunden Raman-Spektren ausgelesen, die sich aus jeweils 12 akkumulierten Einzelspektren $\text{a } 0,4 \text{ Sekunden}$ zusammensetzten. Die Laserleistung betrug dabei 1800 mW. Die Reduktion von Laserleistung und Belichtungszeit im Vergleich zu den Ausführungen nach Kapitel 7.4 wurde hinsichtlich einer geringeren Untergrund-Raman-Streuung des Abnahme-Lichtwellenleiters vorgenommen, um damit einen größeren Spektralbereich bereits ab 800 cm^{-1} (nicht erst ab 1200 cm^{-1}) zugänglich zu machen. Laserleistung und Belichtungszeit wurden dabei so angepasst, dass das Quarzglas-Raman-Signal bei 1057 cm^{-1} (siehe dazu Abbildung 7-27) kurz vor der Sättigung des CCD-Detektors liegt. Bei dieser Maßnahme handelt es sich um einen Kompromiss zwischen spektraler Information und Nachweisgrenze.

Insgesamt konnten vier der sechs injizierten Lebensmittelzusatzstoffe Raman-spektroskopisch identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Substanzen Theobromin (1), Theophyllin (2), Catechin (3) und Coffein (4), deren Raman-Spektren in den Abbildung 8-2 bis Abbildung 8-5 dargestellt sind.

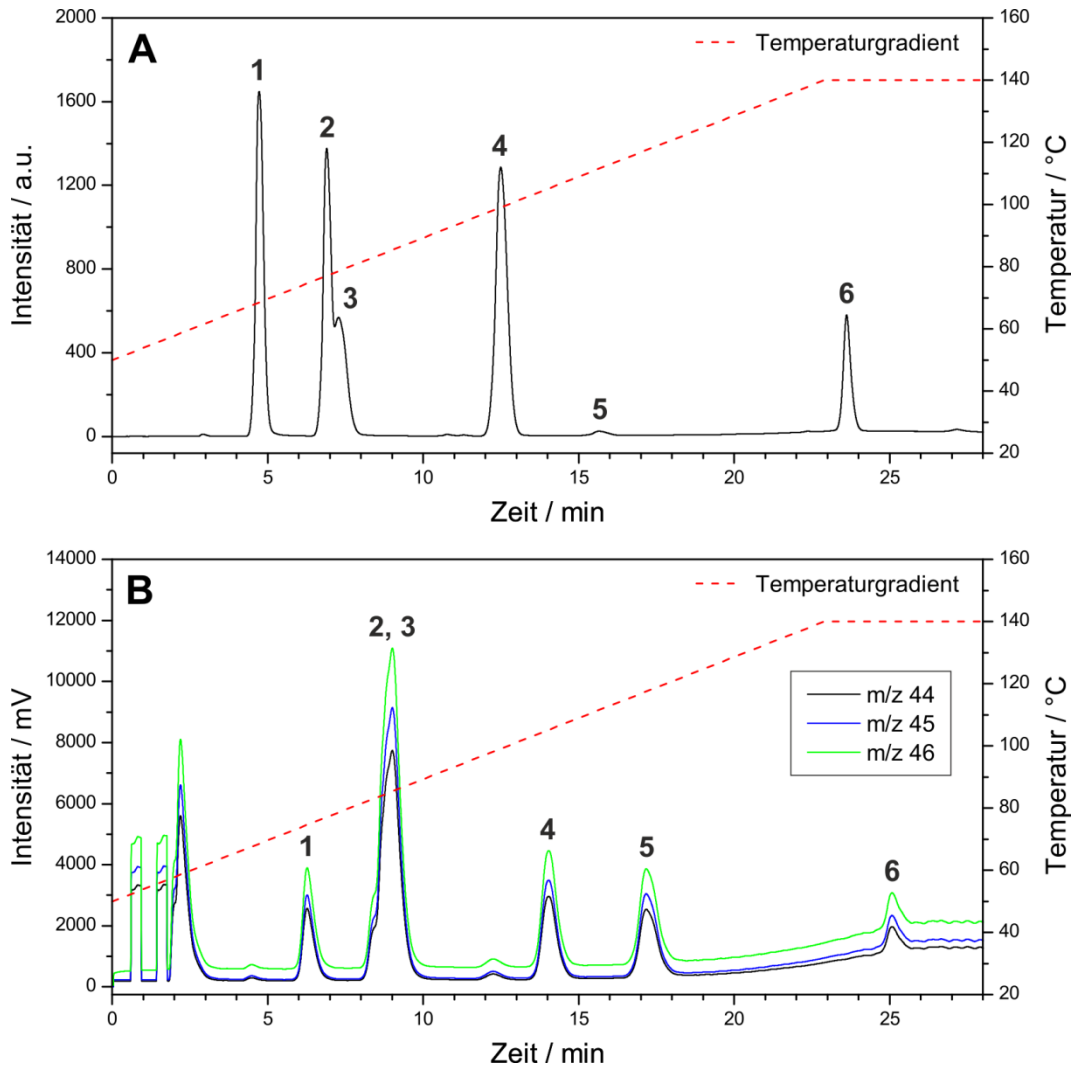


Abbildung 8-1: Trennung von sechs Lebensmittelzusatzstoffen. A: UV-Chromatogramm, B: irMS-Chromatogramm.

Analyten: 1: Theobromin, 2: Theophyllin, 3: Catechin, 4: Coffein, 5: Aspartam, 6: Rutin, Konz. Stamm-lösung: $0,2 \text{ g L}^{-1}$, Injektionsvolumen: $10 \mu\text{L}$, HPLC-Pumpe: Flux Rheos Allegro, Mobile Phase: Wasser mit Phosphatpuffer (10 mmol L^{-1}) bei pH 3, Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, Säulenofen: SIM HT-HPLC 200, HPLC-Säule: Waters XBridge BEH C_{18} , $100 \times 2,1 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$, Temperaturgradient: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $140 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, Detektion: UV bei 254 nm , Druck: 268 bar .

Von Rutin (6) konnte aufgrund einer stark überlagernden Fluoreszenzanregung kein Raman-Spektrum erhalten werden. Allerdings kann das Fluoreszenz-Spektrum zur Identifikation von Rutin herangezogen werden, da nur Rutin in dem hier verwendeten Substanzgemisch eine native Fluoreszenz aufweist. Das Fluoreszenz-Spektrum zeigt die Abbildung 8-6. Aspartam (5) konnte mit dem

Raman-Detektor nicht erfasst werden. Dafür gibt es zurzeit keine plausible Erklärung.

Die Abbildung 8-2 zeigt das Online Raman-Spektrum von Theobromin (1), das bei $t = 4,7$ min von der Säule eluiert. Das Spektrum ist untergrundkorrigiert, d.h. es wurde gegen das Raman-Spektrum der reinen mobilen Phase (phosphatgepuffertes Wasser) differenziert. Anschließend erfolgte eine Basislinienkorrektur sowie eine 3 Punkte FFT-Glättung mit der Software *OriginPro 8.5G*. Die soeben beschriebenen Operationen zur Spektren-Aufbereitung wurden auch bei allen folgenden Raman-Spektren auf diese Weise durchgeführt.

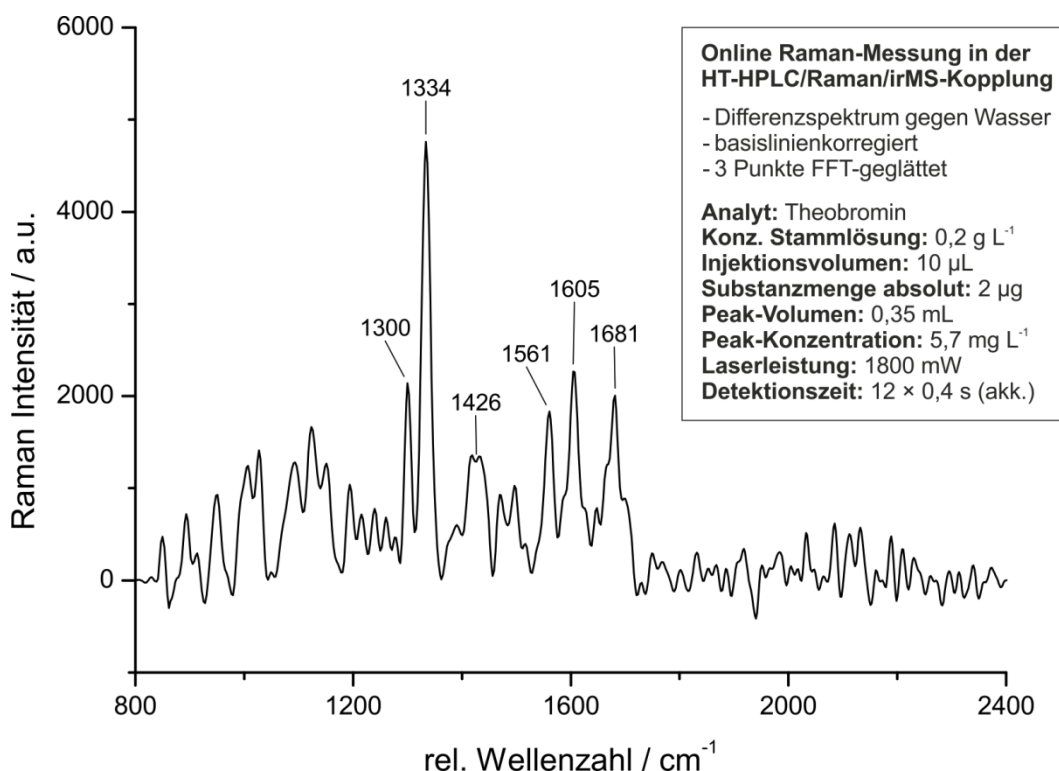


Abbildung 8-2: Online Raman-Messung von Theobromin in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Da für Theobromin aufgrund fluoreszierender Verunreinigungen im Feststoff kein Referenz-Raman-Spektrum erhalten werden konnte (siehe Anhang, Tabelle 11-5), erfolgte die Zuordnung der Raman-Banden anhand entsprechender FT-Raman-Spektren nach einer Publikation von H.G.M. Edwards, T. Munshi und M. Anstis aus dem Jahr 2005 [74]. Demnach können die sechs Raman-Übergänge bei 1300, 1334, 1426, 1561, 1605 und 1681 cm⁻¹ dem Theobromin zugeordnet werden. Zur Bestimmung der Peak-Konzentration wurde zunächst das Peak-Volumen anhand des UV-Chromatogramms (siehe Abbildung 8-1 A) mit 0,35 mL bestimmt. Mit einer Injektionsmenge von 2 µg liegt die Peak-Konzentration für Theobromin bei ca. 5,7 mg L⁻¹.

Die Abbildung 8-3 zeigt das Online Raman-Spektrum von Theophyllin (2) bei $t = 6,9$ min. Die Signale bei 1057 , 1239 , 1298 , 1331 und 1700 cm^{-1} können anhand des Referenz-Raman-Spektrums (siehe Anhang, Tabelle 11-4) eindeutig dem Theophyllin zugeordnet werden. Die Peak-Konzentration liegt bei ca. $5,7$ mg L^{-1} .

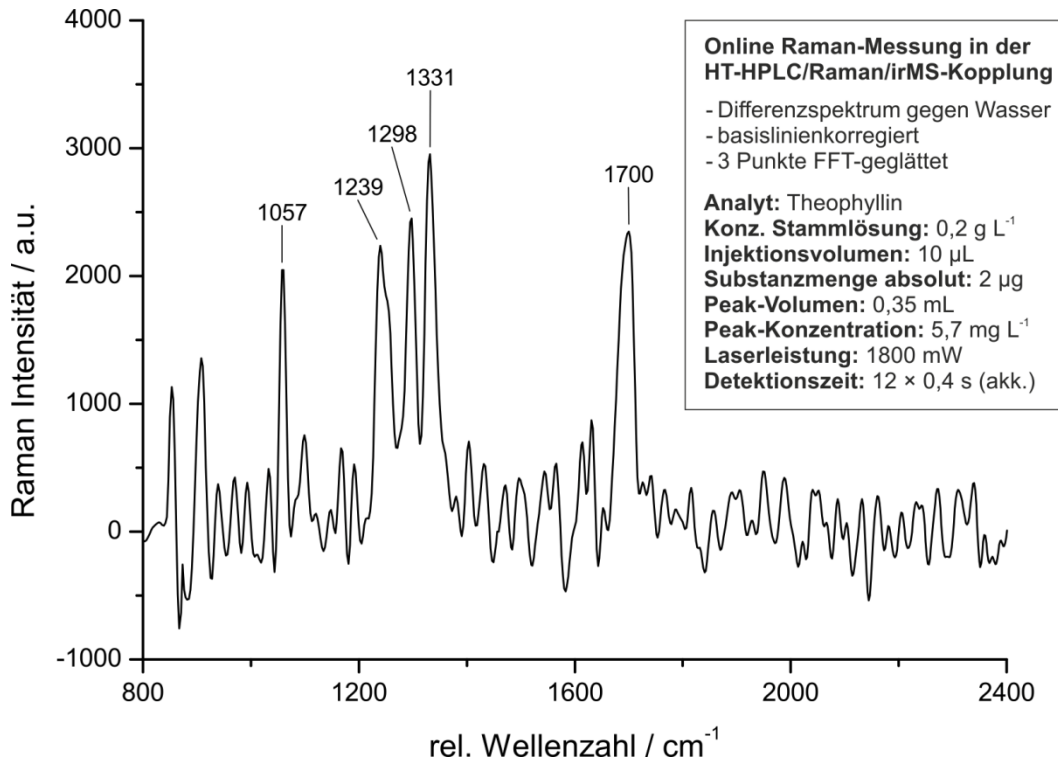


Abbildung 8-3: Online Raman-Messung von Theophyllin in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Das Online Raman-Spektrum von Catechin (3) bei $t = 7,3$ min ist in der Abbildung 8-4 dargestellt. Es können drei Raman-Übergänge bei 1032 , 1298 und 1621 cm^{-1} identifiziert werden. Die Peak-Konzentration von Catechin wurde auf ca. 5 mg L^{-1} berechnet.

Die Chromatogramme der Abbildung 8-1 zeigen eine „beinahe“ Koelution von Theophyllin (2) und Catechin (3). Während im UV-Chromatogramm das Catechin als Schulter des Theophyllin-Peaks beobachtet werden kann, zeigen die irMS-Daten einen einzelnen leicht asymmetrischen Peak.

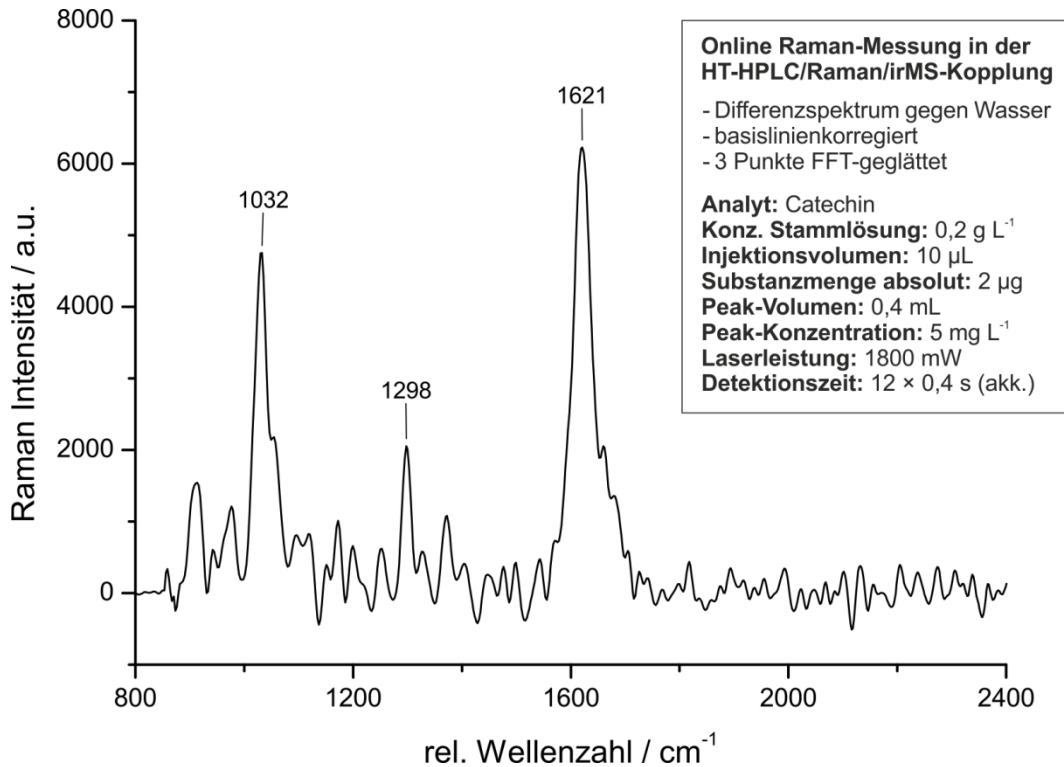


Abbildung 8-4: Online Raman-Messung von Catechin in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Ohne die Raman-Detektion kann eine Identifikation bzw. Unterscheidung der beiden Substanzen nur anhand der Retentionszeiten erfolgen. Aufgrund von z. B. Säulenalterung oder leicht abweichenden Temperaturgradienten besteht allerdings immer das Risiko, dass wenig aufgetrennte Peaks in einer „echten“ Koelution deckungsgleich zusammenlaufen, oder sich sogar vertauschen. Eine zweifelsfreie Zuordnung anhand der Retentionszeiten ist daher nur bei regelmäßiger und äußerst zeitaufwendiger Säulenkalibration möglich.

An diesem Beispiel lässt sich sehr schön der Mehrwert des integrierten Raman-Detektors zeigen, denn die Raman-Spektroskopie erlaubt als strukturaufklärende Methode die eindeutige Identifikation und Zuordnung der getrennten Substanzen.

Die folgende Abbildung 8-5 zeigt das Online-Raman-Spektrum von Coffein (4) bei $t = 12,5$ min. Das Coffein kann anhand der Raman-Übergänge bei 1032, 1074, 1298, 1339, 1563, 1607 und 1698 identifiziert werden (siehe Anhang, Tabelle 11-3). Die Peak-Konzentration liegt bei ca. 4 mg L^{-1} .

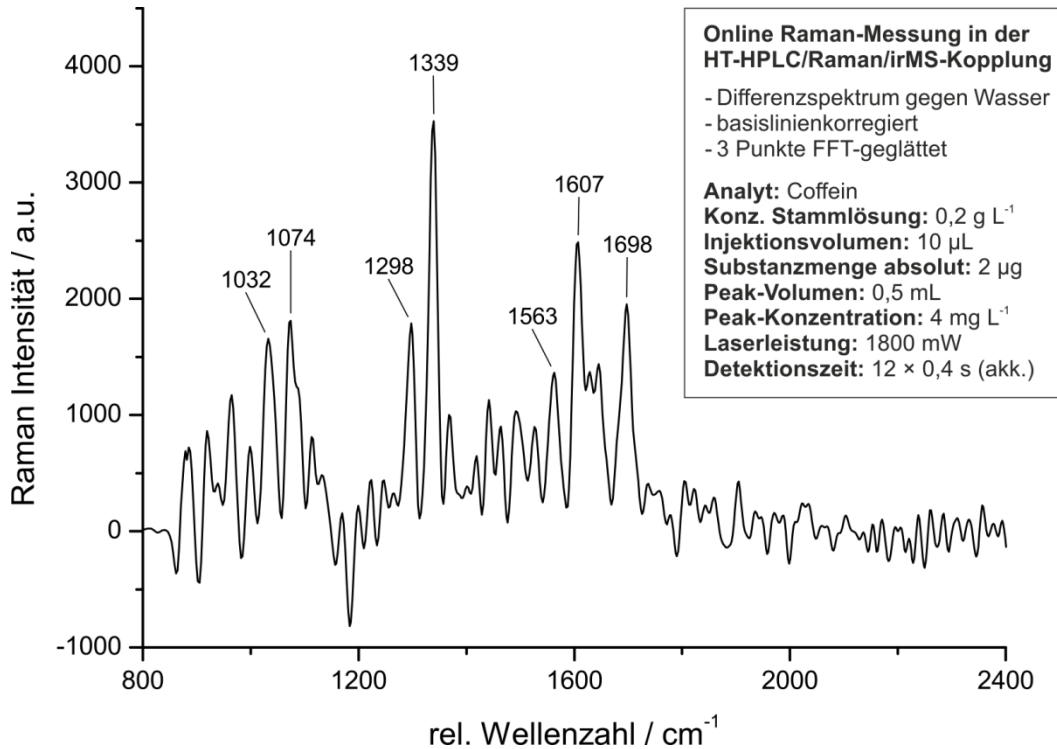


Abbildung 8-5: Online Raman-Messung von Coffein in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Das erhaltene Fluoreszenz-Spektrum von Rutin (6) bei $t = 23,6$ min findet sich in der Abbildung 8-6. Bei 1057 cm^{-1} kann ein Negativ-Peak beobachtet werden. Dieser resultiert aus der breitbandigen Signalerhöhung durch die Fluoreszenz des Rutins, die das Quarzglas-Raman-Signal des Abnahme-Lichtwellenleiters bei 1057 cm^{-1} (siehe dazu Kapitel 7.3.2.8, Abbildung 7-27) leicht in die Sättigung des CCD-Detektors laufen lässt. Der Negativ-Peak entsteht erst durch die Differenzierung des Rutin-Spektrums gegen das Raman-Spektrum der reinen mobilen Phase.

Für Rutin wurde eine Peak-Konzentration von ca. $5,7 \text{ mg L}^{-1}$ ermittelt. Die Messung zeigt, dass der entwickelte Raman-Detektor ebenso als empfindlicher Fluoreszenz-Detektor für Substanzen genutzt werden kann, die bei der verwendeten Laserwellenlänge von 532 nm eine native Fluoreszenz aufweisen.

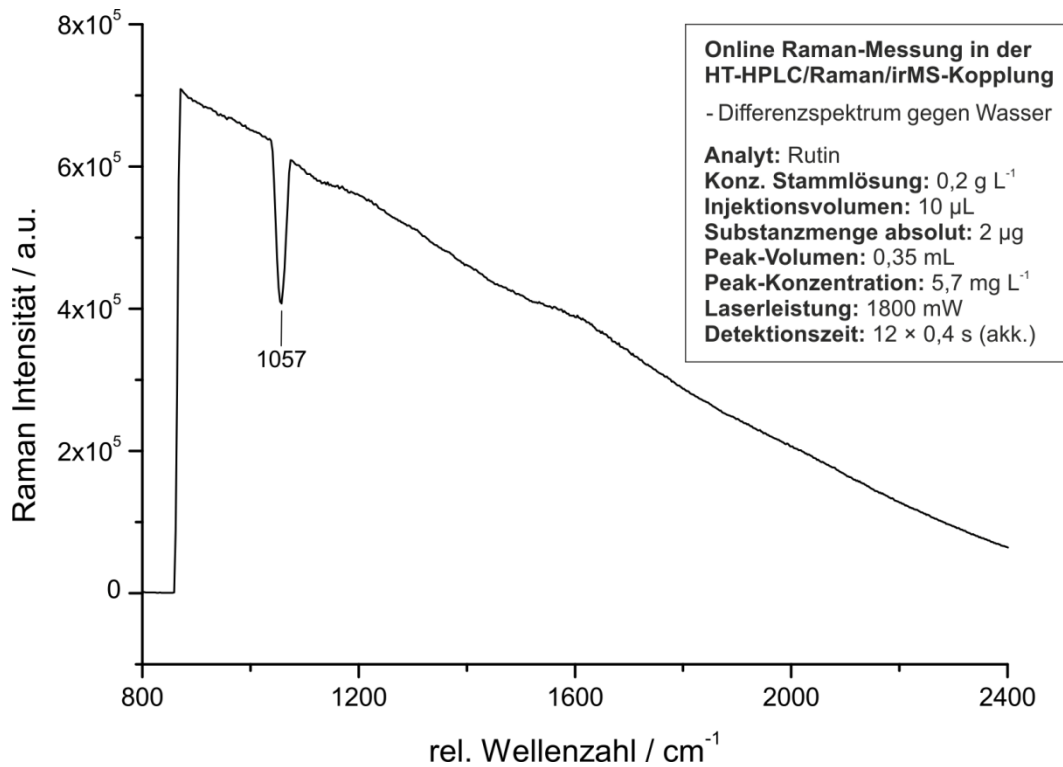


Abbildung 8-6: Online Raman-Messung von Rutin in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Um die vergleichsweise schwachen Raman-Signale aus dem Fluoreszenz-Untergrund besser herauszuarbeiten, kann das Rutin-Spektrum als 2. Ableitung der Raman-Intensität dargestellt werden. Das entsprechende Derivativspektrum zeigt die Abbildung 8-7 für einen Frequenzbereich zwischen 1200 und 2400 cm^{-1} . Im vorderen Frequenzbereich können aus dem Derivativspektrum sechs Raman-Signale zwischen 1305 und 1617 cm^{-1} dem Rutin zugeordnet werden.

Die Signale zwischen 1650 und 2400 cm^{-1} resultieren möglicherweise aus Oberschwingungen, die aufgrund resonanter Anregung des Rutins mit 532 nm verstärkt werden.

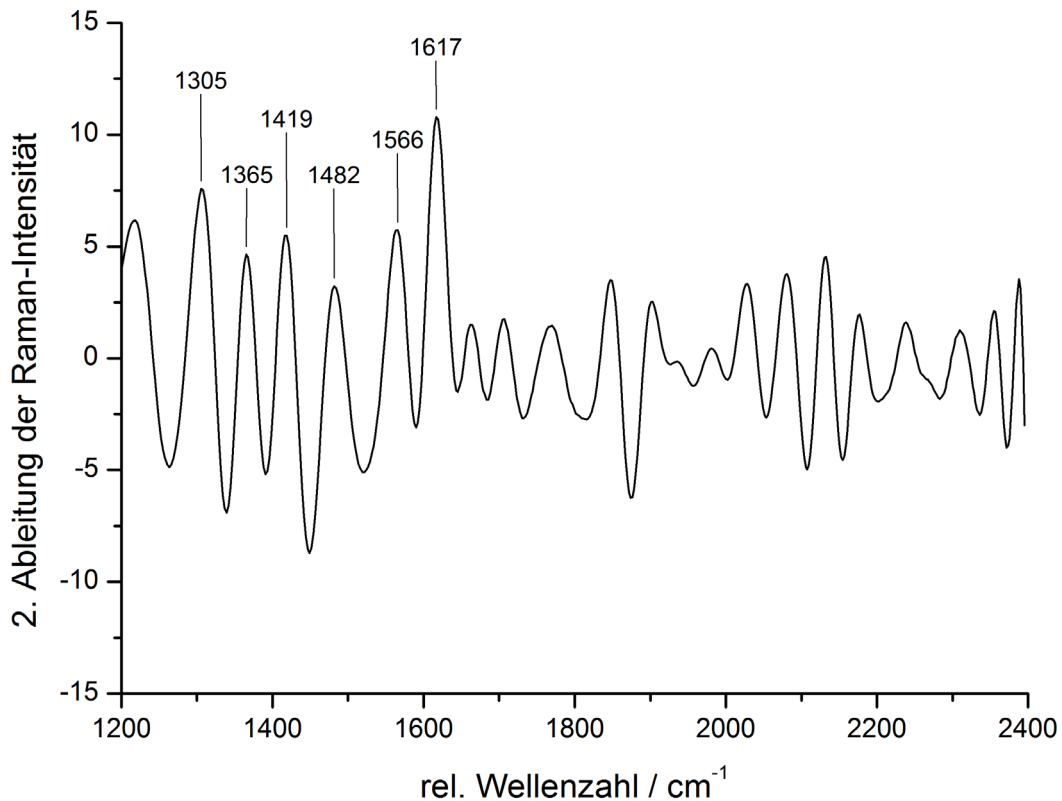


Abbildung 8-7: Online Raman-Messung von Rutin in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung – Invertierte 2. Ableitung der Raman-Intensität (vorherige 8 Punkte FFT-Glättung des Originalspektrums).

Aspartam (5), das bei $t = 15,7\text{ min}$ eluiert, konnte nicht mit dem Raman-Detektor erfasst werden. Das Peak-Volumen kann auf ca. 4 mg L^{-1} bestimmt werden und liegt damit im Bereich der Coffein-Konzentration. Zumindest die stark ausgeprägte Schlüsselbande des Aspartams bei 1005 cm^{-1} (siehe Anhang, Tabelle 11-6) hätte daher eigentlich detektiert werden sollen.

8.2 Analyse eines Gemisches von Antibiotika

Die Charakterisierung der Antibiotika erfolgte anhand eines Gemisches von Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethoxaxol und Trimethoprim. Dazu wurden 20 μL einer Stammlösung mit einer Konzentration von $0,1 \text{ g L}^{-1}$ je Analyt in das Gesamtsystem injiziert. Die chromatographische Trennung ist in der Abbildung 8-8 A anhand des UV-Signals bei 254 nm dargestellt. Die entsprechenden irMS-Daten zeigt die Abbildung 8-8 B.

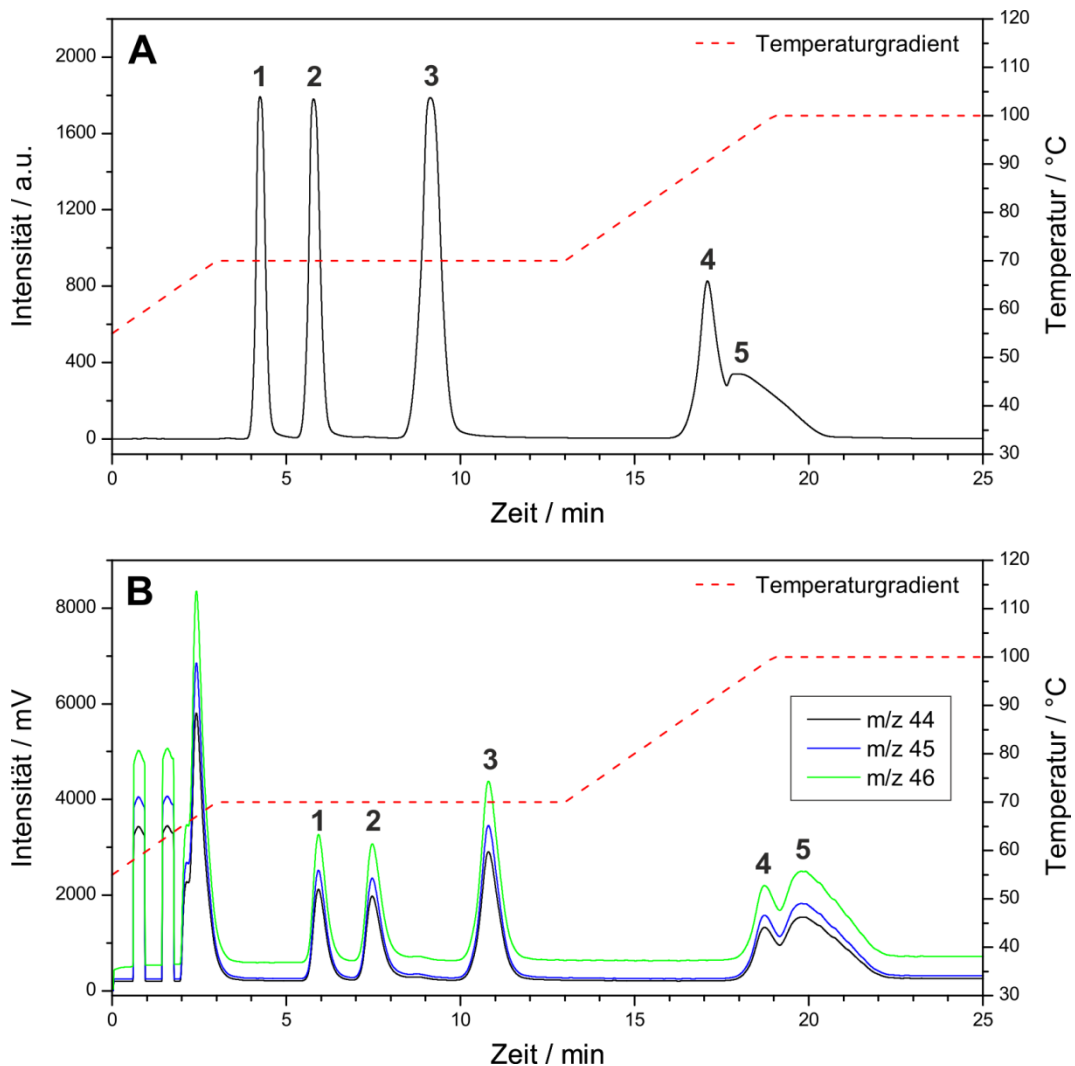


Abbildung 8-8: Trennung von fünf Antibiotika. A: UV-Chromatogramm, B: irMS-Chromatogramm.

Analyten: 1: Sulfadiazin, 2: Sulfathiazol, 3: Sulfamerazin, 4: Sulfamethoxaxol, 5: Trimethoprim, Konz. Stammlösung: $0,1 \text{ g L}^{-1}$, Injektionsvolumen: $20 \mu\text{L}$, HPLC-Pumpe: Flux Rheos Allegro, Mobile Phase: Wasser mit Phosphatpuffer (10 mmol L^{-1}) bei pH 3, Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, Säulenofen: SIM HT-HPLC 200, HPLC-Säule: Waters XBridge BEH C_{18} , $100 \times 2,1 \text{ mm}$; $3,5 \mu\text{m}$, Temperaturgradient: $55 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $70 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, 10 min bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $100 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, Detektion: UV bei 254 nm , Druck: 256 bar .

Die Raman-spektroskopische Detektion wurde mit den gleichen Einstellungen wie schon bei der Vermessung der Lebensmittelzusatzstoffe durchgeführt. Die Spektrenerfassung wurde mit der Injektion des Substanzgemisches bei $t = 0 \text{ min}$

gestartet. Jedes Raman-Spektrum besteht aus 12 akkumulierten Einzelspektren a 0,4 Sekunden und die Laserleistung beträgt 1800 mW.

Insgesamt konnten drei Sulfonamide Raman-spektroskopisch erfasst werden. Dabei handelt es sich um die Substanzen Sulfadiazin (1), Sulfathiazol (2) und Sulfamerazin (3), deren Raman-Spektren in den Abbildung 8-9 bis Abbildung 8-11 dargestellt sind. Von Sulfamethoxazol (4) und Trimethoprim (5) konnten aufgrund zu geringer Peak-Konzentration keine Raman-Signale erhalten werden.

Die Abbildung 8-9 zeigt das Online Raman-Spektrum von Sulfadiazin (1), das bei $t = 4,25$ min von der Säule eluiert. In Abgleich mit dem Referenz-Raman-Spektrum (siehe Anhang, Tabelle 11-9) kann Sulfadiazin anhand der Raman-Banden bei 1099, 1154 und 1600 cm^{-1} identifiziert werden. Die Peakkonzentration wurde auf ca. $5,7\text{ mg L}^{-1}$ berechnet.

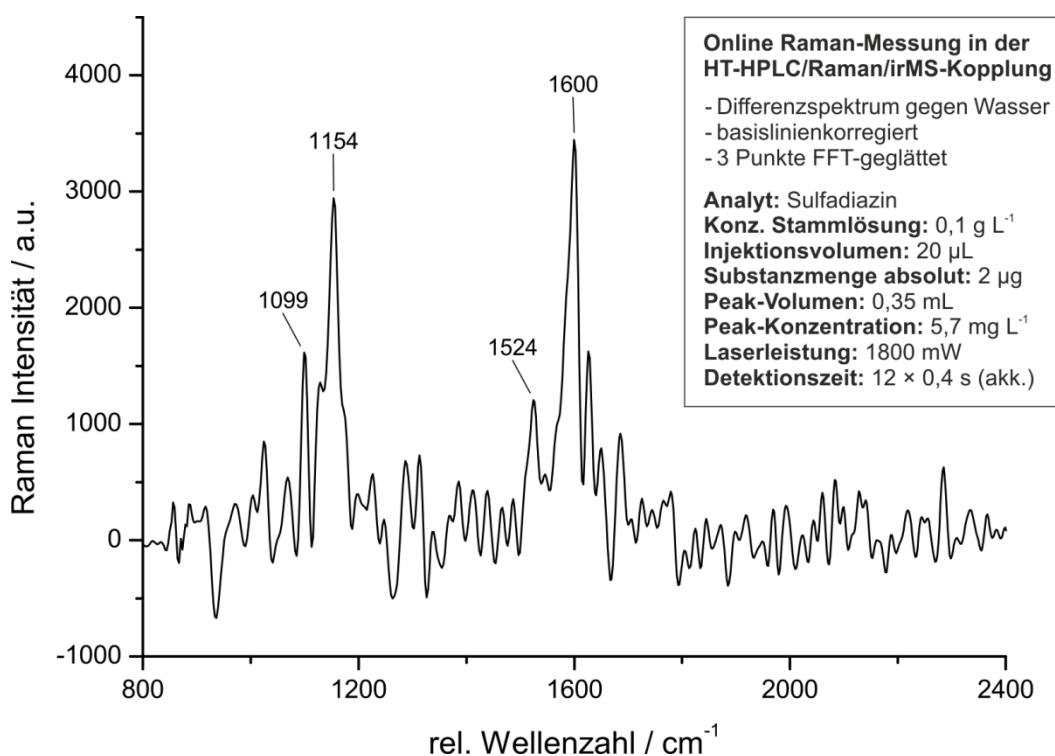


Abbildung 8-9: Online Raman-Messung von Sulfadiazin in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Das Online Raman-Spektrum von Sulfathiazol (2) ist in der Abbildung 8-10 dargestellt. Die Substanz eluiert bei $t = 5,8$ min von der Säule und besitzt eine Peak-Konzentration von ca. 5 mg L^{-1} . Die Raman-Signale bei 1140, 1258, 1529 und 1602 cm^{-1} können eindeutig Sulfathiazol zugeordnet werden (siehe Anhang, Tabelle 11-12).

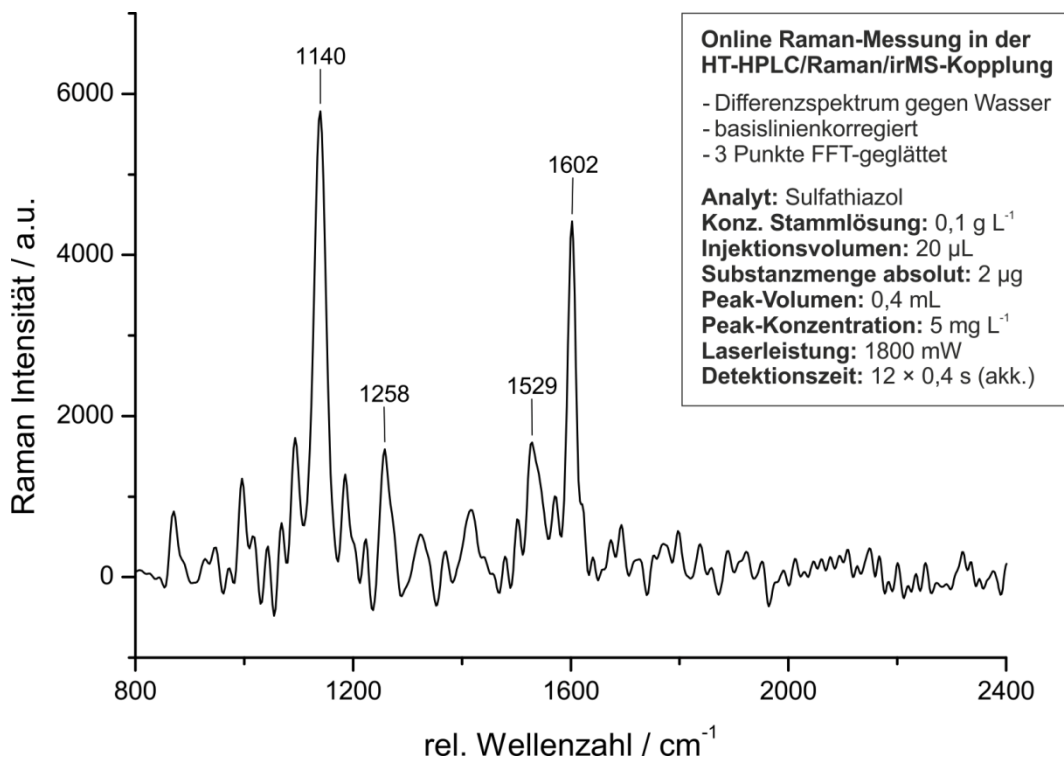


Abbildung 8-10: Online Raman-Messung von Sulfathiazol in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

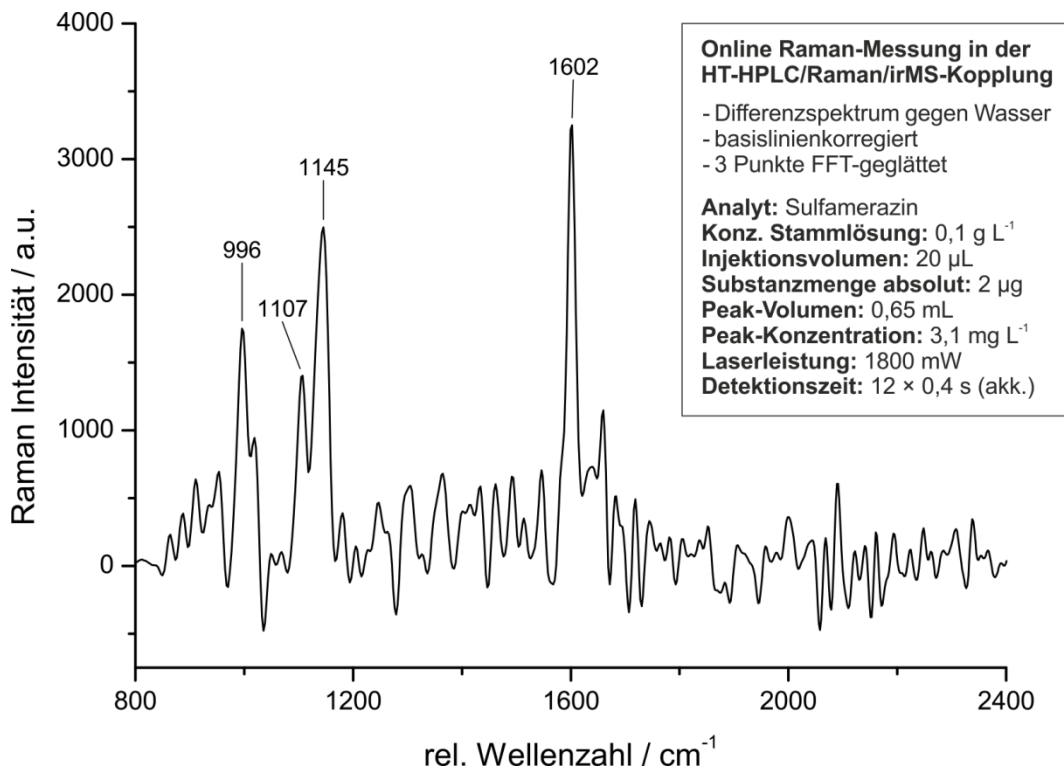


Abbildung 8-11: Online Raman-Messung von Sulfamerazin in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Sulfamerazin (3) eluiert mit einer Peak-Konzentration von ca. $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ bei $t = 9,1 \text{ min}$. Die Abbildung 8-11 zeigt das entsprechende Raman-Spektrum, das im Peak-Maximum erfasst wurde. Sulfamerazin kann anhand der Übergänge bei 996 , 1107 , 1145 und 1602 cm^{-1} identifiziert werden (siehe Anhang, Tabelle 11-10).

Sulfamethoxazol (4) und Trimethoprim (5), deren Peak-Maxima bei $t = 17,1$ und $t = 17,9 \text{ min}$ liegen, konnten Raman-spektroskopisch nicht detektiert werden. Die beiden Substanzen eluieren relativ breit von der Säule und liegen daher auch nicht basisliniengetrennt vor. Für Sulfamethoxazol kann eine Peak-Konzentration von ca. 2 mg L^{-1} berechnet werden, für Trimethoprim liegt sie bei ca. $1,3 \text{ mg L}^{-1}$. Bei dem gegenwärtigen Auswerteverfahren liegen die Konzentrationen der beiden Substanzen knapp unterhalb der Nachweisgrenze des Raman-Detektors. An diesem Beispiel kann gezeigt werden, dass die Nachweisstärke des Raman-Detektors stark von der Qualität der chromatographischen Trennung abhängig ist (siehe dazu auch Kapitel 5.1). Gerade wenn in Bereichen der Nachweisgrenze gearbeitet wird, sind für die Raman-Detektion schmale und damit höher konzentrierte Substanz-Peaks von Vorteil.

8.3 Analyse eines Gemisches von Anabolika

Die Charakterisierung der anabolen Steroide erfolgte anhand eines Gemisches von Nandrolon, Testosteron, Epitestosteron, Androsteron und Pregnantriol. Dazu wurden $10 \mu\text{L}$ einer Stammlösung mit einer Konzentration von $0,3 \text{ g L}^{-1}$ je Analyt in das Gesamtsystem injiziert. Die chromatographische Trennung ist in der Abbildung 8-12 A anhand des UV-Signals bei 254 nm dargestellt. Die entsprechenden irMS-Daten zeigt die Abbildung 8-12 B.

Die Raman-spektroskopische Detektion der anabolen Steroide gestaltete sich im Vergleich zu den Lebensmittelzusatzstoffen und den Antibiotika etwas schwieriger, da bei gleichen Messeinstellungen zunächst keine der injizierten Substanzen Raman-spektroskopisch erfasst werden konnte. In der ersten Versuchsreihe wurde die Gesamtmenge an Analyt, die auf die Trennsäule gegeben wurde, von $2 \mu\text{g}$ auf $3 \mu\text{g}$ erhöht. Anhand der sich herausbildenden Doppel-Peaks von Nandrolon (1) und Testosteron (2) ist ersichtlich, dass die Trennsäule dadurch bereits leicht überladen wurde. Eine Erhöhung der Konzentration ist ohne weitere Beeinträchtigung der chromatographischen Trennleistung daher nicht möglich. Die Erhöhung der Konzentration der Stammlösung führte, für sich alleine betrachtet, zu keinem Erfolg.

Daher wurde in folgenden Versuchsreihen die Laserleistung auf 2000 mW erhöht. Aufgrund der zunehmenden Untergrundstreuung reduzierte sich allerdings der nutzbare Spektralbereich, sodass die Raman-Spektren erst ab 1200 cm^{-1} zugänglich waren. Die Belichtungszeit von 0,4 Sekunden je Einzelspektrum blieb unverändert, allerdings wurde die Anzahl der akkumulierten Spektren von 12 auf 16 erhöht.

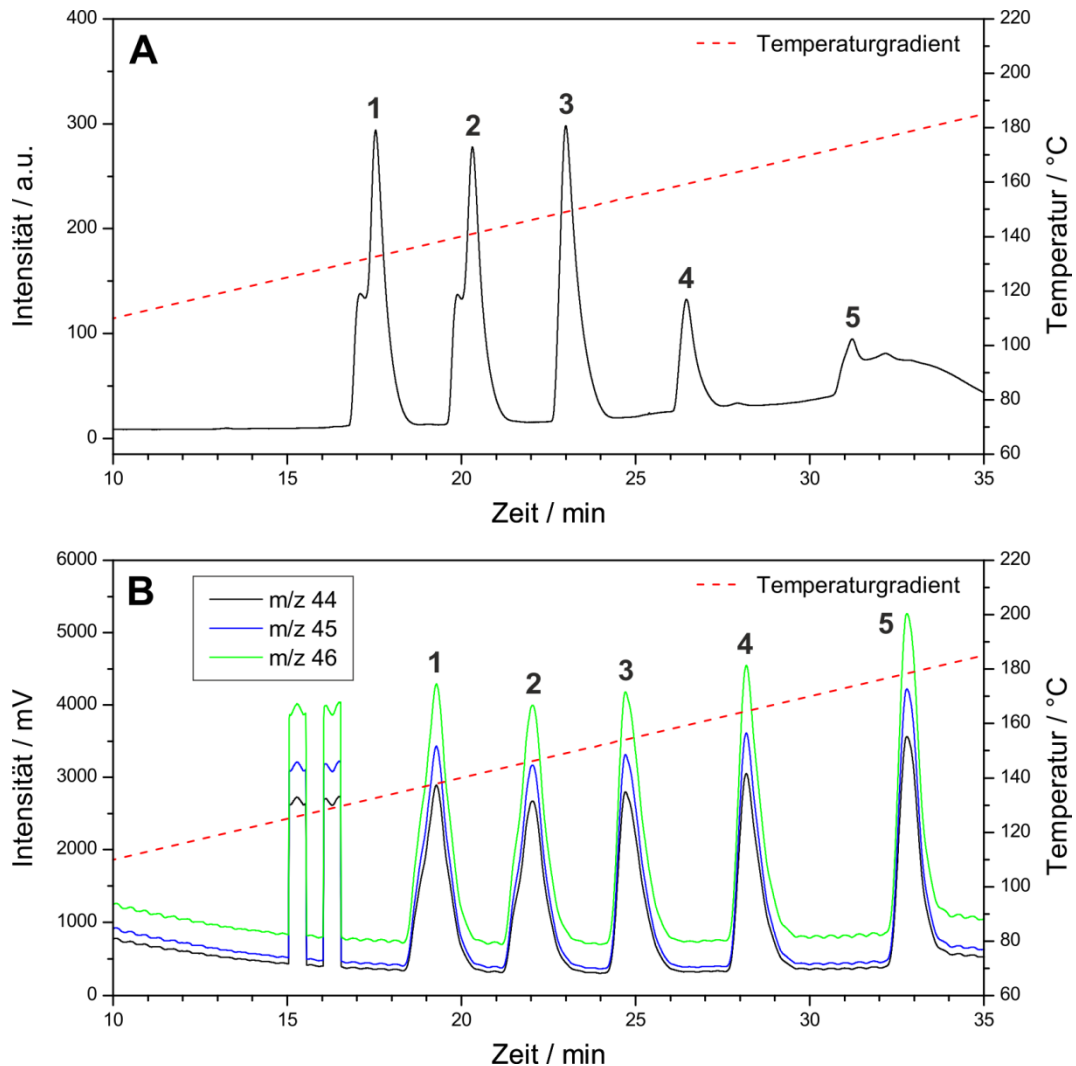


Abbildung 8-12: Trennung von fünf Steroiden. A: UV-Chromatogramm, B: irMS-Chromatogramm.

Analyten: 1: Nandrolon, 2: Testosteron, 3: Epitestosteron, 4: Androsteron, 5: Pregnantriol, Konz. Stamm-lösung: $0,3\text{ g L}^{-1}$, Injektionsvolumen: $10\text{ }\mu\text{L}$, HPLC-Pumpe: Agilent 1200 SL, Mobile Phase: Wasser, Flussrate: $0,5\text{ mL min}^{-1}$, Säulenofen: SIM HT-HPLC 200, HPLC-Säule: Waters XBridge BEH C_4 , $50 \times 2,1\text{ mm}$; $3,5\text{ }\mu\text{m}$, Temperaturgradient: $80\text{ }^\circ\text{C}$ bis $200\text{ }^\circ\text{C}$ mit $3\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, Detektion: UV bei 200 nm , Druck: 118 bar .

Die durchgeführten Maßnahmen führten schließlich dazu, dass vier der fünf Steroide Raman-spektroskopisch erfasst werden konnten. Allerdings wurden nur sehr wenige Raman-Banden detektiert, die zwar (eingeschränkt) eine Unterscheidung zwischen den Substanzen ermöglichen, eine eindeutige Identifizierung aber nicht zulassen. Bei den erfassten Substanzen handelt es sich

um Nandrolon (1), Testosteron (2), Epitestosteron (3) und Androsteron (4), deren Raman-Spektren in den Abbildung 8-13 bis Abbildung 8-16 dargestellt sind. Von Pregnantriol (5) konnten keine Raman-Signale detektiert werden, was später noch erklärt wird.

Die Abbildung 8-13 zeigt das Online Raman-Spektrum von Nandrolon (1), das bei $t = 17,5$ min von der Säule eluiert. Die Peak-Konzentration liegt bei ca. $3,5 \text{ mg L}^{-1}$. Das Raman-Spektrum zeigt ein Doppel-Signal mit Peak-Spitzen bei 1621 und 1641 cm^{-1} . Diese können den stark ausgeprägten C=O- und C=C-Schwingungen im Sechsring des Nandrolons zugeordnet werden (siehe Anhang, Tabelle 11-17) [69, 70]. An dieser Stelle kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Signal bei 1641 cm^{-1} auch um ein Artefakt handeln könnte. Aufgrund der niedrigen Konzentration und der Differenzierung des Spektrums gegen Wasser, laufen bei der Auswertung die Raman-Signale der C=O- und C=C-Schwingungen ineinander.

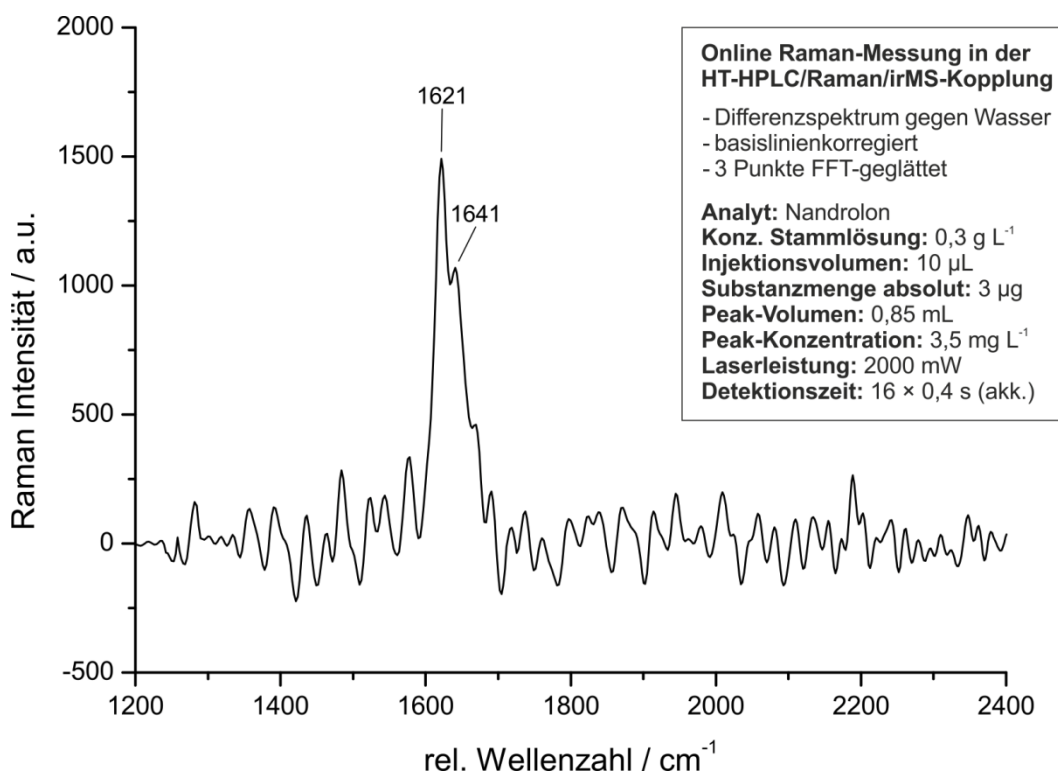


Abbildung 8-13: Online Raman-Messung von Nandrolon in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Weiterhin geht zusätzlich spektrale Auflösung durch die nachträgliche FFT-Glättung verloren. Eine klare Abgrenzung der beiden Übergänge, wie sie in der Referenz-Raman-Datenbank vorliegen, wird nicht erreicht. Diese Beobachtung gilt auch für die anderen Steroid-Raman-Spektren, die im Raman der Gesamtkopplung untersucht worden sind.

Das Online Raman-Spektrum von Testosteron (2) ist in der Abbildung 8-14 dargestellt. Die Substanz eluiert bei $t = 20,3$ min von der Säule und besitzt eine Peak-Konzentration von ca. $3,75 \text{ mg L}^{-1}$. Wie auch schon beim Nandrolon konnten nur die beiden C=O- und C=C-Schwingungen, in diesem Fall bei 1624 und 1652 cm^{-1} , erfasst werden (siehe Anhang, Tabelle 11-15).

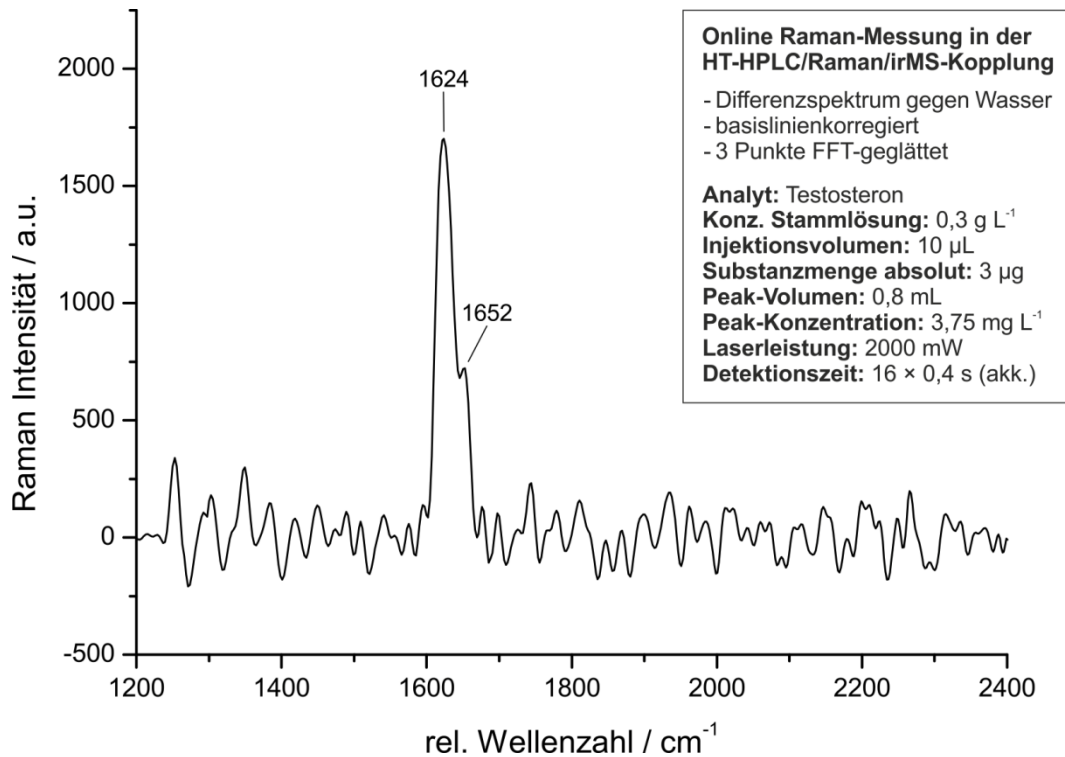


Abbildung 8-14: Online Raman-Messung von Testosteron in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Epitestosteron (3) eluiert mit einer Peak-Konzentration von ca. 4 mg L^{-1} bei $t = 23,0$ min. Das entsprechende Online-Raman-Spektrum zeigt die Abbildung 8-15. Wieder können nur die C=O- und C=C-Schwingungen des Sechsrings bei 1612 und 1643 cm^{-1} detektiert werden (siehe Anhang, Tabelle 11-16).

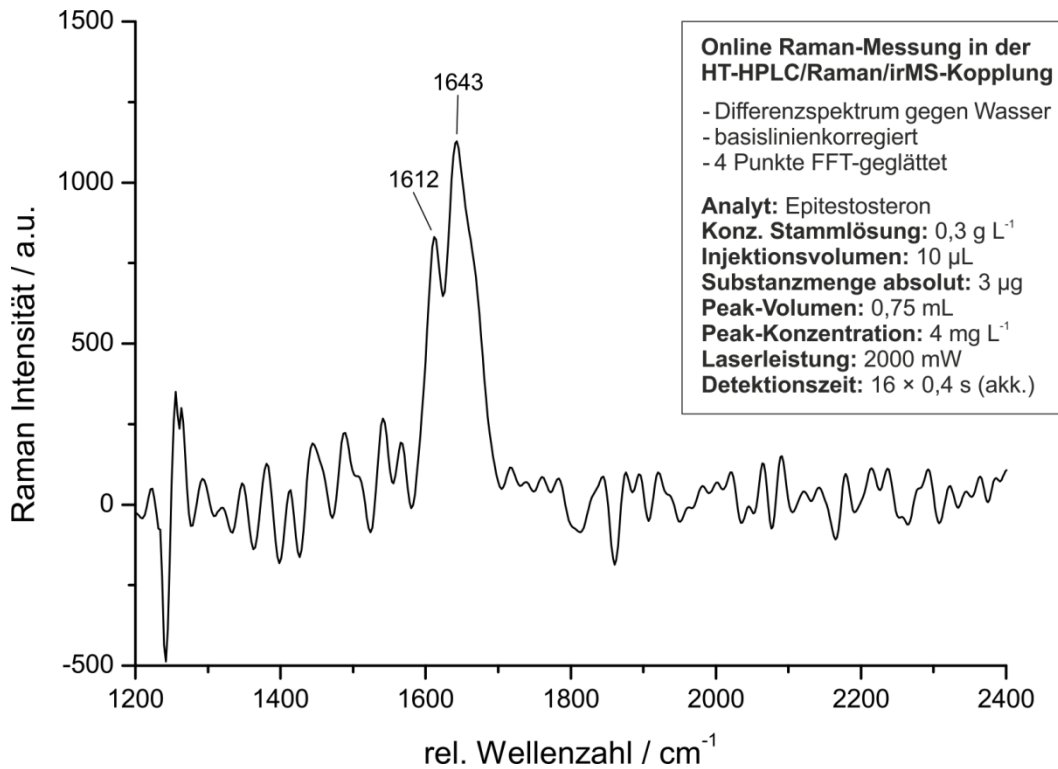


Abbildung 8-15: Online Raman-Messung von Epitestosteron in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Die Abbildung 8-16 zeigt das Online Raman-Spektrum von Androsteron (4) bei $t = 26,5$ min. Der erfasste Raman-Peak liegt bei 1695 cm^{-1} und resultiert aus der C=O-Schwingung des Fünfrings von Androsteron (siehe Anhang, Tabelle 11-19).

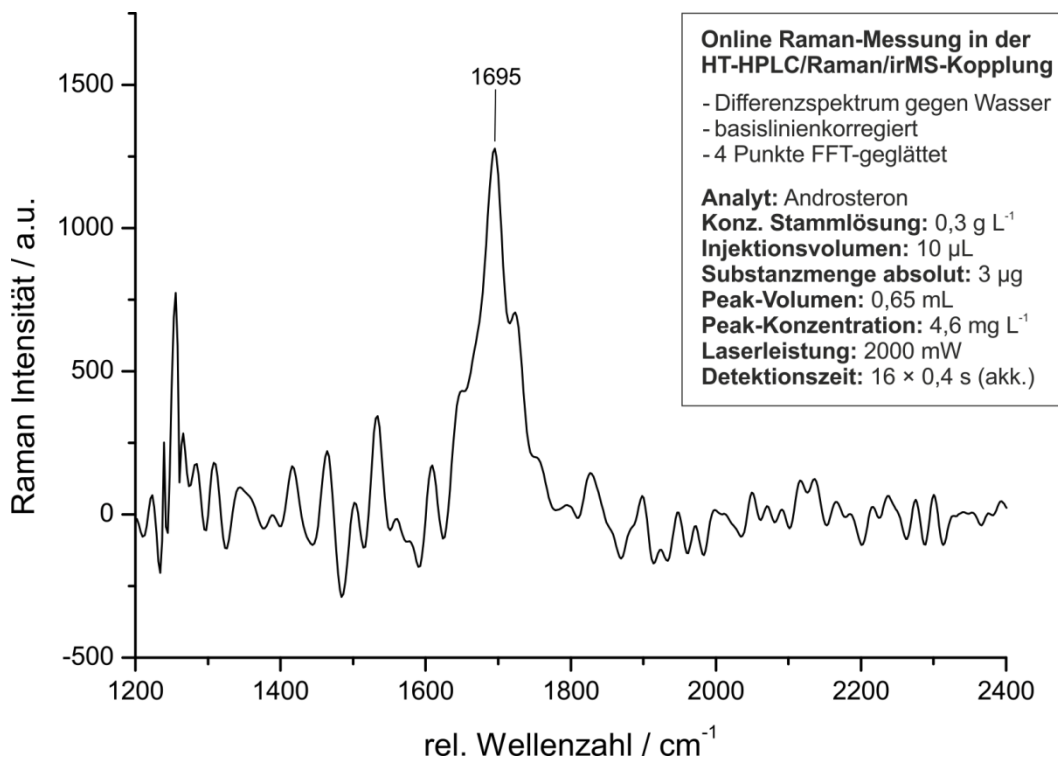


Abbildung 8-16: Online Raman-Messung von Androsteron in der HT-HPLC/Raman/irMS-Kopplung.

Pregnantriol konnte im Rahmen der Online-Messung nicht erfasst werden. Die Peak-Konzentration liegt zwischen 4 und 5 mg L⁻¹. Die markanten Raman-Banden von Pregnantriol liegen um 1450 cm⁻¹ und resultieren aus den drei Methylgruppen (siehe Anhang, Tabelle 11-22). Diese sind im Vergleich mit der Raman-aktiven Schwingung der Ketogruppe und Doppelbindung um den Faktor 3 bis 5 schwächer ausgeprägt und können bei der vorliegenden Peak-Konzentration nicht detektiert werden.

Die beiden Steroide Nandrolon und Testosteron können anhand der dargestellten Online Raman-Spektren nicht zweifelsfrei voneinander unterschieden werden. Dafür liegen die Signale hinsichtlich der geringen spektralen Auflösung zu nah beieinander. Epitestosteron kann aufgrund der besser aufgelösten Bande bei 1612 cm⁻¹ gut von Nandrolon und Testosteron abgegrenzt werden. Androsteron lässt sich anhand des zu höheren Wellenzahlen verschobenen Raman-Signals bei 1695 cm⁻¹ eindeutig identifizieren.

Die folgende Tabelle 8-1 fasst die Messergebnisse der Online Raman-Detektion im Rahmen der Gesamtkopplung mit der HT-HPLC und irMS zusammen:

Tabelle 8-1: Messergebnisse der Online Raman-Detektion im Rahmen der Gesamtkopplung mit der HT-HPLC und irMS.

Substanzklasse	Lebensmittelzusatzstoffe
Analyten	Theobromin, Theophyllin, Catechin, Coffein, Aspartam, Rutin
Injektionsvolumen	10 µL
Konzentration der Stammlösung	0,2 g L ⁻¹
Substanzmenge absolut	2 µg
Mobile Phase	Wasser mit Phosphatpuffer bei pH 3
Flussrate	0,5 mL min ⁻¹
Laserleistung	1800 mW
Raman-Messzeit	12 × 0,4 s (akkumuliert)

Peak Nr.	Analyt	Peak-Volumen	Peak-Konzentration	Raman-Detektion	SRV *
1	Theobromin	0,35 mL	5,7 mg L ⁻¹	ja	11:1
2	Theophyllin	0,35 mL	5,7 mg L ⁻¹	ja	5:1
3	Catechin	0,40 mL	5,0 mg L ⁻¹	ja	9:1
4	Coffein	0,50 mL	4,0 mg L ⁻¹	ja	8:1
5	Aspartam	0,50 mL	4,0 mg L ⁻¹	nein	-
6	Rutin	0,35 mL	5,7 mg L ⁻¹	nein	-

Substanzklasse	Antibiotika
Analyten	Sulfadiazin, Sulfathiazol, Sulfamerazin, Sulfamethoxazol, Trimethoprim
Injektionsvolumen	20 µL
Konzentration der Stammlösung	0,1 g L ⁻¹
Substanzmenge absolut	2 µg
Mobile Phase	Wasser mit Phosphatpuffer bei pH 3
Flussrate	0,5 mL min ⁻¹
Laserleistung	1800 mW
Raman-Messzeit	12 × 0,4 s (akkumuliert)

Peak Nr.	Analyt	Peak-Volumen	Peak-Konzentration	Raman-Detektion	SRV *
1	Sulfadiazin	0,35 mL	5,7 mg L ⁻¹	ja	7:1
2	Sulfathiazol	0,40 mL	5,0 mg L ⁻¹	ja	10:1
3	Sulfamerazin	0,65 mL	3,1 mg L ⁻¹	ja	5:1
4	Sulfamethoxazol	1,00 mL	2,0 mg L ⁻¹	nein	-
5	Trimethoprim	1,50 mL	1,3 mg L ⁻¹	nein	-

Substanzklasse	Anabolika
Analyten	Nandrolon, Testosteron, Epitestosteron, Androsteron, Pregnantriol
Injektionsvolumen	10 µL
Konzentration der Stammlösung	0,3 g L ⁻¹
Substanzmenge absolut	3 µg
Mobile Phase	Wasser
Flussrate	0,5 mL min ⁻¹
Laserleistung	2000 mW
Raman-Messzeit	16 × 0,4 s (akkumuliert)

Peak Nr.	Analyt	Peak-Volumen	Peak-Konzentration	Raman-Detektion	SRV *
1	Nandrolon	0,85 mL	3,5 mg L ⁻¹	ja	5:1
2	Testosteron	0,80 mL	3,75 mg L ⁻¹	ja	6:1
3	Epitestosteron	0,75 mL	4,0 mg L ⁻¹	ja	5:1
4	Androsteron	0,65 mL	4,6 mg L ⁻¹	ja	5:1
5	Pregnantriol	0,6 - 0,7 mL	4 - 5 mg L ⁻¹	nein	-

* SRV: Signal-Rausch-Verhältnis

9 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Raman-Detektor auf Basis eines Flüssigkern-Lichtwellenleiters entwickelt und „Online“ zwischen eine HT-HPLC/irMS-Kopplung integriert. Durch den Einsatz der Raman-Spektroskopie konnte das bestehende HT-HPLC/irMS-System um einen strukturaufklärenden Detektor ergänzt werden. Mit dem Gesamtsystem wurden drei Substanzgemische aus den Bereichen der Lebensmittelzusatzstoffe, Antibiotika und anabole Steroide vermessen. Eine zusammenfassende Bewertung der Messergebnisse sowie des experimentellen Aufbaus wird anhand der nachfolgend beschriebenen Kriterien gegeben:

Nachweisgrenze

Die absolute Nachweisgrenze des Raman-Detektors wurde am Beispiel von Coffein bestimmt (siehe Kapitel 7.4). Diese liegt bei einer Peak-Konzentration von $1,25 \text{ mg L}^{-1}$, bzw. bei 500 ng Coffein , das auf die Trennsäule aufgegeben wurde. Die in Kapitel 5.1 berechnete Nachweisgrenze der irMS konnte mit dem Raman-Detektor erreicht werden. Dabei wurde die maximal erlaubte Messzeit von 10 Sekunden (siehe Kapitel 5.2) nicht überschritten. Allerdings lässt sich in diesem Konzentrationsbereich nur noch die stark ausgeprägte Schlüsselbande von Coffein bei 1339 cm^{-1} detektieren. Im Vergleich mit den aus der Literatur bekannten Nachweisgrenzen (siehe Kapitel 4) zeigt sich der in dieser Arbeit entwickelte Raman-Detektor je nach Anwendungsbeispiel um den Faktor 2 bis 500 nachweisstärker.

Innerhalb der finalen Gesamtkopplung von HT-HPLC, Raman-Detektor und irMS (siehe Kapitel 8) liegt die Nachweisgrenze des Raman-Detektors bei Peak-Konzentrationen zwischen 3 und 6 mg L^{-1} . Dabei wurden die Konzentrationen dahingehend angepasst, dass möglichst mehrere Schlüsselbanden in den Raman-Spektren identifiziert werden konnten. Nur so war eine eindeutige Identifizierung und Unterscheidung der Substanzen möglich.

Insgesamt konnten 9 der 16 injizierten Substanzen mit dem Raman-Detektor identifiziert werden. Eine Verbesserung der Empfindlichkeit kann durch die weitere Optimierung der optischen Komponenten erreicht werden. Dies kann z. B. durch den Austausch der verwendeten T-Stücke zur Lichtkopplung erfolgen (siehe Kapitel 7.3.2). Die T-Stücke lassen zurzeit nur die Abnahme von Raman-Streulicht zu, das den Flüssigkern-Lichtwellenleiter in einem Winkel unterhalb von 10° verlässt. Das Raman-Streulicht tritt allerdings mit einem Öffnungswinkel größer 28° aus dem Flüssigkern-Lichtwellenleiter aus. Durch die Entwicklung einer speziell angepassten Lichtkoppeloptik könnten zusätzliche 18° Raumwinkel zur Raman-Streulicht-Abnahme ausgenutzt werden.

Eine weitere (indirekte) Möglichkeit, die Empfindlichkeit zu steigern, ist die Optimierung der chromatographischen Trennung. Viele der Substanzen eluierten mit Peak-Breiten deutlich größer 60 Sekunden auf der Basislinie von der Trennsäule. Wie in Kapitel 5.1 dargelegt, kann die Peak-Konzentration bei Halbierung der Elutionszeit einer Substanz von der Säule verdoppelt werden.

Zellvolumen

Um einer Peak-Verbreiterung nach chromatographischer Trennung vorzubeugen wurde im Vorfeld das maximal zulässige Zellvolumen der Raman-Durchflusszelle auf 5 μL festgelegt (siehe Kapitel 5.3). Die für die Kopplung entwickelte Durchflusszelle besitzt ein Gesamtvolumen von 4,7 μL . Das anteilige Totvolumen wurde auf 0,64 μL berechnet. Das geforderte Zellvolumen von 5 μL konnte demnach leicht unterschritten werden.

Druckstabilität

Die Anforderung an die Raman-Durchflusszelle hinsichtlich ihrer Druckstabilität wird maßgeblich vom dem zusätzlichen Gegendruck bestimmt, der durch die Verbindungskapillare zwischen Durchflusszelle und Oxidationsreaktor aufgebaut wird. In der Gesamtkopplung betrug dieser Kapillarweg ca. 200 cm. Mit einem Kapillarinne Durchmesser von 127 μm und einer Flussrate von 0,5 mL min^{-1} lag der Gegendruck bei 26,1 bar. Die Raman-Durchflusszelle wurde über einen Zeitraum von drei Monaten ausgiebig getestet und zeigte sich durchgängig druckstabil. In einigen Messreihen wurde die Flussrate sogar auf 1 mL min^{-1} erhöht – der Gegendruck stieg entsprechend auf 52,2 bar an. Auch bei diesem Gegendruck konnte kein Druckabfall oder austretende Flüssigkeit beobachtet werden.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Raman-Messungen hinsichtlich der Intensität und Lage der Raman-Banden kann allgemein als sehr hoch eingestuft werden. Diese Aussage gilt insbesondere dann, wenn in einer Messung mehrere Raman-Signale einer Substanz bei entsprechend hoher Analyt-Konzentration erfasst werden können. Die Steroid-Messungen konnten nicht immer reproduzierbar dargestellt werden, da hier nur vereinzelte Raman-Signale bei geringem Signal-Rausch-Verhältnis detektiert wurden.

Ein messtechnisches Problem mit der Reproduzierbarkeit zeigte sich, wenn die mobile Phase vor der Anwendung nicht ausreichend entgast wurde. In diesem Fall sammelte sich eine Luftblase innerhalb des T-Stück 1 im Totvolumen unterhalb des Einkoppelfensters an (siehe Kapitel 7.3.2.4) und führte zu einem sofortigen Signal-Einbruch bei der Raman-Detektion. Die Luftblase konnte erst durch mehrstündiges Spülen mit dem Laufmittel entfernt werden. An dieser Stelle zeigt sich weiterer Optimierungsbedarf, der im Zuge der eingangs erwähnten Entwicklung einer speziellen Lichtkoppeloptik gelöst werden kann.

10 Literaturverzeichnis

[1] Europäische Kommission, Zoll: Kommission und Mitgliedstaaten gehen gemeinsam gegen Produkt- und Markenpiraterie vor, IP/05/147, (2005).

[2] Jochmann M.A., Kujawinski D.M., Zhang L., Wolbert B., Federherr E., Teutenberg T., Wiese S., Haun J., Doktor K., Bettermann H., Fischer B., Entwicklung eines flüssigchromatografischen Analyseverfahrens zur Struktur- und Identitätsaufklärung in komplexen wässrigen Medien mittels gekoppelter Raman/irMS Detektoren, Schlussbericht IGF Vorhaben Nr. 16120 N, (2012).

[3] Union E.C.-T.a.C., Report on EU Customs Enforcement of Intellectual Property Rights, Results at the European Border - 2013, (2014).

[4] Cockburn R., Newton P.N., Kyeremateng Agyarko E., Akunyili D., White N.J., The Global Threat of Counterfeit Drugs: Why Industry and Governments Must Communicate the Dangers PLoS Medicine 2(2005) 302-308.

[5] Wildemann H., Ann C., Broy M., Günthner W.A., Lindemann U., Plagiatschutz: Handlungsspielräume der produzierenden Industrie gegen Produktpiraterie, TCW Transfer-Centrum GmbH & Co. KG, (2007).

[6] World Health Organization (WHO), Internetartikel: Substandard and counterfeit medicines, [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs275/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/), Zugriffsdatum: 14.12.2014.

[7] Muccio Z., Jackson G.P., Isotope ratio mass spectrometry, Analyst, 134 (2009) 213-222.

[8] Zhang L., Kujawinski D.M., Federherr E., Schmidt T.C., Jochmann M.A., Caffeine in Your Drink: Natural or Synthetic?, Anal. Chem., 84 (2012) 2805-2810.

[9] Schmidt T.C., Zwank L., Elsner M., Berg M., Meckenstock R.U., Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378 (2004) 283-300.

[10] Referentenentwurf des Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz, des Bundesministeriums des Innern und des Bundesministeriums für Gesundheit, Entwurf eines Gesetzes zur Bekämpfung von Doping im Sport (2014).

[11] Vanhoenacker G., Pereira A.D., Kotsuka T., Cabooter D., Desmet G., Sandra P., Evaluation of a new polymeric stationary phase with reversed-phase properties for high temperature liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 3217-3222.

- [12] Sessions A.L., Isotope-ratio detection for gas chromatography, Review, Journal of Separation Science, 29 (2006) 1946-1961.
- [13] Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W., Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Edition, John Wiley & Sons, (2010).
- [14] Teutenberg T., High-Temperature Liquid Chromatography, Royal Society of Chemistry, (2010).
- [15] Uematsu M., Franck E.U., Static Dielectric Constant of Water and Steam, J. Phys. Chem. Ref. Data 9, Nr. 4 (1980) 1291-1306.
- [16] Compton A.H., A Quantum Theory of the Scattering of X-rays by Light Elements, Physical Review, 21 (1923) 483-502.
- [17] Smekal A., Zur Quantentheorie der Dispersion, Naturwissenschaften, 11 (1923) 873-875.
- [18] Raman C.V., A New Radiation, Indian Journal of Physics, 2 (1928) 387-398.
- [19] Raman C.V., Krishnan K.S., A New Type of Secondary Radiation, Nature, 121 (1928) 501-502.
- [20] Mandelstam L.I., Landsberg G.S., New phenomenon in scattering of light (preliminary report), Journal of the Russian Physico-Chemical Society, Physics Section, 60 (1928) 335.
- [21] Mandelstam L.I., Landsberg G.S., Eine neue Erscheinung bei der Lichtzerstreuung in Krystallen, Naturwissenschaften, 16 (1928) 557.
- [22] Mandelstam L.I., Landsberg G.S., Über die Lichtzerstreuung in Kristallen, Zeitschrift für Physik, 50 (1928) 769.
- [23] Schrader B., Infrared and Raman Spectroscopy - Methods and Applications, Wiley-VCH, 1995.
- [24] Nier A.O., Gulbransen E.A., Variations in the Relative Abundance of the Carbon Isotopes, J. Am. Chem. Soc., 61 (1939) 697-698.
- [25] Flenker U., Guntner U., Schanzer W., delta C-13-Values of endogenous urinary steroids, Steroids, 73 (2008) 408-416.
- [26] Rivier L., New trends in doping analysis, CHIMIA, 56 (2002) 84-90.

-
- [27] NicDaeid N., Meier-Augenstein W., Feasibility of source identification of seized street drug samples by exploiting differences in isotopic composition at natural abundance level by GC/MS as compared to isotope ratio mass spectrometry (IRMS), *Forensic Science International*, 174 (2008) 259-261.
- [28] Sewenig S., Fichtner S., Holdermann T., Fritschi G., Neumann H., Determination of delta $\delta^{13}\text{C}$ (V-PDB) and delta $\delta^{15}\text{N}$ (AIR) values of cocaine from a big seizure in Germany by stable isotope ratio mass spectrometry *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 43 (2007) 275-280.
- [29] Benson S., Lennard C., Maynard P., Roux C., Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry - A review, *Forensic Science International*, 157 (2006) 1-22.
- [30] Ostle N., Briones M.J.I., Ineson P., Cole L., Staddon P., Sleep D., Isotopic detection of recent photosynthate carbon flow into grassland rhizosphere fauna, *Soil Biology & Biochemistry*, 39 (2007) 768-777.
- [31] Rembacz K.P., Faber K.N., Stellaard F., Selective conversion of plasma glucose into CO₂ by *Saccharomyces cerevisiae* for the measurement of C-13 abundance by isotope ratio mass spectrometry: proof of principle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21 (2007) 3169-3174.
- [32] Schmidt T.C., Schirmer M., Weiß H., Haderlein S.B., Microbial degradation of methyl tert-butyl ether and tert-butyl alcohol in the subsurface, *Journal of Contaminant Hydrology*, 70 (2004) 173-203.
- [33] de la Torre X., González J.C., Pichini S., Pascual J.A., Segura J., C-13/C-12 isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (2001) 645-650.
- [34] Eek K.M., Sessions A.L., Lies D.P., Carbon-isotopic analysis of microbial cells sorted by flow cytometry, *Geobiology*, 5 (2007) 85-95.
- [35] Miura C., Tanaka F., Determination of C-13 content in starch from paddy rice plants using stable isotope ratio mass spectrometry, *Soil Science and Plant Nutrition*, 53 (2007) 606-611.
- [36] Molkenkin J., Meisel H., Lehmann I., Rehbein H., Identification of organically farmed Atlantic salmon by analysis of stable isotopes and fatty acids, *European Food Research and Technology*, 224 (2007) 535-543.
- [37] Heaton K., Kelly S.D., Hoogewerff J., Woolfe M., Verifying the geographical origin of beef: The application of multi-element isotope and trace element analysis., *Food Chemistry*, 107 (2008) 506-515.

- [38] Bichon E., Kieken F., Cesbron N., Monteau F., Prévost S., André F., Le Bizec B., Development and application of stable carbon isotope analysis to the detection of cortisol administration in cattle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21 (2007) 2613-2620.
- [39] Förstel H., The natural fingerprint of stable isotopes - use of IRMS to test food authenticity, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 541-544.
- [40] Godin J.P., Fay L.B., Hopfgartner G., Liquid chromatography combined with mass spectrometry for ¹³C isotopic analysis in life science research, *Mass Spectrometry Reviews*, 26 (2007) 751-774.
- [41] Hong T.D.N., Jouan M., Dao N.Q., Bouraly M., Mantsi F., Coupling of high-performance liquid chromatography with Raman spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 743 (1996) 323-327.
- [42] Steinert R., H. B., Kleinermanns K., Identification of Xylene Isomers in High-Pressure Liquid Chromatography Eluates by Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 51 (1997) 1644-1647.
- [43] Steinert R., Bettermann H., Kleinermanns K., Identifications of Compounds in HPLC-Eluates by Raman Spectroscopy – Feature Article, *Int.J.Vibr.Spec.*, 2 (1998).
- [44] Walrafen G.E., Stone J., Intensification of Spontaneous Raman Spectra by Use of Liquid Core Optical Fibers, *Appl. Spectrosc.*, 26 (1972) 585-589.
- [45] Ross H.B., McClain W.M., Liquid Core Optical Fibers in Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 35 (1981) 439-442.
- [46] Schwab S.D., McCreery R.L., Remote, Long-Pathlength Cell for High-Sensitivity Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 41 (1987) 126-130.
- [47] Lowry J.H., Mendlowitz J.S., Subramanian N.S., OPTICAL CHARACTERISTICS OF TEFLON AF(R) FLUOROPLASTIC MATERIALS, *Optical engineering*, 31 (1992) 1982-1985.
- [48] Buck W.H., Resnick P.R., Properties of Amorphous Fluoropolymers Based on 2,2-Bistrifluoromethyl-4,5-Difluoro-1,3-Dioxole, (1993).
- [49] DuPont Fluoroproducts W.D., DuPont™ Teflon® AF AMORPHOUS FLUOROPOLYMERS - Product Information, (2010).
- [50] Attkorn R., Koev I., Pelletier M.J., Raman Performance Characteristics of Teflon® -AF 2400 Liquid-Core Optical-Fiber Sample Cells, *Appl. Spectrosc.*, 53 (1999) 1169-1176.

-
- [51] Altkorn R., Koev I., VanDuyne R.P., Litorja M., Low-loss liquid-core optical fiber for low-refractive-index liquids: fabrication, characterization, and application in Raman spectroscopy, *Appl. Optics*, 36 (1997) 8992-8998.
- [52] Dress P., Belz M., Klein K.F., Grattan K.T.V., Franke H., Physical analysis of teflon coated capillary waveguides, *Sens. Actuator B-Chem.*, 51 (1998) 278-284.
- [53] Holtz M., Dasgupta P.K., Zhang G.F., Small-volume raman spectroscopy with a liquid core waveguide, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2934-2938.
- [54] Altkorn R., Malinski M.D., van Duyne R.P., Koev I., Intensity Considerations in Liquid Core Optical Fiber Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 55 (2001) 373-381.
- [55] Qi D., Berger A.J., Quantitative Analysis of Raman Signal Enhancement from Aqueous Samples in Liquid Core Optical Fibers, *Appl. Spectrosc.*, 58 (2004) 1165-1171.
- [56] Pelletier M.J., Altkorn R., Efficient Elimination of Fluorescence Background from Raman Spectra Collected in a Liquid Core Optical Fiber, *Appl. Spectrosc.*, 54 (2000) 1837-1841.
- [57] Dijkstra R.J., Bader A.N., Hoornweg G.P., Brinkman U.A.T., Gooijer C., On-line coupling of column liquid chromatography and raman spectroscopy using a liquid core waveguide, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4575-4579.
- [58] Marquardt B.J., Vahey P.G., Synovec R.E., Burgess L.W., A Raman waveguide detector for liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4808-4814.
- [59] Dijkstra R.J., Slooten G.J., Stortelder A., Buijs J.B., Ariese F., Brinkman U.A.T., Gooijer G., Liquid-core waveguide technology for coupling column liquid chromatography and Raman spectroscopy, *Journal of Chromatography A*, 918 (2001) 25-36.
- [60] Tanikkul S., Jakmunee J., Rayanakorn M., Grudpan K., Marquardt B.J., Gross G.M., Prazen B.J., Burgess L.W., Christian G.D., Synovec R.E., Characterization and use of a Raman liquid-core waveguide sensor using preconcentration principles, *Talanta*, 59 (2003) 809-816.
- [61] Dijkstra R.J., Boelens H.F.M., Westerhuis J.A., Ariese F., Brinkman U.A.T., Gooijer C., Hyphenation of column liquid chromatography and Raman spectroscopy via a liquid-core waveguide: chemometrical elimination of spectral eluent background, *Anal. Chim. Acta*, 519 (2004) 129-136.

[62] Dallas T., Dasgupta P.K., Light at the end of the tunnel: recent analytical applications of liquid-core waveguides, *TrAC. Trends in analytical chemistry*, 23 (2004) 385-392.

[63] Dijkstra R.J., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T., Raman spectroscopy as a detection method for liquid-separation techniques, *Trac-Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 304-323.

[64] Zhang L.J., Kujawinski D.M., Jochmann M.A., Schmidt T.C., High-temperature reversed-phase liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 25 (2011) 2971-2980.

[65] Swartz M., HPLC Detectors: A Brief Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33 (2010) 1130-1150.

[66] Newport Spectra-Physics: Handbuch Millennia Pro 2s Lasersystem.

[67] Kaiser Optical Systems: Handbuch HoloSpec f/1.8i VPT Monochromatorsystem.

[68] Andor Technology: Handbuch Newton DU920P-BV CCD-Detektor.

[69] Schrader B., Steigner E., Raman spectroscopy and molecular structure. I. Raman and infrared spectra of steroids, *Justus Liebigs Ann Chem*, 735 (1970) 6-14.

[70] Steigner E., Schrader B., Raman spectroscopy and molecular structure. II. Elucidation of structure of steroids by raman spectroscopy, *Justus Liebigs Ann Chem*, 735 (1970) 15-22.

[71] IUPAC, Moss G.P., NOMENCLATURE OF STEROIDS (Recommendations 1989), *Pure & Appl. Chem.*, 61 (1989) 1783-1822.

[72] Technologies P., Precision Windowed Silica Capillary Tubing, in, 2011.

[73] Yang M.K., French R.H., Tokarsky E.W., Optical properties of Teflon (R) AF amorphous fluoropolymers, *J. Micro-Nanolithogr. MEMS MOEMS*, 7 (2008).

[74] Edwards H.G.M., Munshi T., Anstis M., Raman spectroscopic characterisations and analytical discrimination between caffeine and demethylated analogues of pharmaceutical relevance, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61 (2005) 1453-1459.

[75] Rothschild M., Sedlacek J.H.C., Laser-induced damage in pellicles at 193 nm, *SPIE, Optical/Laser Microlithography V*, 1674 (1992).

11 Anhang

11.1 Basiskomponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus

Tabelle 11-1: Spezifikationen der Basiskomponenten.

Laser	
Hersteller:	Newport / Spectra-Physics
Modell:	Millennia Pro 2s (diodengepumpter Festkörperlaser)
Leistung (cw):	> 2 W
Wellenlänge:	532 nm (frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser)
TEM-Mode:	TEM ₀₀ , M ² < 1,1
Strahldurchmesser:	2,3 mm ± 10 %
Strahldivergenz:	< 0,5 mrad
Polarisation:	> 100 : 1, vertikal
Leistungsstabilität:	± 1 %
Rauschen:	< 0,04 % rms



Abbildung 11-1: Spectra-Physics Millennia Pro 2s diodengepumpter Festkörperlaser.

Monochromator	
Hersteller:	Kaiser Optical Systems
Modell:	HoloSpec f/1.8i VIS
Gitter:	HSG-532-LF
Spektralbereich:	-29 bis 2388 cm ⁻¹
Durchschnittliche reziproke lineare Dispersion:	2,4 cm ⁻¹ / pixel
Spaltbreite:	100 µm



Abbildung 11-2: Kaiser Optical Systems HoloSpec f/1.8i VIS Monochromator (offen dargestellt).

Detektor	
Hersteller:	Andor Technology
Modell:	Newton DU920P-BV
Aktive Pixel:	1024 x 255
Pixel Größe:	26 x 26 µm
Image Fläche:	26,7 x 6,7 mm
Min. Temperatur:	-80 °C / -100 °C bei zusätzlicher Wasserkühlung
Zusatzoption:	VIS Entspiegelung
Quanteneffizienz:	> 95 % bei 550 nm



Abbildung 11-3: Andor Newton DU920P CCD-Kamera.

11.2 Optische Komponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus

Tabelle 11-2: Spezifikationen der optischen Komponenten des Raman-Spektrometer-Aufbaus.

Mikroskop-Objektiv 100X	
Hersteller:	Nikon Instruments Europe B.V.
Modell:	CF IC EPI Plan SLWD 100X
Artikel-Nr.:	MUL04900
Vergrößerung:	100-fach
Numerische Apertur:	0,73
Öffnungswinkel:	93,77°
Arbeitsabstand:	4,70 mm
Brennweite:	2,00 mm
Fokustiefe:	0,52 µm
Gewicht:	135 g

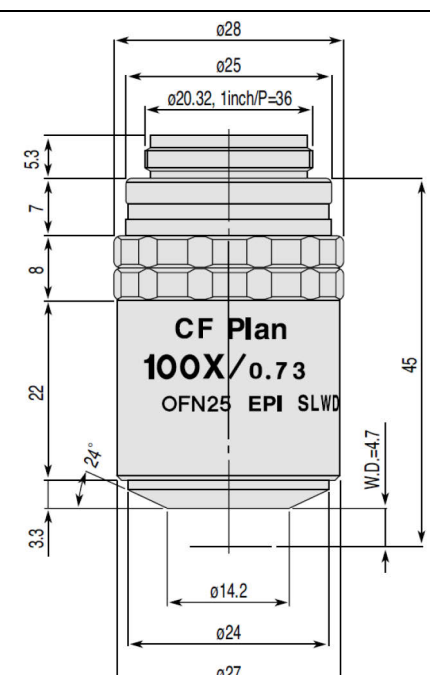


Abbildung 11-4: Nikon CF IC EPI Plan SLWD 100X.

Mikroskop-Objektiv 10X	
Hersteller:	Nikon Instruments Europe B.V.
Modell:	CF IC EPI Plan SLWD 10XA
Artikel-Nr.:	MUL04101
Vergrößerung:	10-fach
Numerische Apertur:	0,21
Öffnungswinkel:	24,24°
Arbeitsabstand:	20,30 mm
Brennweite:	20,00 mm
Fokustiefe:	6,24 µm
Gewicht:	85 g

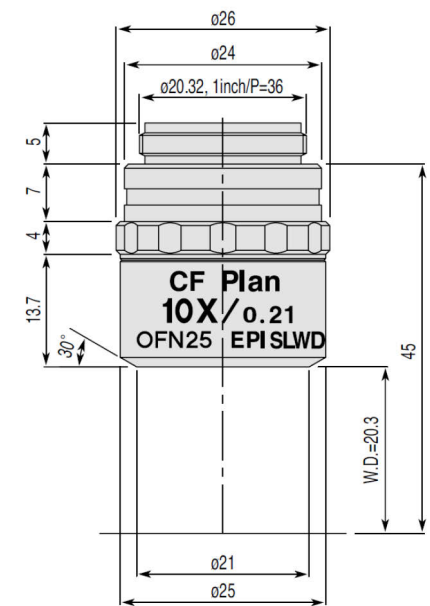


Abbildung 11-5: Nikon CF IC EPI Plan SLWD 10XA.

Dichroitischer Strahlteiler

Hersteller:	Semrock, Inc. / IDEX Corporation
Modell:	532 nm RazorEdge Dichroic™ laser-flat beamsplitter
Artikel-Nr.:	LPD01-532RU-25
Design-Wellenlänge:	532 nm
Einsatz-Winkel:	45°
Reflexion:	$R_{\text{abs}} > 94\%$ bei 532 nm
Reflexion (p-pol.):	$R_{\text{abs}} > 90\%$ bei 532 nm
Reflexion (s-pol.):	$R_{\text{abs}} > 98\%$ bei 532 nm
Transmission:	$T_{\text{avg}} > 93\%$ von 538,9 nm bis 824,8 nm
Übergangsbreite:	5,3 nm \cong 186 cm^{-1}
Größe:	25 mm x 25 mm x 3,5 mm

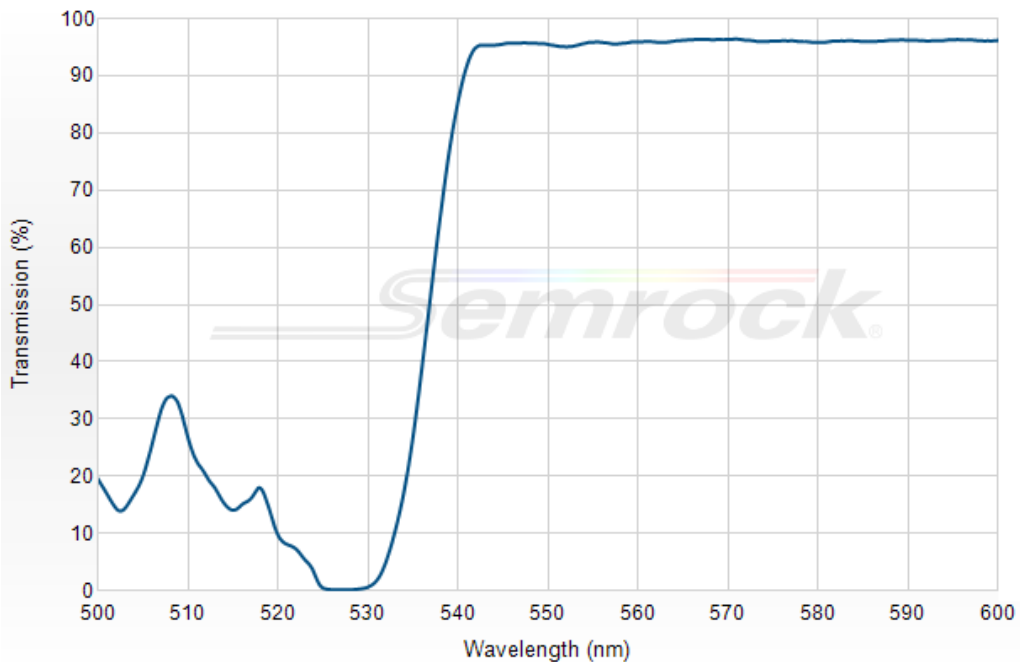


Abbildung 11-6: Transmissionskurve Semrock „532 nm RazorEdge Dichroic™ laser-flat beamsplitter“ bei 45° Einfallswinkel.

Quelle: Semrock, Inc / IDEX Corporation Internetpräsenz:

<http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=LPD01-532RU-25>, Zugriffsdatum: 09.03.2013.

Achromatisches Lensensystem

Hersteller:	Edmund Optics GmbH
Modell:	Achromat, 25mm D. x 35mm Brennweite, VIS 0° beschichtet
Artikel-Nr.:	47-634
Design-Wellenlänge:	VIS
Einsatz-Winkel:	0°
Reflexion:	$R_{\text{avg}} \leq 0.4\%$ von 425 nm bis 675 nm
Durchmesser, Dia.:	25,0 mm
Freie Apertur:	24,0 mm
Brennweite, EFL:	35,0 mm $\pm 2\%$
Hintere Brennweite, BFL:	27,55 mm $\pm 2\%$
Randdicke, ET:	9,47 mm
Mittendicke, CT 1:	11,0 mm $\pm 0,2$ mm
Mittendicke, CT 2:	2,5 mm $\pm 0,2$ mm
Radius, R_1 :	24,47 mm
Radius, R_2 :	-16,49 mm
Radius, R_3 :	-131,65 mm

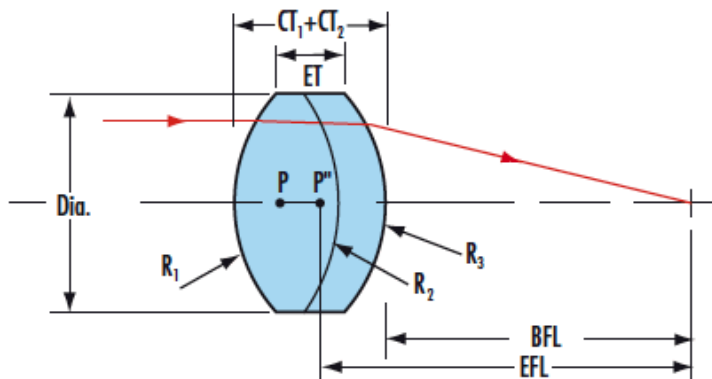
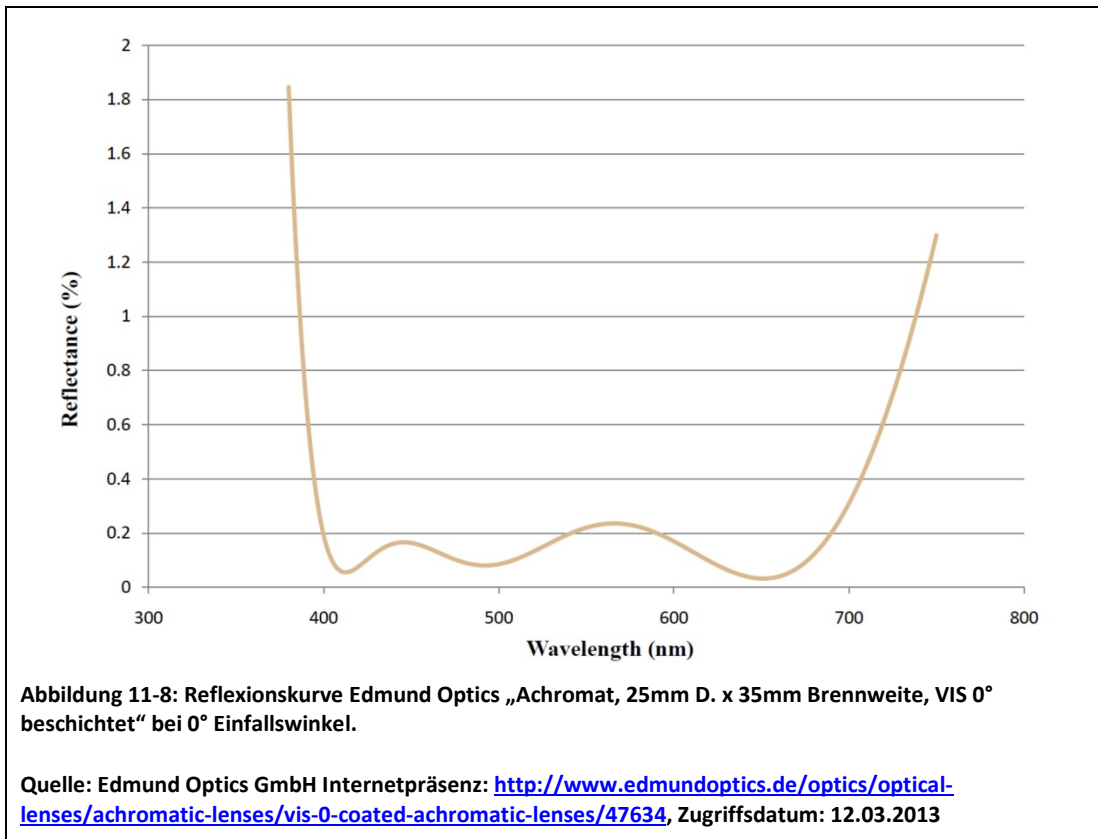


Abbildung 11-7: Technische Zeichnung Edmund Optics „Achromat, 25mm D. x 35mm Brennweite, VIS 0° beschichtet“.

Quelle: Edmund Optics GmbH Internetpräsenz: <http://www.edmundoptics.de/optics/optical-lenses/achromatic-lenses/vis-0-coated-achromatic-lenses/47634>, Zugriffsdatum: 12.03.2013.



Laserspiegel

Hersteller:	Qioptic Photonics GmbH & Co. KG
Modell:	Planspiegel mit dielektrischer Beschichtung DLHS 532 nm
Artikel-Nr.:	G340752000
Design-Wellenlänge:	532 nm
Einsatz-Winkel:	0° und 45°
Reflexion:	$R_{\text{abs}} > 99,8 \%$ bei 532 nm
Transmission:	$T_{\text{avg}} > 90 \%$ ab 750 nm
Planität:	$\lambda / 10$
Größe:	31,5 mm x 22,4 mm x 5 mm

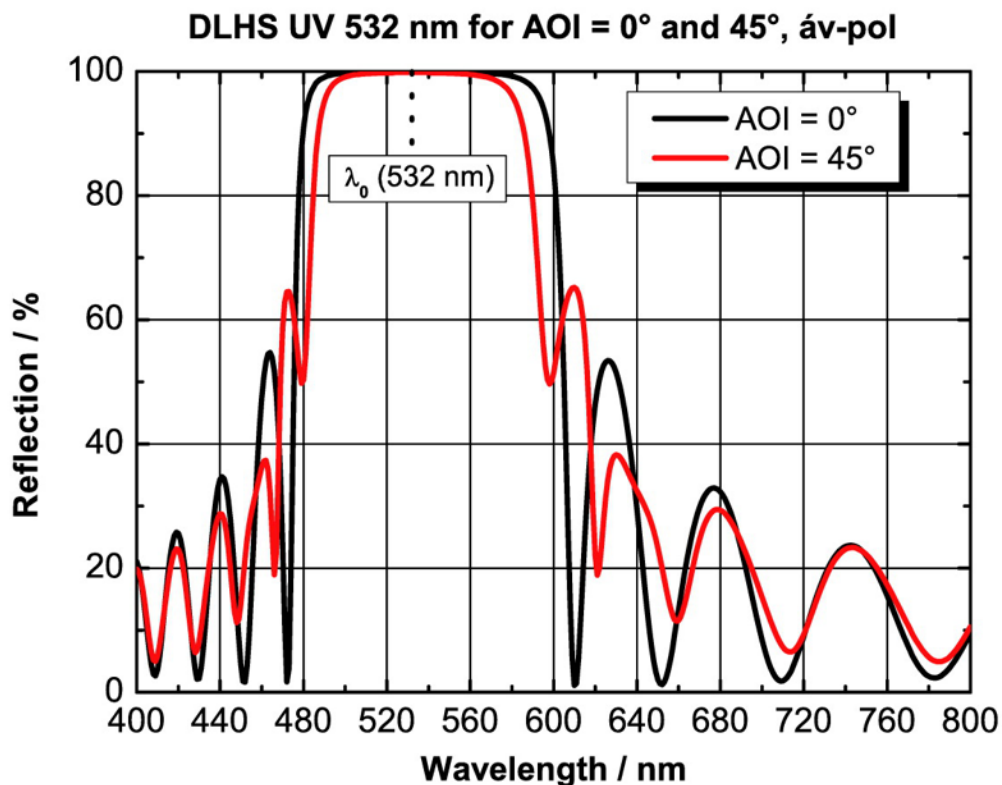


Abbildung 11-9: Reflexionskurven Qioptic „Planspiegel mit dielektrischer Beschichtung DLHS 532 nm“ bei 0° und 45° Einfallswinkel.

Quelle: Qioptics Photonics GmbH & Co. KG Internetpräsenz: <http://www.qioptiq-shop.com/Praezisionsoptik/Spiegel/Planspiegel/Planspiegel-mit-dielektrischer-Beschichtung-DLHS-532-nm.html>, Zugriffsdatum: 09.03.2013.

VIS-Spiegel

Hersteller:	Qioptic Photonics GmbH & Co. KG
Modell:	Planspiegel RAGV silberbeschichtet
Artikel-Nr.:	G340623000
Design-Wellenlänge:	450 nm bis 12 μ m
Einsatz-Winkel:	0° bis 60° (unpolarisiert)
Reflexion:	$R_{abs} > 92\%$ von 400 nm bis 500 nm $R_{abs} > 96\%$ von 500 nm bis 780 nm $R_{abs} > 97\%$ von 780 nm bis 10 μ m
Planität:	$\lambda / 2$
Größe:	31,5 mm x 22,4 mm x 3,5 mm

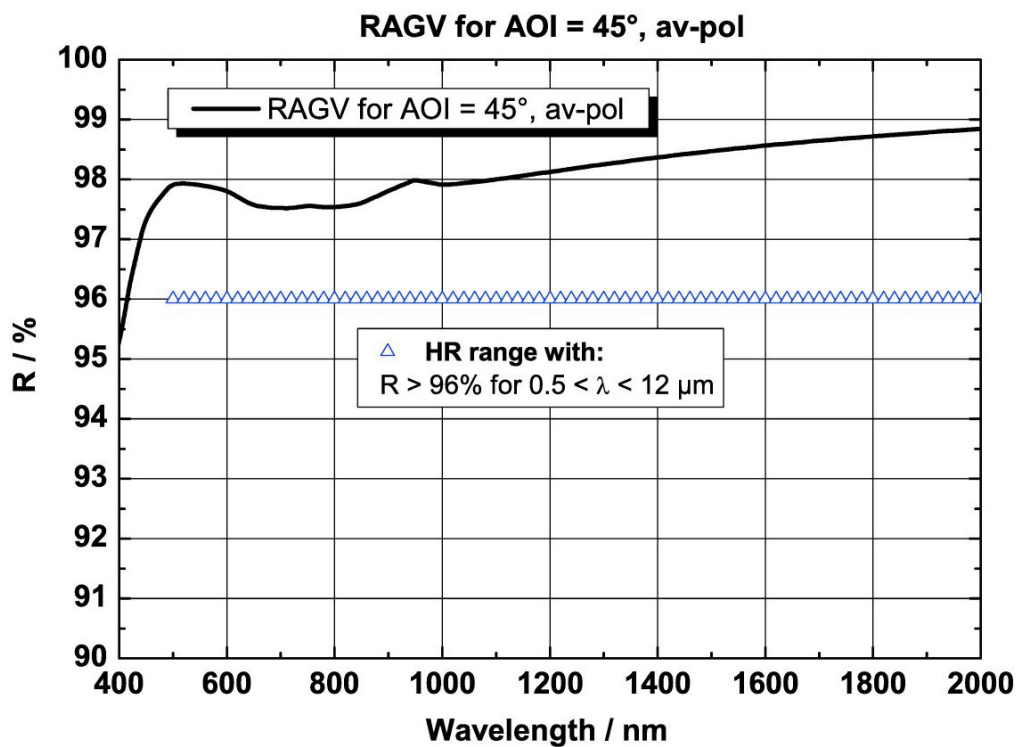


Abbildung 11-10: Reflexionskurve Qioptiq „Planspiegel RAGV silberbeschichtet“ bei 45° Einfallswinkel .

Quelle: Qioptics Photonics GmbH & Co. KG Internetpräsenz: <http://www.qioptiq-shop.com/Praezisionsoptik/Spiegel/Planspiegel/Planspiegel-ovale-Form-Standardqualitaet-silberbeschichtet.html>, Zugriffsdatum: 09.03.2013.

Langpass Kantenfilter im Monochromator

Hersteller:	Edmund Optics GmbH
Modell:	550nm hochpräziser Langpassfilter, 25mm Durchmesser
Artikel-Nr.:	62-984
Durchmesser:	25,0 mm
freie Apertur:	> 80 %
Dicke:	3 mm
Toleranz Dicke:	± 0,1 mm
Sperrbereich:	200 bis 539 nm
Transmissionsbereich:	560 bis 1650 nm
Transmission:	≥ 91 % im Durchschnitt
Grenzwellenlänge:	550 nm

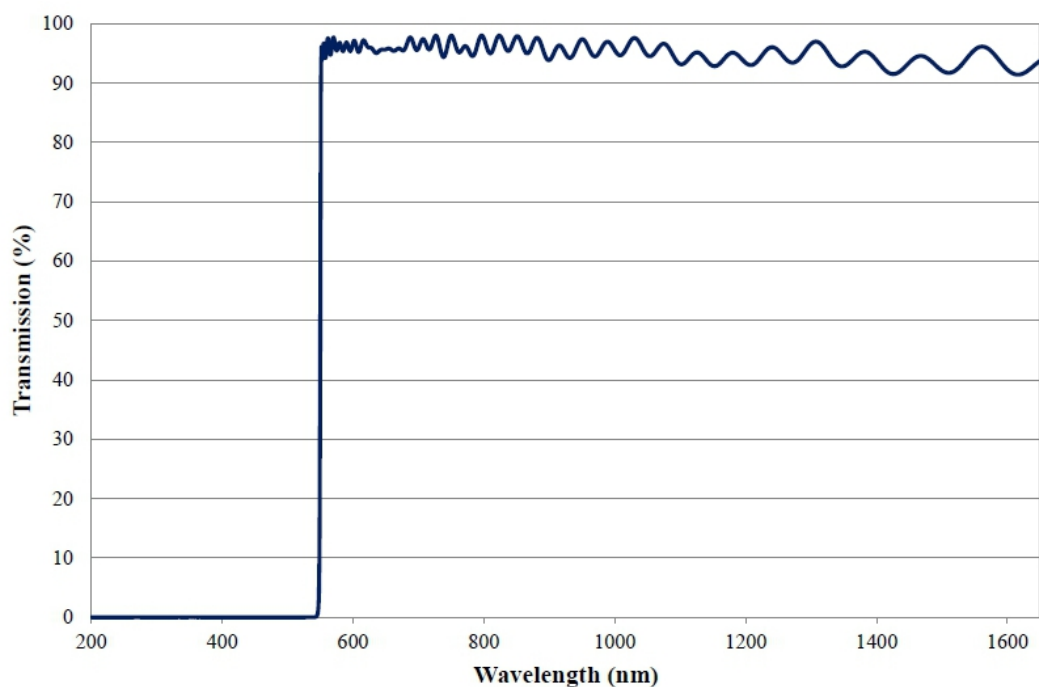


Abbildung 11-11: Transmissionskurve Edmund Optics „550nm hochpräziser Langpassfilter, 25mm Durchmesser“.

Quelle: Edmund Optics GmbH Internetpräsenz: <http://www.edmundoptics.de/optics/optical-filters/longpass-edge-filters/high-performance-od-4-longpass-filters/62984>, Zugriffsdatum: 13.12.2014.

11.3 DuPont™ Teflon® AF

Teflon® AF (AF: Amorphous Fluoropolymer) ist der Handelsname spezieller Hochleistungspolymere der Firma DuPont™, die erstmals 1989 synthetisiert wurden. Die Grundkomponente bildet das Monomer 2,2-bistrifluormethyl-4,5-difluor-1,3-dioxol (PDD), welches typischerweise mit Tetrafluorethylen (TFE) copolymerisiert wird (siehe Abbildung 11-12). Neben TFE können aber auch andere fluorhaltige Monomere wie z. B. Vinylfluorid, Vinylidenfluorid oder Chlortrifluorethylen eingesetzt werden. Die Homopolymerisation von PDD ist ebenso möglich, wird allerdings aufgrund schwieriger Weiterverarbeitungsmöglichkeiten (stark limitierte Schmelz-Fließ-Eigenschaften, schlechte Löslichkeit) eher selten durchgeführt.

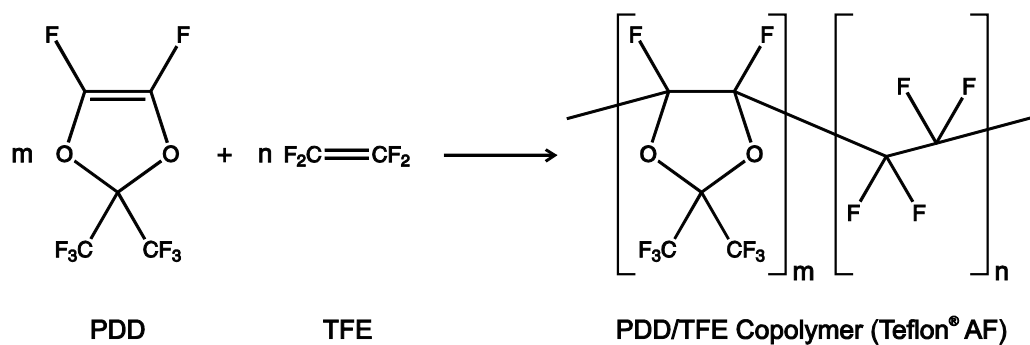


Abbildung 11-12: Copolymerisation von PDD und TFE zu Teflon® AF.

Gängige Teflon®-Sorten wie z. B. PTFE, PFA oder FEP sind alle semikristallin, d.h. es liegen sowohl kristalline als auch amorphe Domänen in der Polymerstruktur vor. Die Einbringung von PDD in die Polymerkette verhindert eine kristalline Anordnung von TFE und Co und führt dazu, dass Teflon® AF vollständig amorph ist. Dieser Zustand verhilft Teflon® AF zu einigen elektrischen und optischen Besonderheiten, die dieses Material außerordentlich interessant für industrielle Anwendungen und wissenschaftliche Zwecke macht. Dabei bleibt die exzellente chemische Resistenz und thermische Stabilität von herkömmlichem Teflon® auch bei Teflon® AF weitestgehend erhalten. Laut Herstellerangaben besitzt Teflon® AF die niedrigste Permittivität (dielektrische Leitfähigkeit) von allen bekannten Feststoffpolymeren [48]. Es besitzt einen extrem niedrigen Brechungsindex, eine hohe Gaspermeabilität und eine niedrige Wärmeleitfähigkeit. Teflon® AF ist optisch klar und zeigt eine hohe Transmission vom tiefen UV bis über den gesamten NIR-Bereich hinweg. Zudem ist es in verschiedenen perfluorierten Fluorkohlenwasserstoffen schon bei Raumtemperatur löslich.

Zurzeit bietet DuPont™ zwei Teflon® AF-Sorten an, die aus den Monomereinheiten PDD und TFE copolymerisiert sind – Teflon® AF 1600 und Teflon® AF 2400. Die Zahlen in der Bezeichnung beziehen sich auf die Glasübergangstemperaturen T_g der beiden Polymere. Teflon® AF 1600 besitzt eine Glasübergangstemperatur von 160 °C, die von Teflon® AF 2400 liegt bei 240 °C. Wie die Abbildung 11-13 zeigt, kann die Glasübergangstemperatur über den Anteil des PDD-Monomers eingestellt werden. Beim Teflon® AF 1600 liegt der PDD-Anteil im Copolymer bei 65 mol%, beim Teflon® AF 2400 liegt er bei 87 mol%. Prinzipiell kann der Anteil an PDD-Monomer frei zwischen 20 und 100 mol% gewählt werden. Somit lassen sich Glasübergangstemperaturen zwischen 80 und 335 °C einstellen. Unter 20 mol% PDD liegt das Copolymer dann nicht mehr vollständig amorph vor.

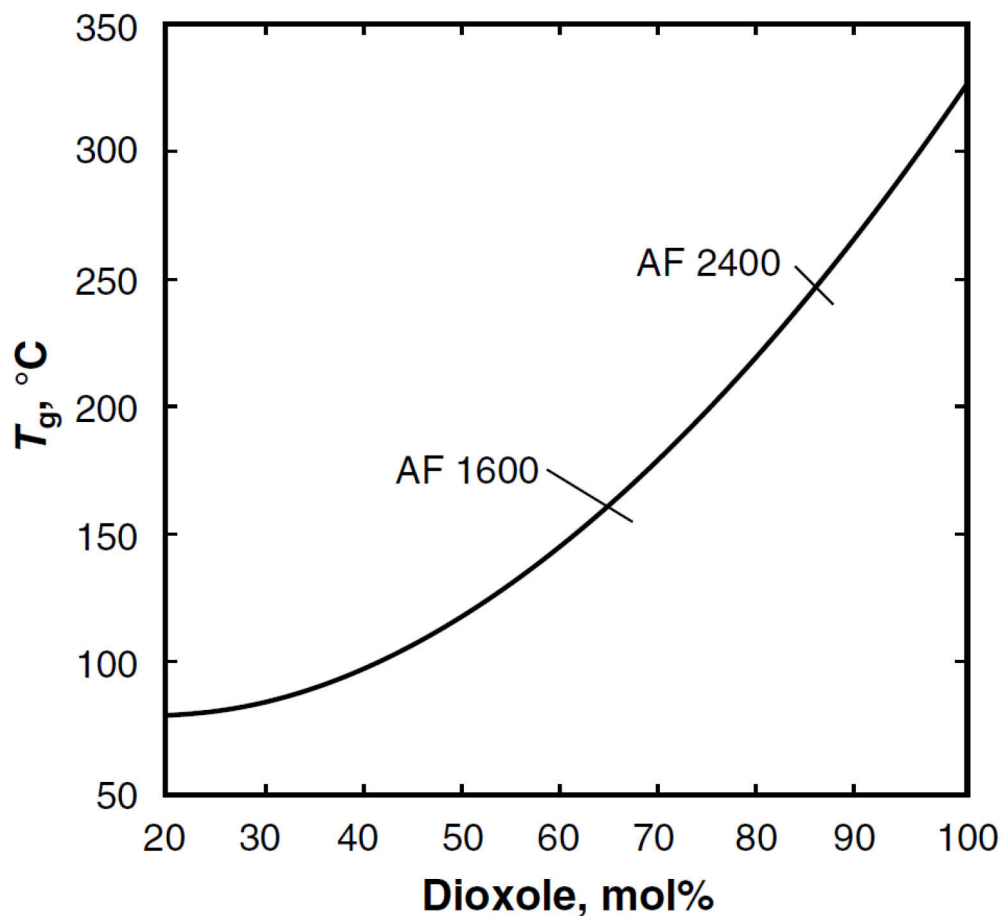


Abbildung 11-13: DuPont™ Teflon® AF (DPP/TFE-Copolymer) – Auftragung der Glasübergangstemperatur gegen den Anteil an PDD.

Mit Bezug auf diese Arbeit werden im Folgenden die optischen Fähigkeiten von Teflon® AF näher betrachtet. In Abbildung 11-14 ist das Transmissionsspektrum von Teflon® AF von 200 bis 2000 nm dargestellt. Der blaue Kurvenverlauf zeigt die Transmission durch eine 220 µm dicke Teflon® AF Schicht. Ab etwa 300 nm liegt die Transmission bereits über 90 % und erreicht im gesamten sichtbaren- und NIR-Bereich sogar mehr als 95 %.

Der rote Kurvenverlauf zeigt die Transmission durch eine 1,6 µm dicke Teflon® AF Schicht. Laut Untersuchungen von Rothschild und Sedlacek an Teflon® AF 1600 war bei Schichtdicken zwischen 0,2 und 2 µm und einer Transmissionswellenlänge von 200 nm keine Absorption messbar [75].

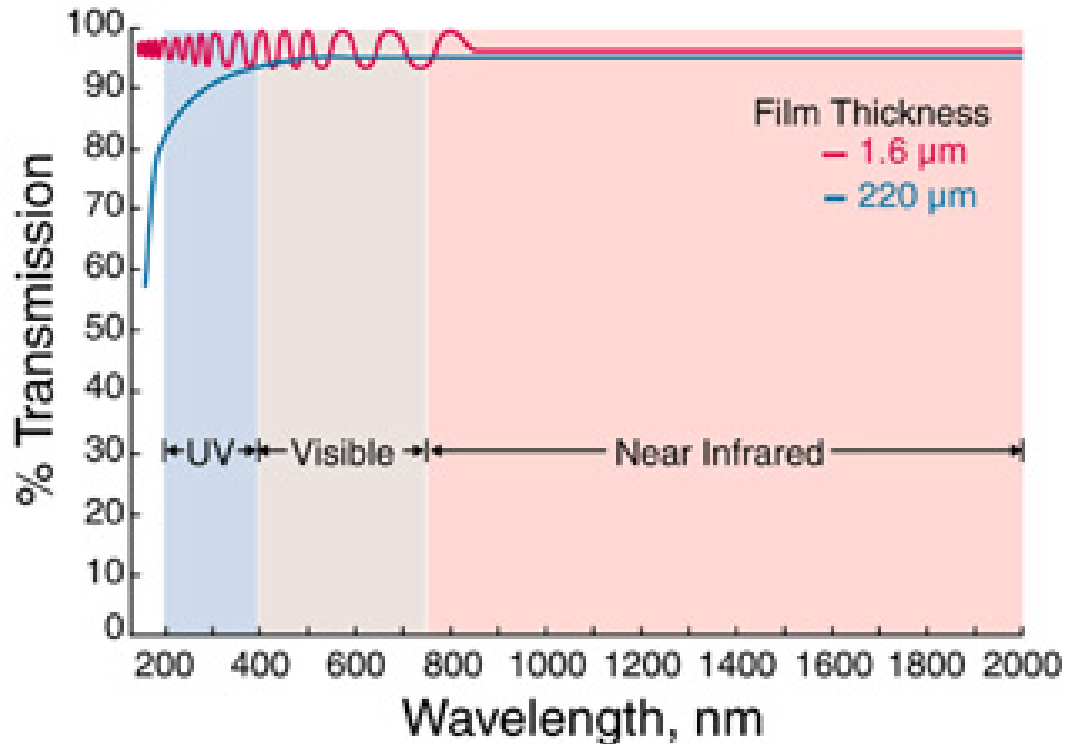


Abbildung 11-14: Wellenlängenabhängige Lichttransmission durch Teflon® AF Schichten.

Eine weitere Eigenschaft von Teflon® AF ist sein außergewöhnlich niedriger Brechungsindex. Wie die Abbildung 11-15 zeigt, ist dieser stark abhängig von der Glasübergangstemperatur T_g . Da, wie bereits in Abbildung 11-13 gezeigt, die Glasübergangstemperatur über den Anteil des PDD-Monomers im Copolymer variiert werden kann, ist somit auch der Brechungsindex von Teflon® AF gut einstellbar.

Laut DuPont™ liegt der Brechungsindex von Teflon® AF 1600 mit einer Glasübergangstemperatur von $T_g = 160\text{ °C}$ bei $n_D = 1,31$ (gemessen mittels Abbe-Refraktometer anhand der Natrium-D-Linie bei $\lambda = 589\text{ nm}$). Der von Teflon® AF 2400 mit einer Glasübergangstemperatur von $T_g = 240\text{ °C}$ liegt bei $n_D = 1,29$. Teflon® AF besitzt damit den niedrigsten Brechungsindex aller bekannten organischen Feststoffpolymere.

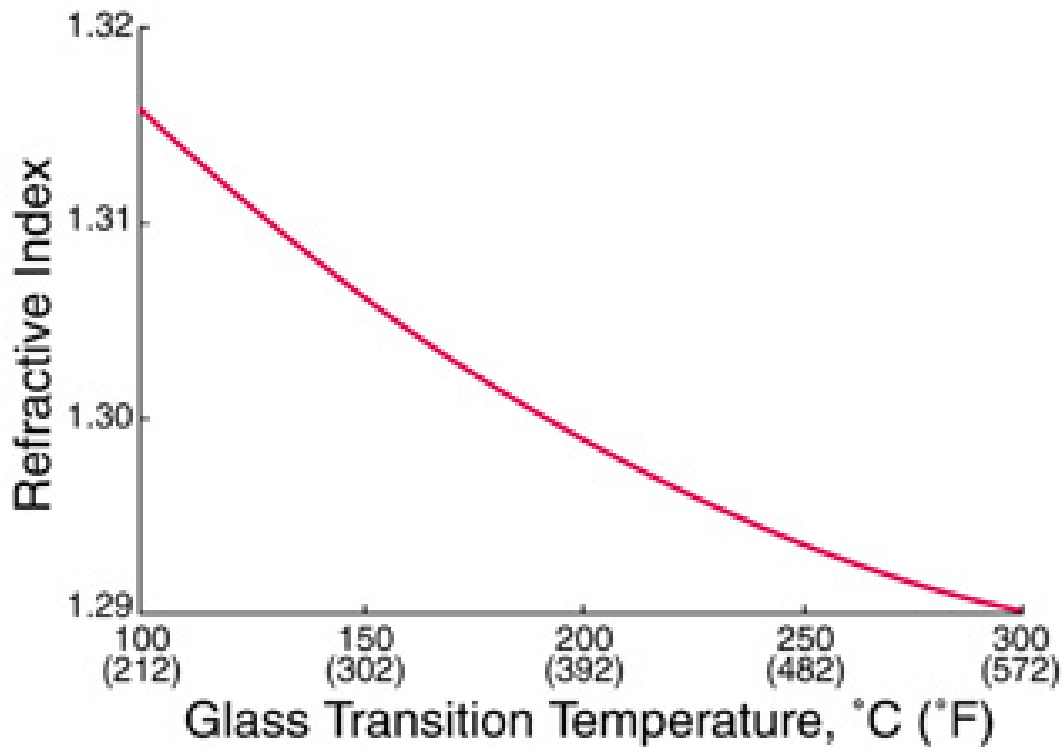


Abbildung 11-15: Abhängigkeit von Brechungsindex und Glasübergangstemperatur bei Teflon® AF.

Eine sehr genaue Vermessung der Brechungsindizes von Teflon® AF erfolgte 2008 durch Yang und French [73]. Abbildung 11-16 zeigt die Änderungen der Brechungsindizes von Teflon® AF 1300, 1601 und 2400 in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Dazu wurde ein spektraler Bereich von 145 bis 1555 nm erfasst.

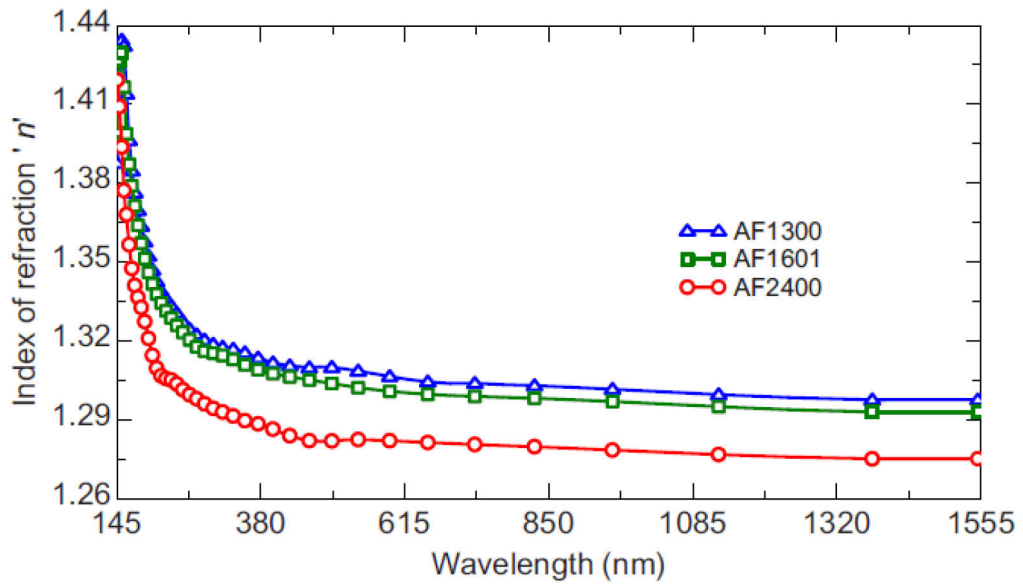


Abbildung 11-16: Abhängigkeit von Brechungsindex und Wellenlänge bei Teflon® AF 1300, 1601 und 2400.

Die Ergebnisse von Yang und French bestätigen die Produktangaben von DuPont™, dass der Brechungsindex von Teflon® AF mit steigender Glasübergangstemperatur abnimmt. Im sichtbaren- und NIR-Bereich liegen die gemessenen Werte sogar deutlich unter den Herstellerangaben.

11.4 Verwendete Substanzen – Datenblätter und Raman-Spektren

11.4.1 Lebensmittelzusatzstoffe

Tabelle 11-3: Coffein – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

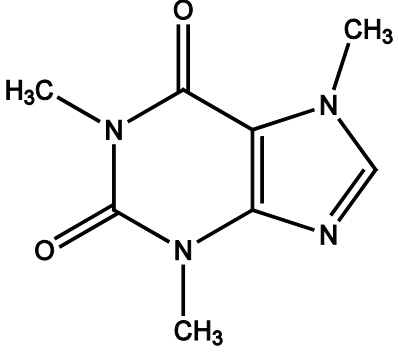
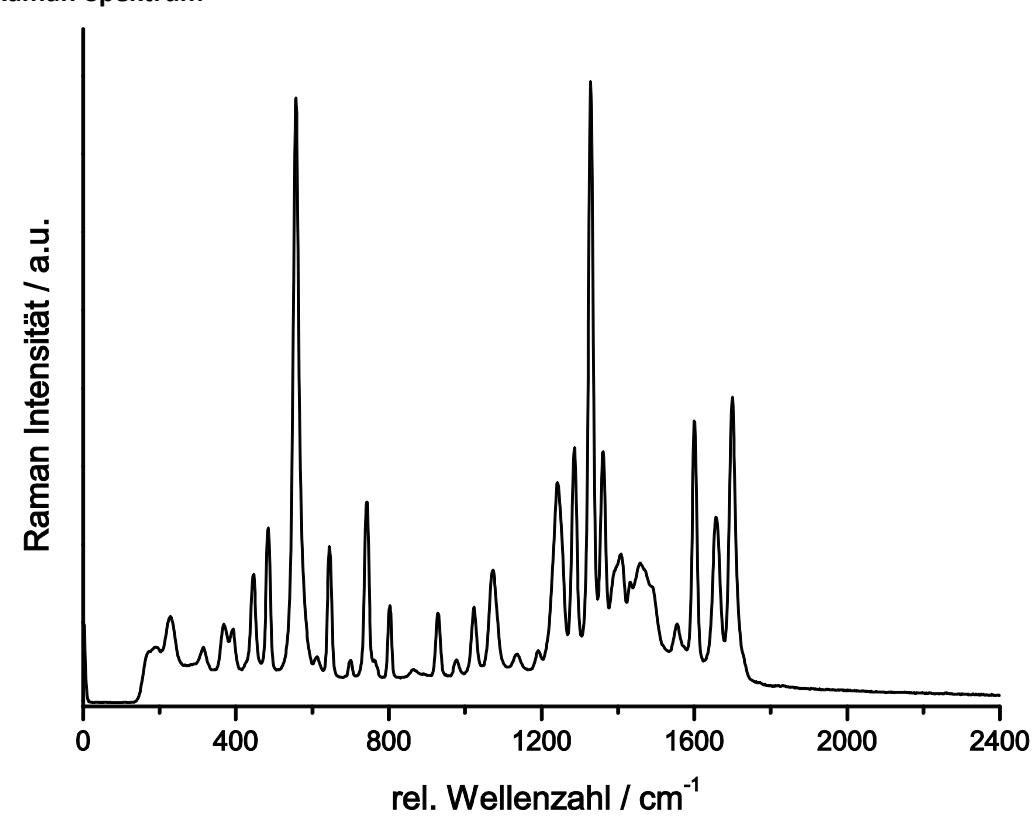
Substanz	Coffein	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	1,3,7-Trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion	 <p>Abbildung 11-17: Strukturformel von Coffein.</p>
CAS-Nummer	58-08-2	
Summenformel	$C_8H_{10}N_4O_2$	
Molare Masse	$194,19 \text{ g mol}^{-1}$	
Schmelzpunkt	$238 \text{ }^\circ\text{C}$	
Löslichkeit in H_2O	$21,6 \text{ g L}^{-1}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$	
Raman-Spektrum  <p>Abbildung 11-18: Referenz-Raman-Spektrum von Coffein.</p>		

Tabelle 11-4: Theophyllin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

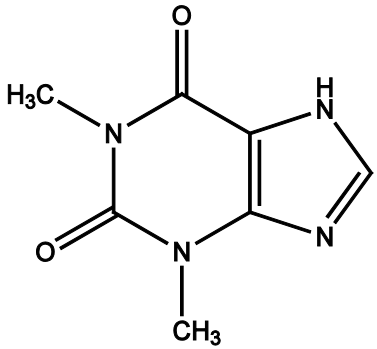
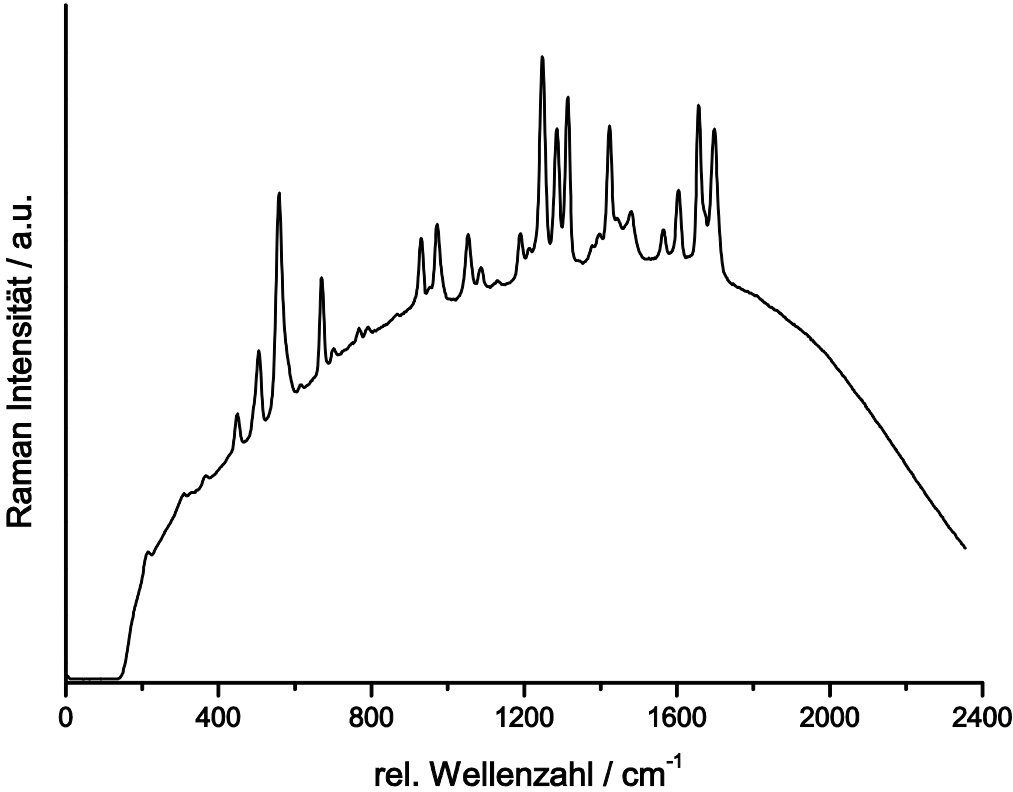
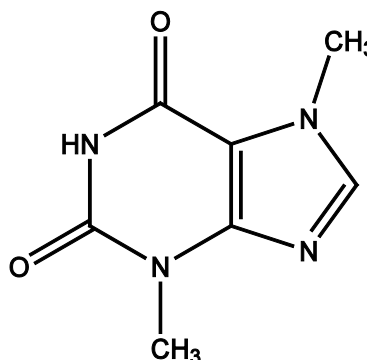
Substanz	Theophyllin	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	1,3-Dimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion	 <p>Abbildung 11-19: Strukturformel von Theophyllin.</p>
CAS-Nummer	58-55-9	
Summenformel	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	
Molare Masse	180,17 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	273 °C	
Löslichkeit in Wasser	7,36 g L ⁻¹ bei 25 °C	
Raman-Spektrum 		
Abbildung 11-20: Referenz-Raman-Spektrum von Theophyllin.		

Tabelle 11-5: Theobromin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Theobromin	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	3,7-Dimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion	 <p>Abbildung 11-21: Strukturformel von Theobromin.</p>
CAS-Nummer	83-67-0	
Summenformel	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	
Molare Masse	180,17 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	357 °C	
Löslichkeit in Wasser	330 mg L ⁻¹ bei 25 °C	

Raman-Spektrum

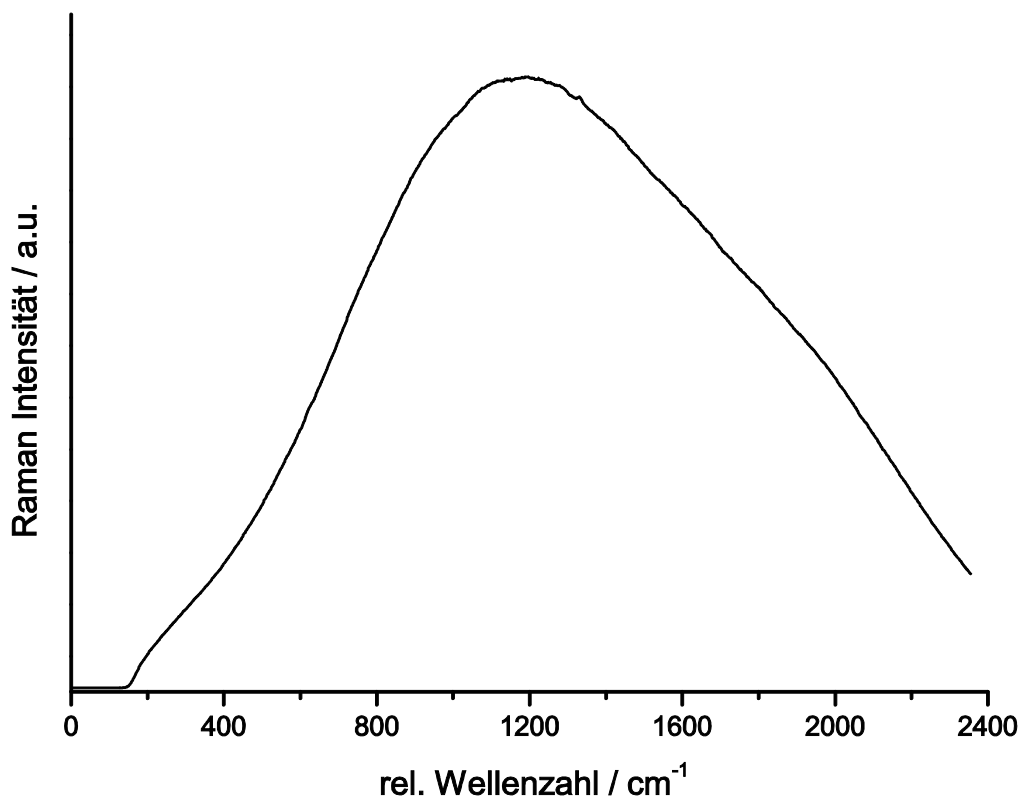


Abbildung 11-22: Referenz-Raman-Spektrum von Theobromin.

Tabelle 11-6: Aspartam – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

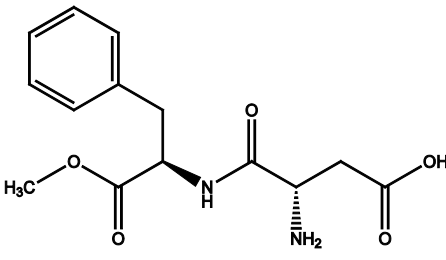
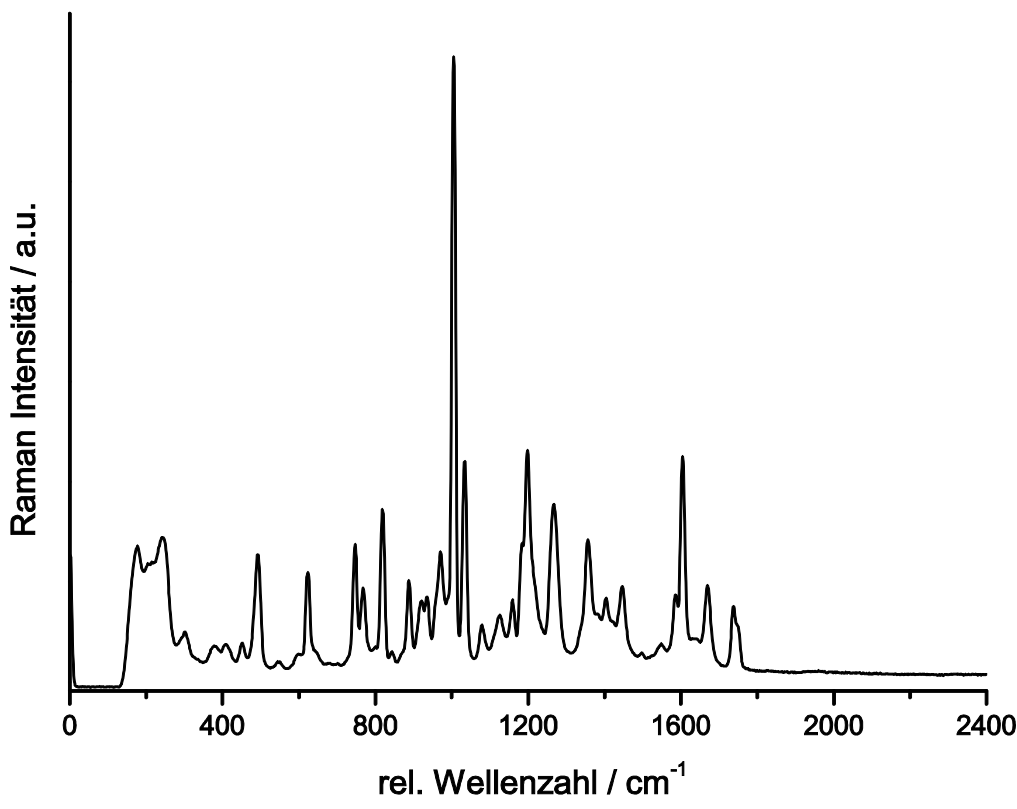
Substanz	Aspartam	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	Methyl L- α -aspartyl-L-phenylalaninat	 <p>Abbildung 11-23: Strukturformel von Aspartam.</p>
CAS-Nummer	22839-47-0	
Summenformel	$C_{14}H_{18}N_2O_5$	
Molare Masse	$294,31 \text{ g mol}^{-1}$	
Schmelzpunkt	$246,5 \text{ }^\circ\text{C}$	
Löslichkeit in Wasser	20 g L^{-1} bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$	
Raman-Spektrum		
		
Abbildung 11-24: Referenz-Raman-Spektrum von Aspartam.		

Tabelle 11-7: Catechin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

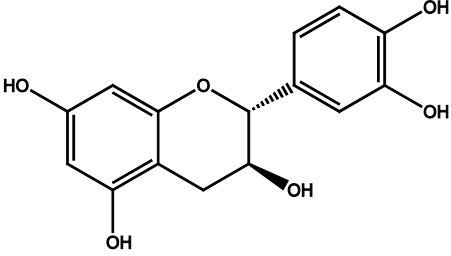
Substanz	Catechin	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(2R,3S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-chromantriol	
CAS-Nummer	154-23-4	
Summenformel	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	
Molare Masse	290,28 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	177 °C	
Löslichkeit in Wasser	6,31 g L ⁻¹ bei 25 °C	

Abbildung 11-25: Strukturformel von Catechin.

Raman-Spektrum

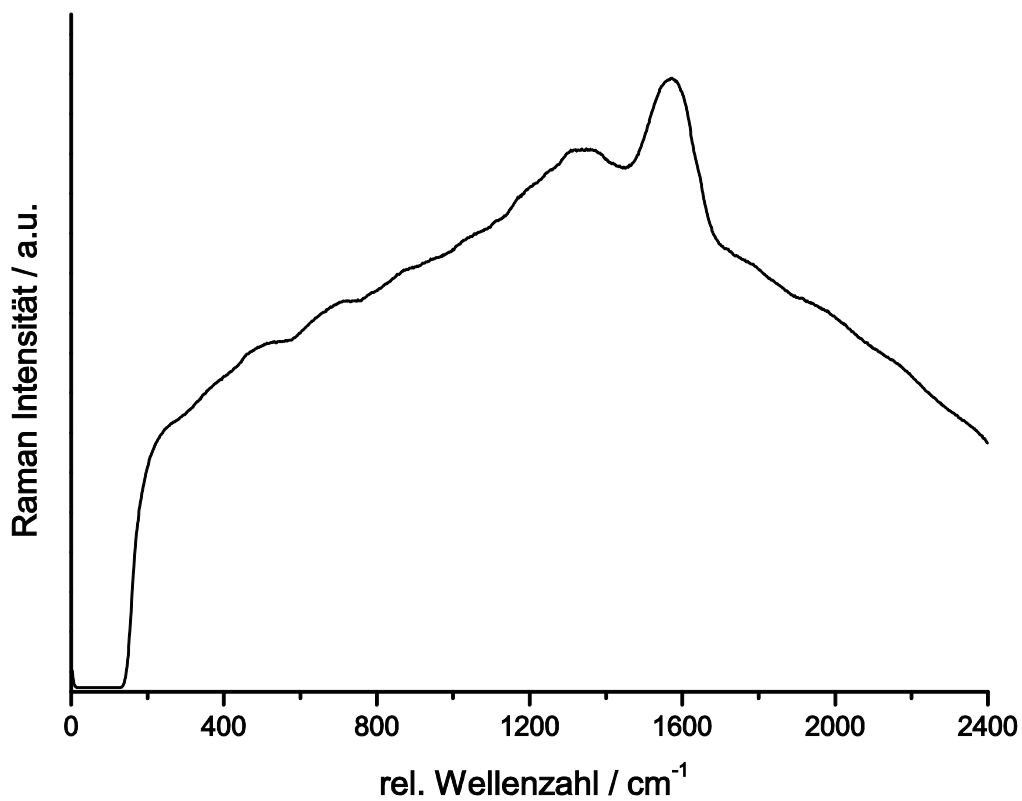
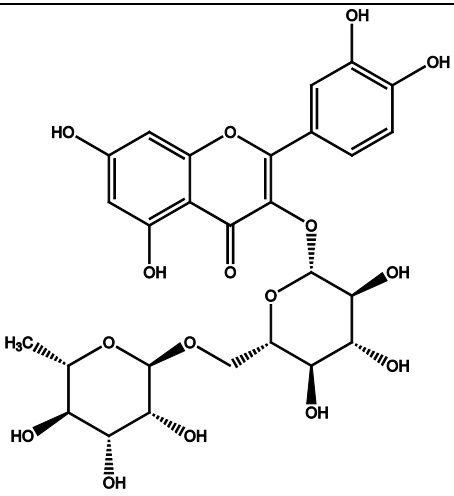
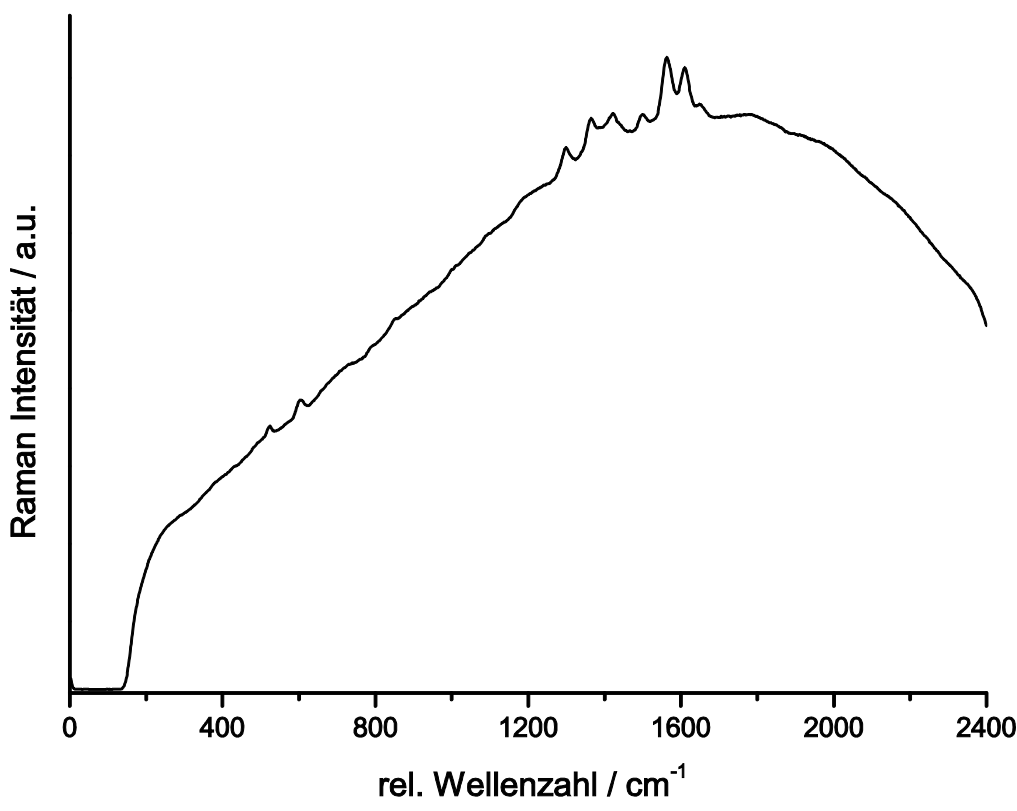


Abbildung 11-26: Referenz-Raman-Spektrum von Catechin.

Tabelle 11-8: Catechin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Rutin	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl 6-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosid	 <p>Abbildung 11-27: Strukturformel von Rutin.</p>
CAS-Nummer	153-18-4	
Summenformel	$C_{27}H_{30}O_{16}$	
Molare Masse	$610,53 \text{ g mol}^{-1}$	
Schmelzpunkt	$125 \text{ }^\circ\text{C}$	
Löslichkeit in Wasser	125 mg L^{-1}	
Raman-Spektrum  <p>Abbildung 11-28: Referenz-Raman-Spektrum von Rutin.</p>		

11.4.2 Antibiotika (Sulfonamide und Trimethoprim)

Tabelle 11-9: Sulfadiazin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

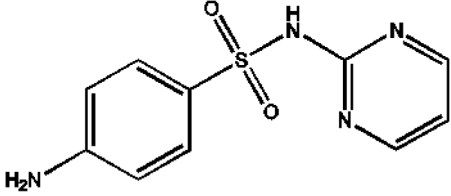
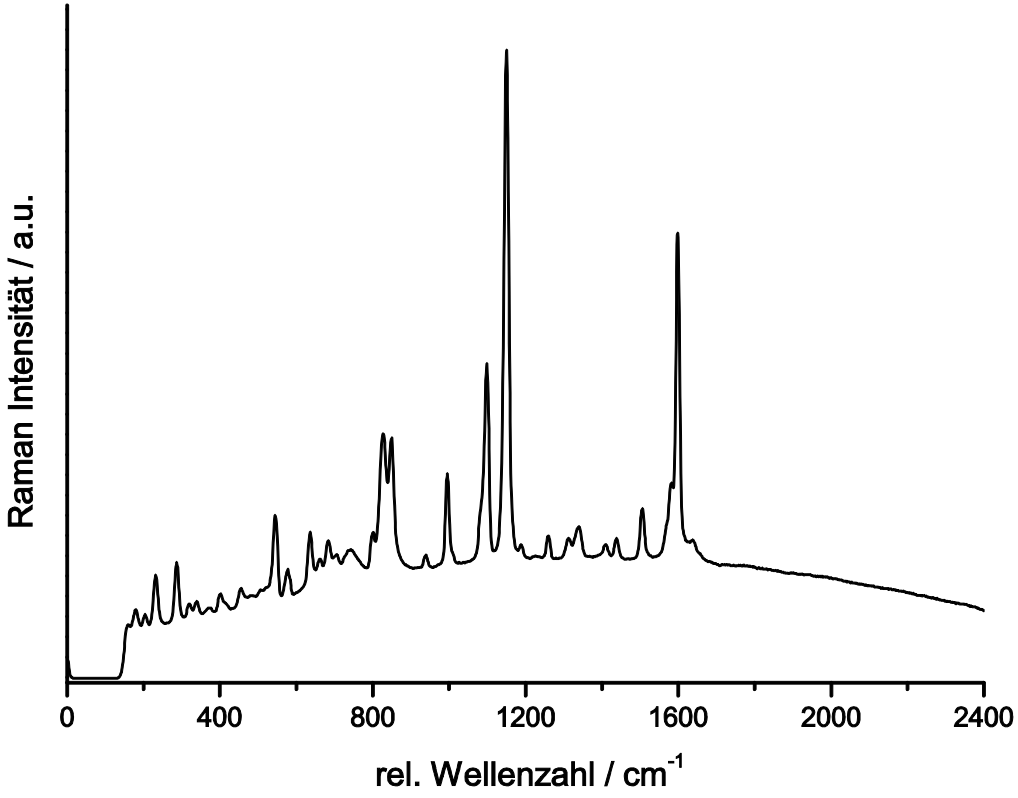
Substanz	Sulfadiazin	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	4-Amino-N-(2-pyrimidinyl)-benzensulfonamid	 <p>Abbildung 11-29: Strukturformel von Sulfadiazin.</p>
CAS-Nummer	68-35-9	
Summenformel	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	
Molare Masse	$250,28 \text{ g mol}^{-1}$	
Schmelzpunkt	$255,5 \text{ }^\circ\text{C}$	
Löslichkeit in Wasser	77 mg L^{-1} bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$	
Raman-Spektrum 		
Abbildung 11-30: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfadiazin.		

Tabelle 11-10: Sulfamerazin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

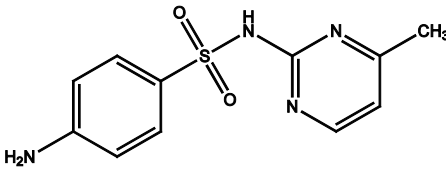
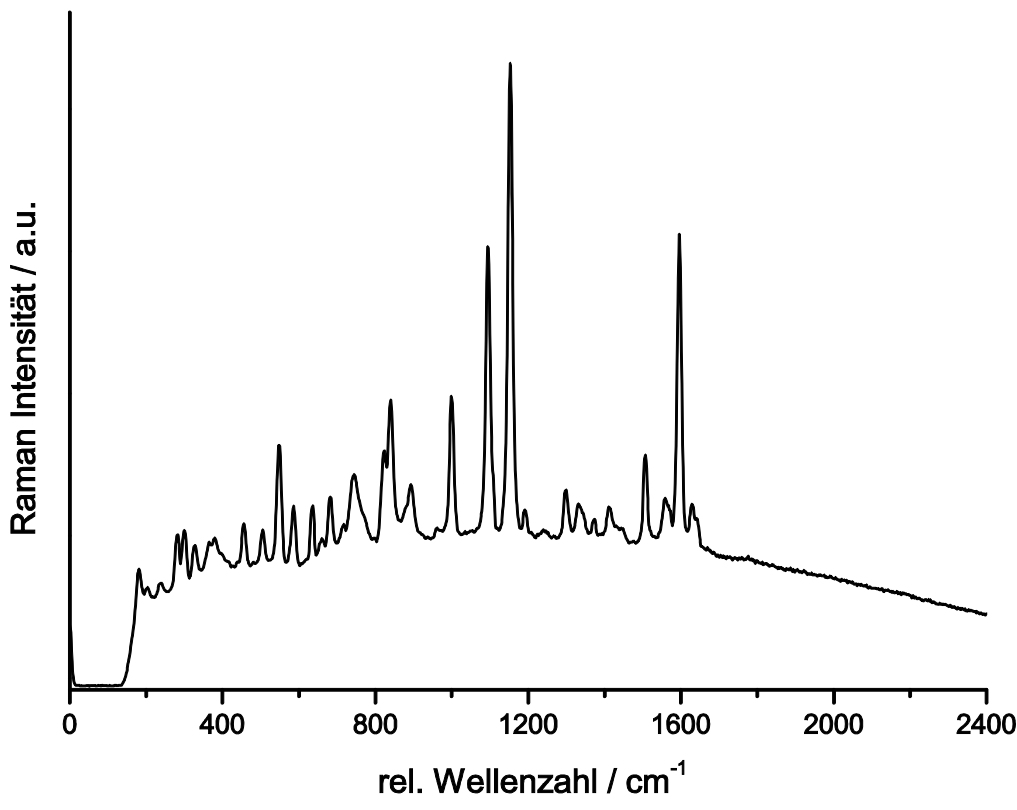
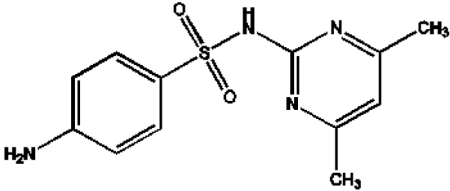
Substanz	Sulfamerazin	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	4-Amino-N-(4-methyl-2-pyrimidinyl)-benzensulfonamid	 <p>Abbildung 11-31: Strukturformel von Sulfamerazin.</p>
CAS-Nummer	127-79-7	
Summenformel	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	
Molare Masse	264,31 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	236 °C	
Löslichkeit in Wasser	202 mg L ⁻¹ bei 20 °C	
Raman-Spektrum 		
Abbildung 11-32: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfamerazin.		

Tabelle 11-11: Sulfamethazin – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Sulfamethazin	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	4-Amino-N-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)-benzenesulfonamid	 <p>Abbildung 11-33: Strukturformel von Sulfamethazin.</p>
CAS-Nummer	57-68-1	
Summenformel	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	
Molare Masse	$278,33 \text{ g mol}^{-1}$	
Schmelzpunkt	$198,5 \text{ }^\circ\text{C}$	
Löslichkeit in Wasser	$1,5 \text{ g L}^{-1}$ bei $29 \text{ }^\circ\text{C}$	

Raman-Spektrum

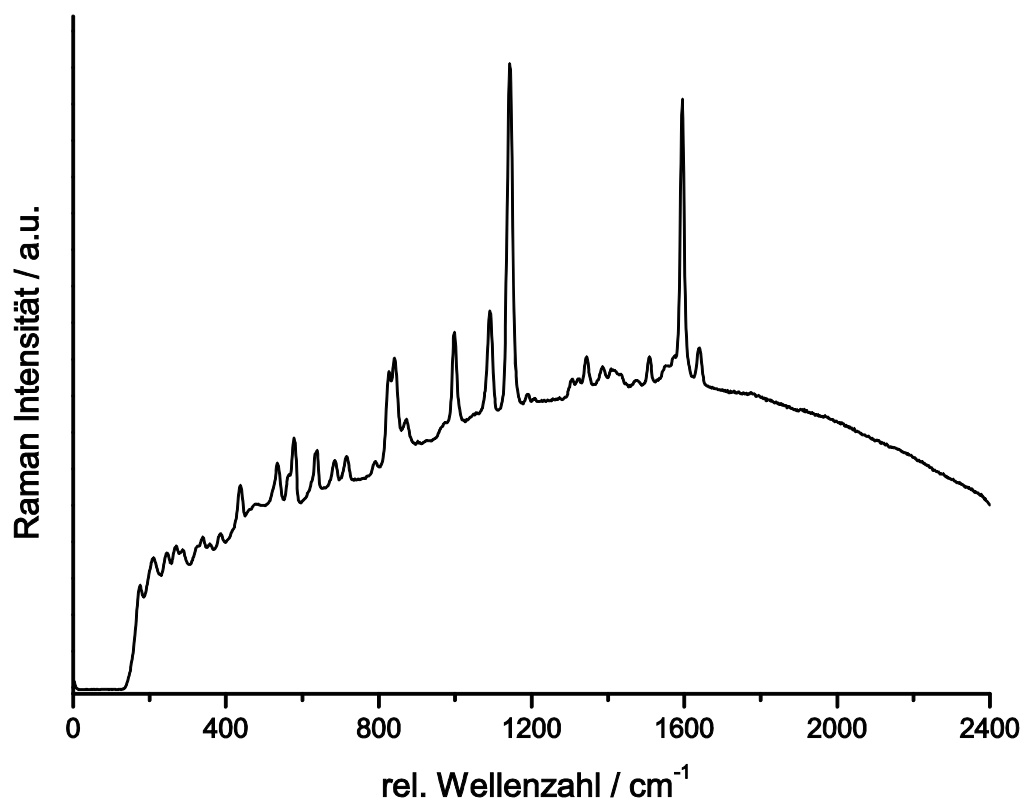


Abbildung 11-34: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfamethazin.

Tabelle 11-12: Sulfathiazol – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

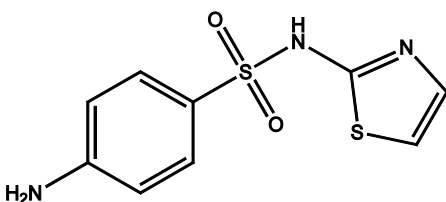
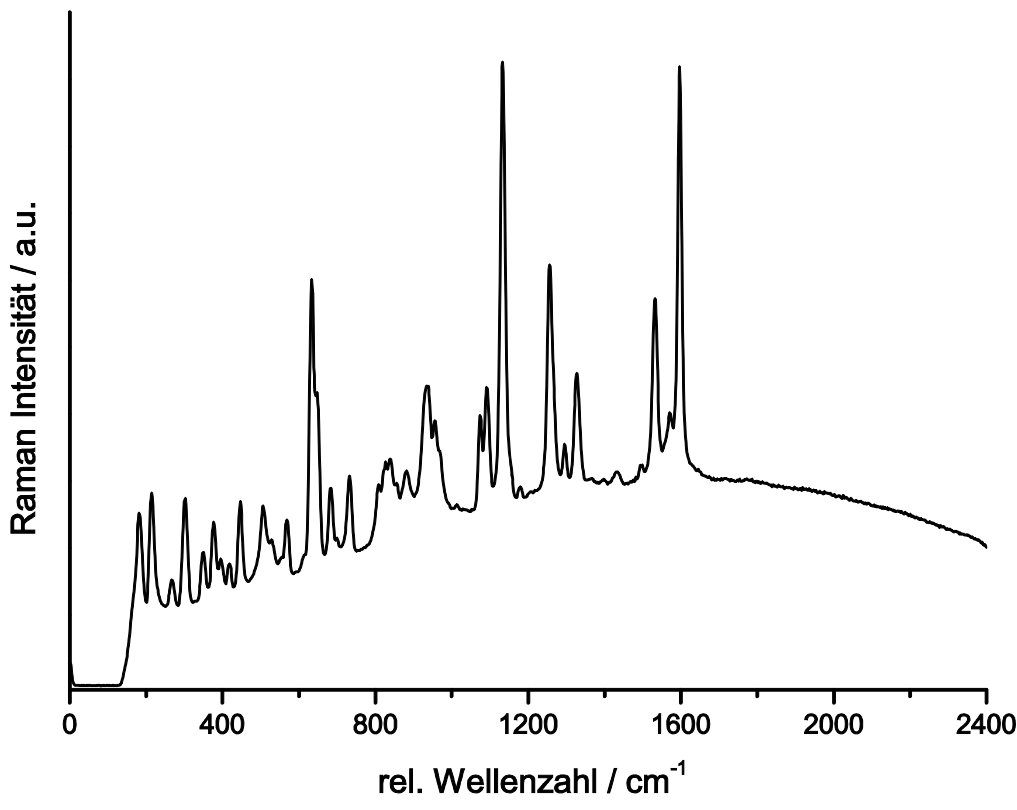
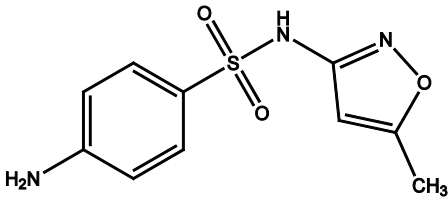
Substanz	Sulfathiazol	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	4-Amino-N-(1,3-thiazol-2-yl)-benzensulfonamid	 <p>Abbildung 11-35: Strukturformel von Sulfathiazol.</p>
CAS-Nummer	72-14-0	
Summenformel	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	
Molare Masse	255,32 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	189 °C	
Löslichkeit in Wasser	373 mg L ⁻¹ bei 25 °C	
Raman-Spektrum 		
Abbildung 11-36: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfathiazol.		

Tabelle 11-13: Sulfamethoxaxol – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Sulfamethoxaxol	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	4-Amino-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)-benzensulfonamid	 <p>Abbildung 11-37: Strukturformel von Sulfamethoxaxol.</p>
CAS-Nummer	723-46-6	
Summenformel	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	
Molare Masse	253,28 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	167 °C	
Löslichkeit in Wasser	610 mg L ⁻¹ bei 37 °C	

Raman-Spektrum

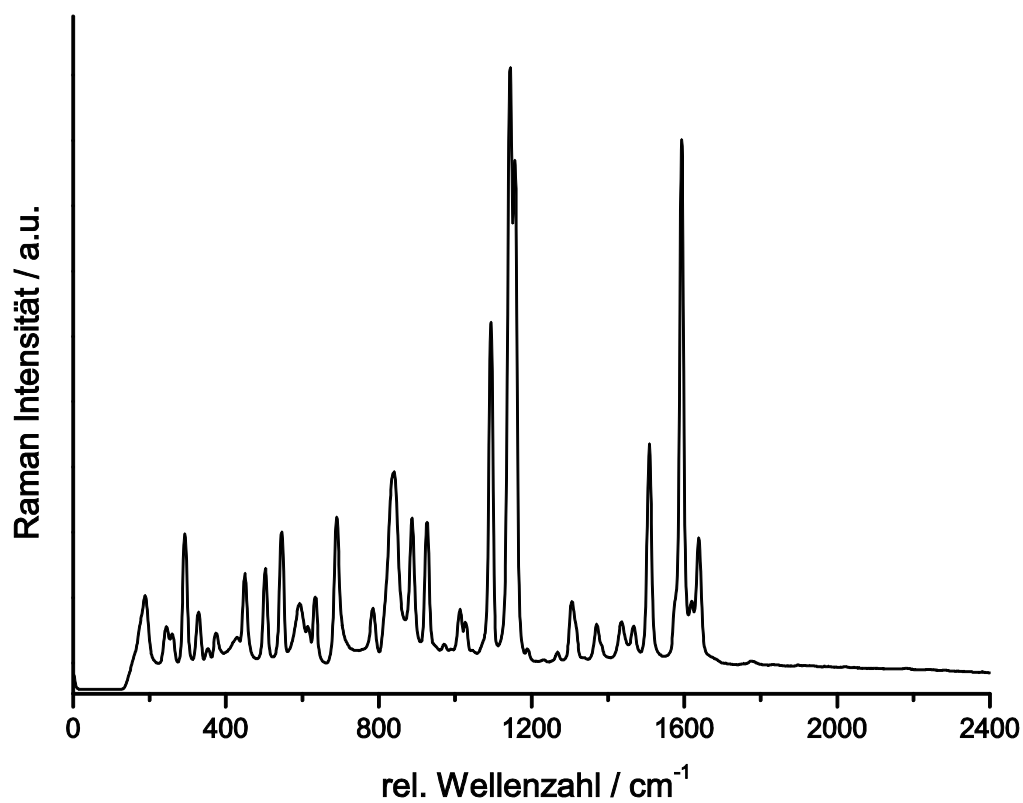
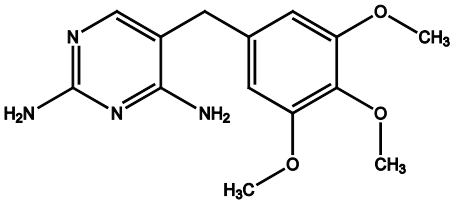
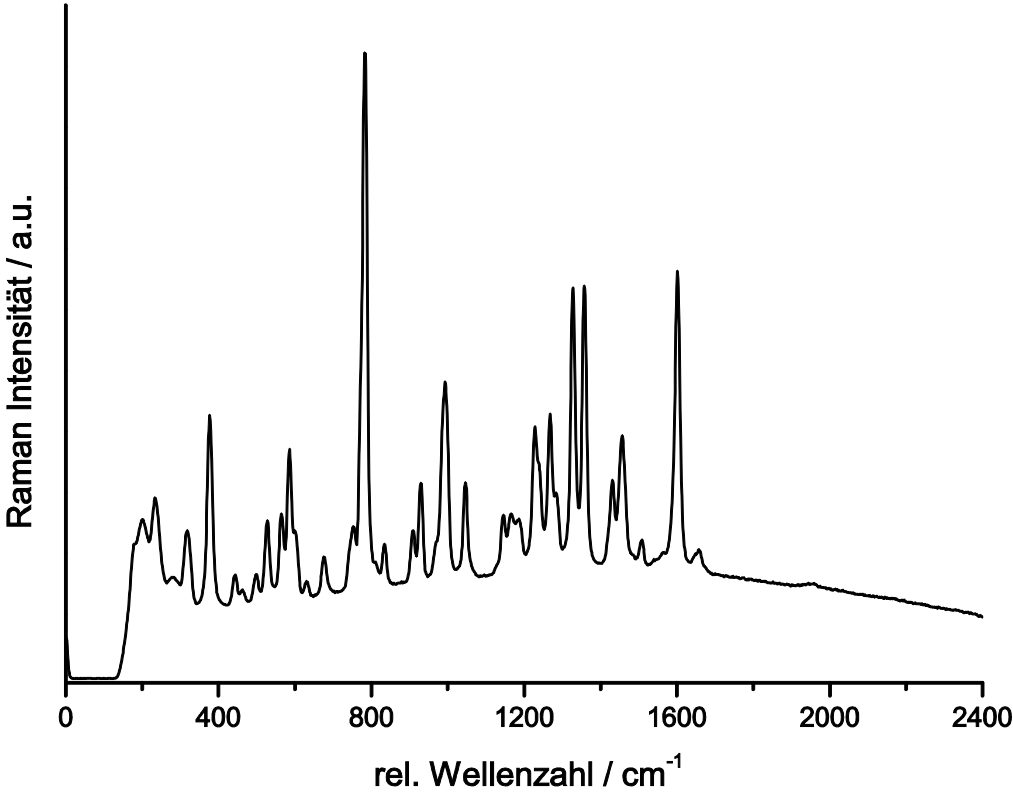


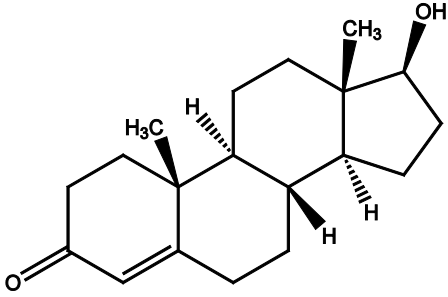
Abbildung 11-38: Referenz-Raman-Spektrum von Sulfamethoxaxol.

Tabelle 11-14: Trimethoprim – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Trimethoprim	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	5-(3,4,5-Trimethoxybenzyl)-2,4-pyrimidindiamin	 <p>Abbildung 11-39: Strukturformel von Trimethoprim.</p>
CAS-Nummer	738-70-5	
Summenformel	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	
Molare Masse	290,32 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	199 - 203 °C	
Löslichkeit in Wasser	400 mg L ⁻¹ bei 25 °C	
Raman-Spektrum 		
Abbildung 11-40: Referenz-Raman-Spektrum von Trimethoprim.		

11.4.3 Anabolika (Steroide)

Tabelle 11-15: Testosteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Testosteron	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(17 β)-17-Hydroxy-androst-4-en-3-on	 <p>Abbildung 11-41: Strukturformel von Testosteron.</p>
CAS-Nummer	58-22-0	
Summenformel	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	
Molare Masse	288,43 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	155 °C	
Löslichkeit in Wasser	23,4 mg L ⁻¹ bei 25 °C	

Raman-Spektrum

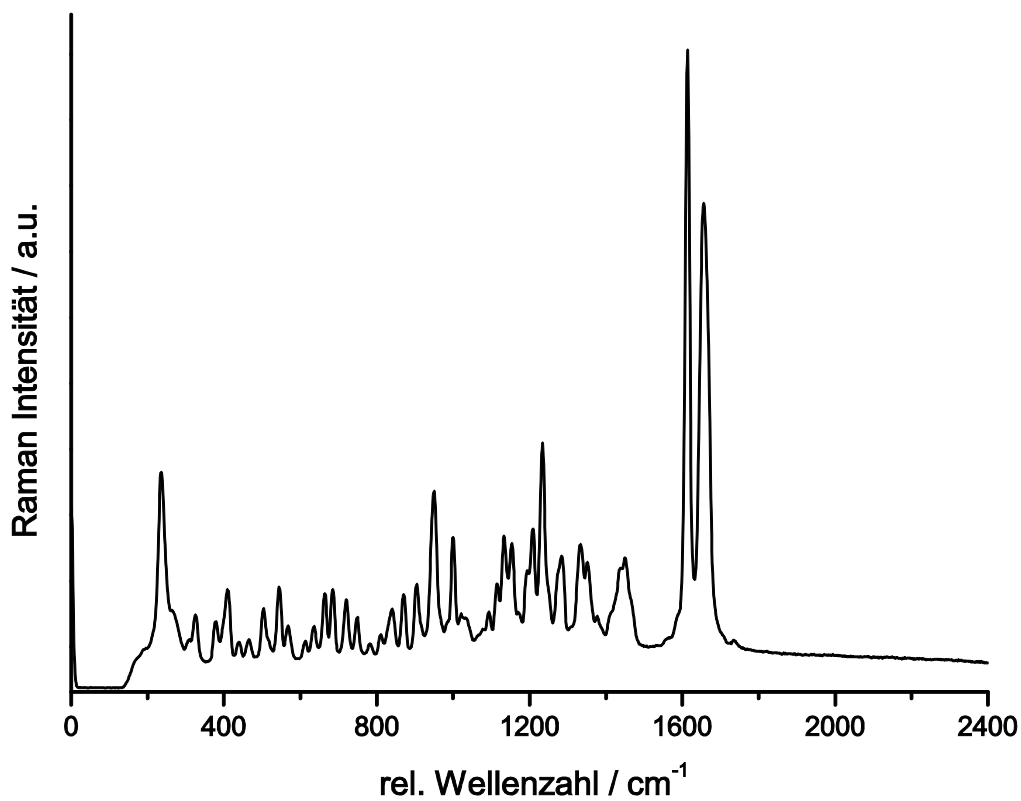


Abbildung 11-42: Referenz-Raman-Spektrum von Testosteron.

Tabelle 11-16: Epitestosteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

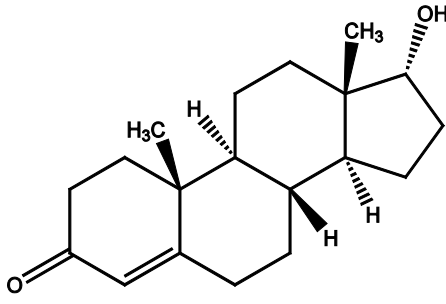
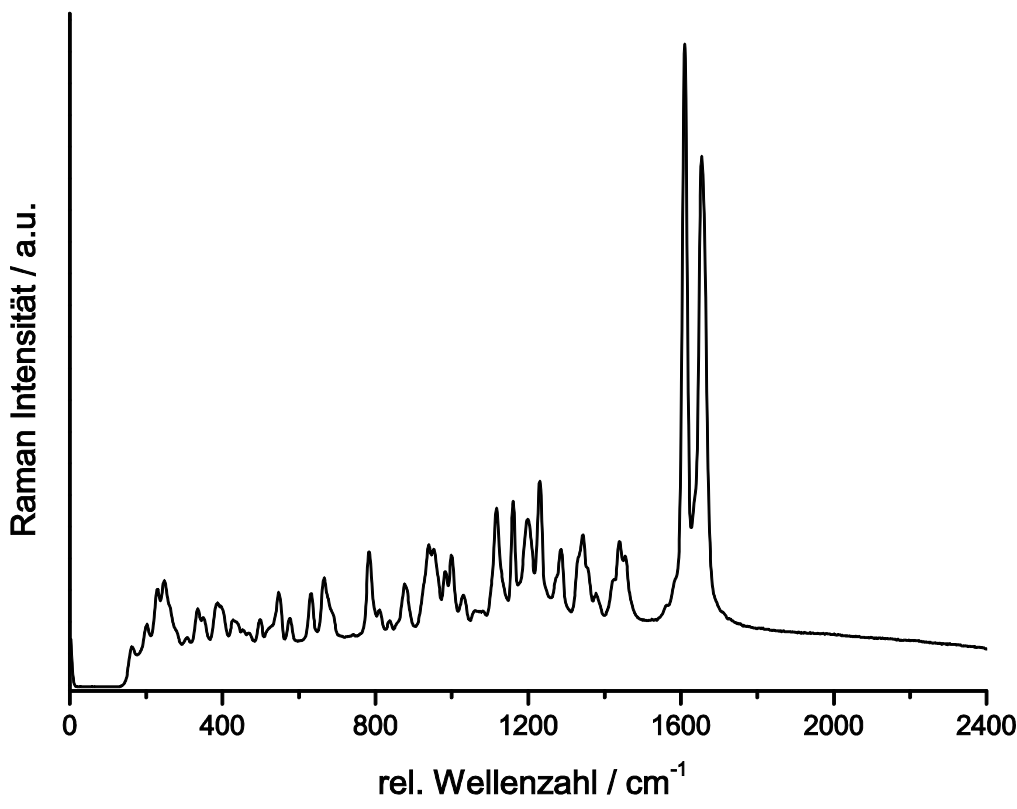
Substanz	Epitestosteron	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(17 α)-17-Hydroxyandrost-4-en-3-on	 <p>Abbildung 11-43: Strukturformel von Epitestosteron.</p>
CAS-Nummer	481-30-1	
Summenformel	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	
Molare Masse	288,43 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	155 °C	
Löslichkeit in Wasser	23,4 mg L ⁻¹ bei 25 °C	
Raman-Spektrum		
 <p>The Raman spectrum shows Raman intensity in arbitrary units (a.u.) on the y-axis and relative wavenumber in cm⁻¹ on the x-axis. The x-axis ranges from 0 to 2400 cm⁻¹ with major ticks at 0, 400, 800, 1200, 1600, 2000, and 2400. The spectrum features a series of peaks between 400 and 1600 cm⁻¹, followed by a very sharp and intense peak at approximately 1650 cm⁻¹, and a smaller peak at approximately 1700 cm⁻¹.</p>		
Abbildung 11-44: Referenz-Raman-Spektrum von Epitestosteron.		

Tabelle 11-17: Nandrolon – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

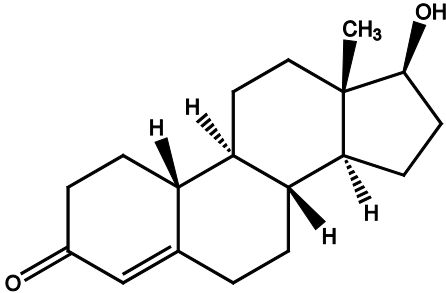
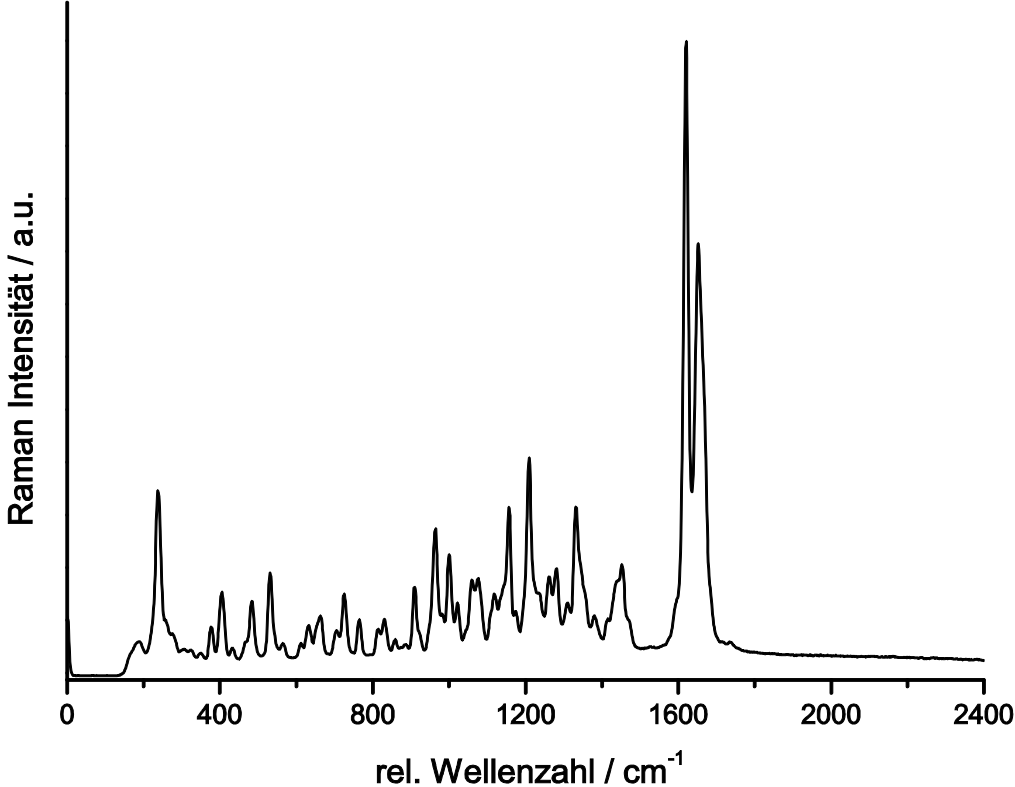
Substanz	Nandrolon	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(17 β)-17-Hydroxy-estr-4-en-3-on	 <p>Abbildung 11-45: Strukturformel von Nandrolon.</p>
CAS-Nummer	434-22-0	
Summenformel	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	
Molare Masse	274,41 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	118 °C	
Löslichkeit in Wasser	3,09 g L ⁻¹ bei 25 °C	
Raman-Spektrum		
		
Abbildung 11-46: Referenz-Raman-Spektrum von Nandrolon.		

Tabelle 11-18: Prasteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

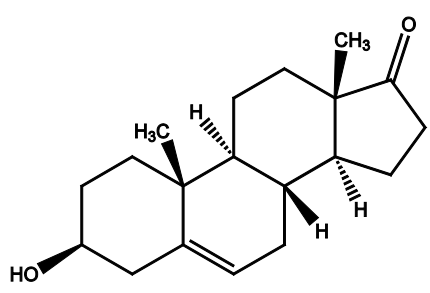
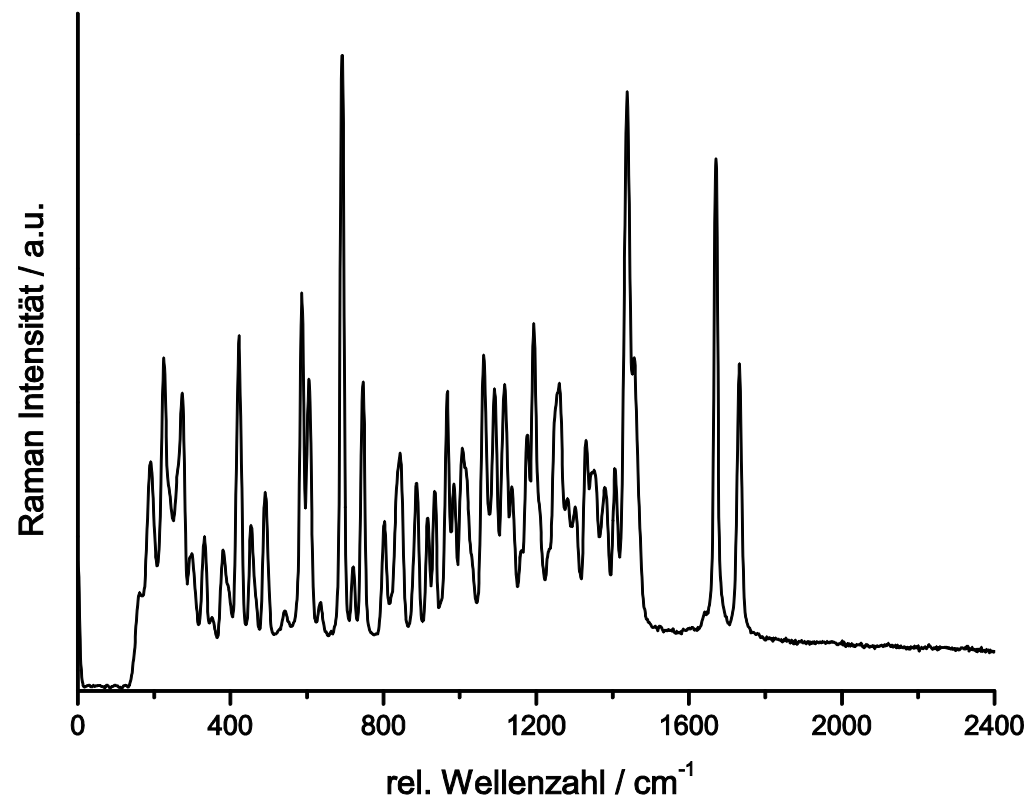
Substanz	Prasteron	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(3 β)-3-Hydroxy-androst-5-en-17-on	 <p>Abbildung 11-47: Strukturformel von Prasteron.</p>
CAS-Nummer	53-43-0	
Summenformel	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	
Molare Masse	288,43 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	140 - 141 °C	
Löslichkeit in Wasser	63,5 mg L ⁻¹ bei 25 °C	
Raman-Spektrum		
		
Abbildung 11-48: Referenz-Raman-Spektrum von Prasteron.		

Tabelle 11-19: Androsteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

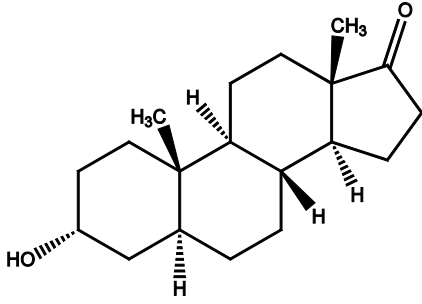
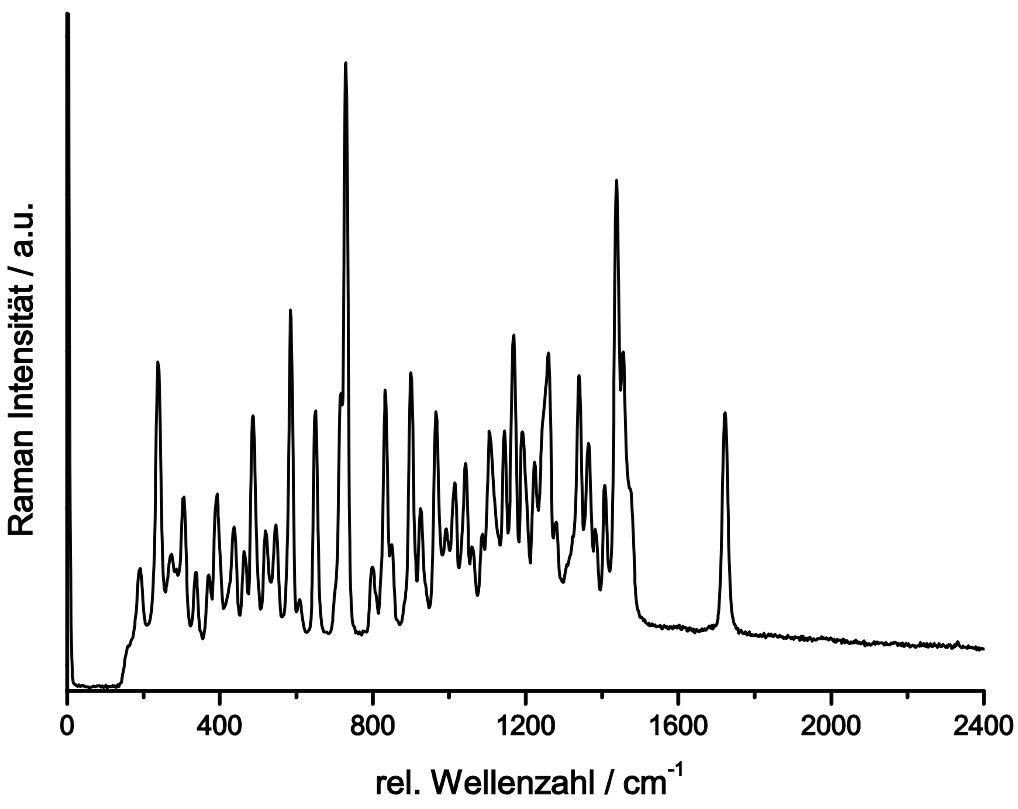
Substanz	Androsteron	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(3 α)-3-Hydroxy-androstan-17-on	 <p>Abbildung 11-49: Strukturformel von Androsteron.</p>
CAS-Nummer	53-41-8	
Summenformel	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	
Molare Masse	290,45 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	185 °C	
Löslichkeit in Wasser	12 mg L ⁻¹ bei 23 °C	
Raman-Spektrum		
 <p>Abbildung 11-50: Referenz-Raman-Spektrum von Androsteron.</p>		

Tabelle 11-20: Eticholanolon – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

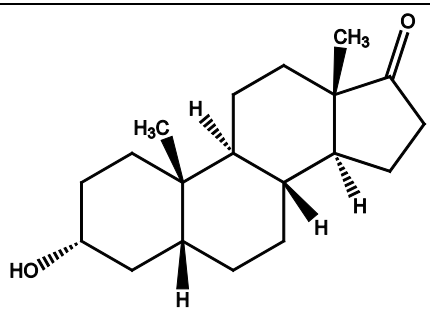
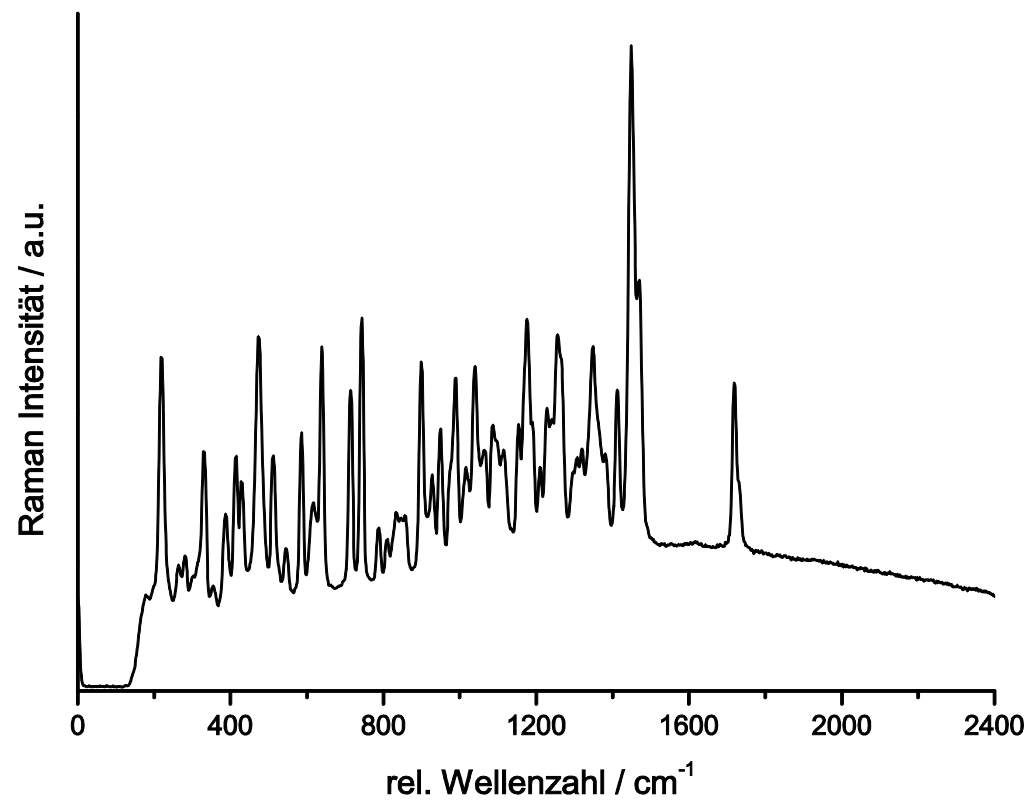
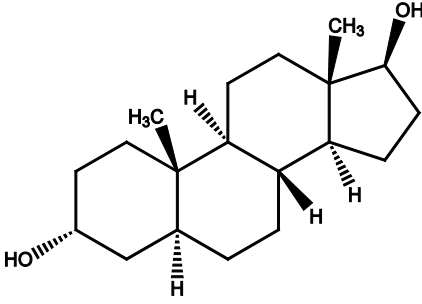
Substanz	Eticholanolon	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(3 α ,5 β)-3-Hydroxy-androstan-17-on	 <p>Abbildung 11-51: Strukturformel von Eticholanolon.</p>
CAS-Nummer	53-42-9	
Summenformel	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	
Molare Masse	290,45 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	185 °C	
Löslichkeit in Wasser	12 mg L ⁻¹ bei 23 °C	
Raman-Spektrum		
		
Abbildung 11-52: Referenz-Raman-Spektrum von Eticholanolon.		

Tabelle 11-21: Dihydroandrosteron – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Dihydroandrosteron	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(3 α ,5 α ,17 β)-Androstan-3,17-diol	 <p>Abbildung 11-53: Strukturformel von Dihydroandrosteron.</p>
CAS-Nummer	1852-53-5	
Summenformel	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	
Molare Masse	292,46 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	145 °C	
Löslichkeit in Wasser	3,8 mg L ⁻¹ bei 25 °C	

Raman-Spektrum

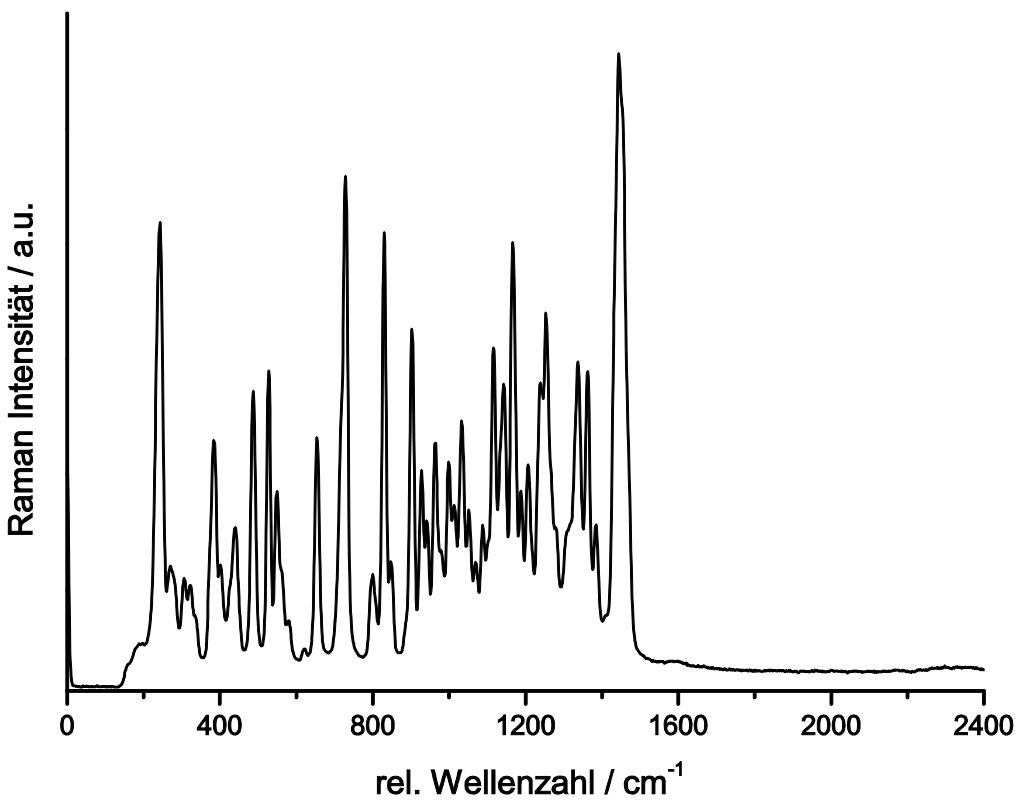
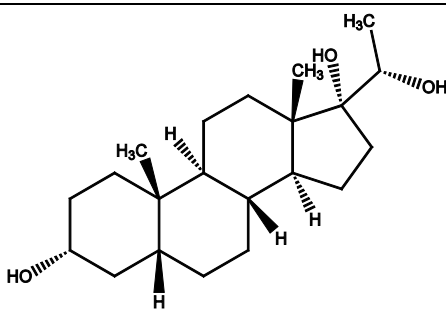
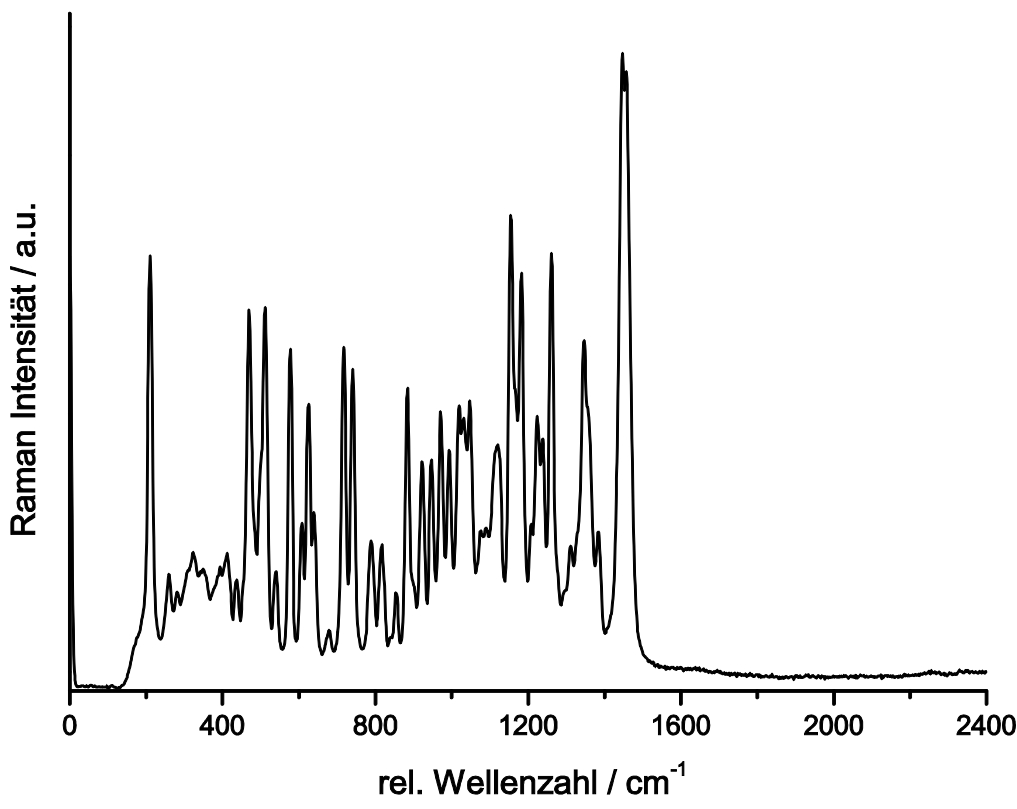


Abbildung 11-54: Referenz-Raman-Spektrum von Dihydroandrosteron.

Tabelle 11-22: Pregnantriol – Datenblatt und Referenz-Raman-Spektrum.

Substanz	Pregnantriol	Strukturformel
Systematischer Name / IUPAC	(3 α ,5 β ,20S)-Pregnan-3,17,20-triol	 <p>Abbildung 11-55: Strukturformel von Pregnantriol.</p>
CAS-Nummer	1098-45-9	
Summenformel	C ₂₁ H ₃₆ O ₃	
Molare Masse	336,51 g mol ⁻¹	
Schmelzpunkt	178 °C	
Löslichkeit in Wasser	9,5 mg L ⁻¹ bei 25 °C	
Raman-Spektrum		
		
Abbildung 11-56: Referenz-Raman-Spektrum von Pregnantriol.		