



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 284 T2** 2005.11.24

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 166 099 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 284.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR99/00800**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 911 891.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/60342**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **12.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **15.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.11.2005**

(51) Int Cl.7: **G01N 27/447**

(73) Patentinhaber:  
**Picometrics, Ramonville Saint Agne, FR**

(74) Vertreter:  
**Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679  
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**DE, FR, GB**

(72) Erfinder:  
**COUDERC, François, F-31200 Toulouse, FR;  
NERTZ, Michel, F-31570 Sainte Foy d'Aigrefeuille,  
FR; NOUADJE, Georges, F-91000 Evry, FR**

(54) Bezeichnung: **DETEKTOR FÜR LASER-INDUZIERTE FLUORESCENZ UND ANWENDUNGSVERFAHREN FÜR  
DIESES GERÄT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft einen Detektor für laserinduzierte Fluoreszenz. Die Erfindung betrifft auch ein mit dieser Vorrichtung durchführbares Verfahren.

**[0002]** Die Erfindung eignet sich insbesondere zur Identifizierung von unbekanntem Substanzen und zur Bestimmung von Spuren von Verbindungen, die durch unterschiedliche Mittel getrennt wurden:

- a) durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (im Folgenden HPLC), mit Detektion nach der Säule auf einer aktivierten oder deaktivierten Kapillare mit kleinem Innendurchmesser, die vom Ausgang der Chromatographiesäule abzweigt;
- b) durch Mikro-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (im Folgenden Mikro-HPLC), mit Detektion auf der Säule in einer Kapillare mit sehr geringem Durchmesser;
- c) durch Kapillarelektrophorese (im Folgenden CE) oder Elektrokapillarchromatographie (CEC) mit Detektion auf der Kapillarsäule.

**[0003]** Die obigen Verfahren, welche die Detektion von laserinduzierter Fluoreszenz (im Folgenden LIF) umfassen und die HPLC und CE-Verfahren, jeweils mit einer Quarzkapillare mit sehr geringem Durchmesser, wurden erfolgreich angewendet, um Proben zu analysieren, deren molekulare Struktur klein genug ist (vergleiche insbesondere die Patente US-A-4 675 300 und US-A-4 548 498).

**[0004]** Zusammen mit Absorptionsdetektoren in ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV-Vis) wird die HPLC und die CE üblicherweise zur Identifizierung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Produkte in Proben eingesetzt, deren Zusammensetzung nicht bekannt ist. So beschreibt beispielsweise das Patent US-A-5 061 361 eine Vorrichtung zur Erhöhung der Empfindlichkeit eines UV-Absorptionsdetektors bei der Zonen-Kapillarelektrophorese. Die Detektionsmittel umfassen eine einzige Zelle auf der Kapillare, die in dem der Detektion dienenden Abschnitt der Kapillare einen erweiterten Bereich aufweist, und die spezielle geometrische Konturen verwendet, die eine laminare Mischung und Turbulenz verhindern, wenn man eine elektroosmotische oder über Druck arbeitende Pumpeinrichtung verwendet. Diese wird als „Detektionszelle mit vergrößerter Kapillare (oder eiförmige Zelle)“ bezeichnet, in der die unbekannt Substanz wandert und mit einer ultravioletten Strahlung bestrahlt wird. Ein Teil der Strahlung wird von der unbekannt Substanz absorbiert. Nichts desto weniger sind die Absorptionsdetektoren im UV-Vis-Bereich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit eingeschränkt: Zur Identifizierung von Substanzen mit sehr geringer Konzentration ist folglich eine LIF-Detektion erforderlich. So schlägt das Patent EP-A-0 634 651 schlägt eine Anordnung vor, bei der eine Ka-

pillare mit vergrößertem Querschnitt in einem CE-System mit einem herkömmlichen Absorptionsdetektor im ultravioletten und sichtbaren Bereich oder ein Fluoreszenzdetektor eingesetzt wird, der die durch nichtkohärente Bestrahlung erzeugte Fluoreszenz orthogonal detektiert, wobei der Anregungsstrahl auf den Abschnitt mit größtem Querschnitt am Ende des Detektors fokussiert ist. Die Fokussierungsart ist aber für die Bestrahlung eines größeren Volumens, wie es für die LIF benötigt wird, ungeeignet. Das Patent US-A-5 037 199 beschreibt auch die Anordnung einer Zelle, die zur spektrophotometrischen Analyse oder zur Detektion einer Substanz im Inneren eines kleinen Probevolumens auf einer Säule verwendet werden kann. Eine erste kugelförmige Linse kann verwendet werden, um das die Probe anregende nichtkohärente Licht zu übertragen, während eine weitere kugelförmige Linse zum Sammeln der Fluoreszenzstrahlung verwendet werden kann. Der Anregungsstrahl ist so angeordnet, dass er in der Kapillare fokussiert wird, wobei eine Flüssigkeit mit dem gleichen Brechungsindex verwendet werden kann, um die Übertragung des Lichts in das Innere der Kapillare zu erleichtern. Jedoch ist auch dort die verwendete Fokussierungsart nicht geeignet, ein größeres Volumen, wie es für LIF benötigt wird, zu bestrahlen.

**[0005]** Die Laser-Fluorimetrie unterscheidet sich stark von der Fluorimetrie mit Bogenlampe und besitzt einige wesentliche Merkmale, die sich in Verbindung mit einem Detektor, der mit sehr geringen Volumina arbeitet, als vorteilhaft erweisen. Die erzeugte Fluoreszenzstrahlung ist direkt proportional zur Intensität der Anregungsstrahlung. Die Amplitudenstabilität des Lasers trägt außerdem dazu bei, das Hintergrundrauschen zu minimieren.

**[0006]** Es ist bekannt, dass für die Fluoreszenz  $dF$  aus einem Volumen  $dV$  der folgende Zusammenhang gilt:

$$dF = C\epsilon\Phi(P/S)dV$$

wobei:

- C die Konzentration der Fluorophore;
- $\epsilon$  der molare Absorptionskoeffizient;
- $\Phi$  die Fluoreszenzquantenausbeute der Fluorophore;
- P die Leistung des die Fluorophore im Inneren der Kapillare anregenden Lichts;
- S der Querschnitt des Lichtstrahls, der die Moleküle anregt sind.

**[0007]** Damit man also das größtmögliche Fluoreszenzniveau erreicht, muss das die fluoreszierenden Moleküle enthaltende Volumen so groß wie möglich sein.

**[0008]** Durch die LIF-Detektion werden wenigstens drei Probleme gelöst:

- Maximierung des bestrahlten Volumens
- Maximierung der gesammelten Fluoreszenz
- Aufrechterhaltung der besseren Trennungsleistung (Varianz auf Grund der Detektion) und
- Aufrechterhaltung einer geringen Lichtstreuung.

**[0009]** In den Publikationen J. of Chromatogr. 559 (1991) Seiten 183-196 und 652 (1993), Seiten 399-405, wurde darauf hingewiesen, dass eine Optik mit einer großen numerischen Öffnung unabdingbar sei, um das stärkste Fluoreszenzsignal aus der Kapillare zu detektieren und um das niedrigste Niveau an Hintergrundrauschen zu erzielen und es wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenz als Funktion des Innendurchmessers der Kapillare bei einem Objektiv mit großer numerischer Öffnung gezeigt. Die Fluoreszenzintensität steigt beträchtlich in Abhängigkeit vom Durchmesser in einem Bereich von sehr kleinen Innendurchmessern ( $< 15\mu\text{m}$ ) an, bleibt dann aber im Wesentlichen konstant und nimmt schließlich für größere Durchmesser wieder ab.

**[0010]** Die wesentlichen Gründe für die Lichtstreuung bei der LIF sind:

- die Reflektionen auf den optischen Elementen, einschließlich der Wände der Quarzkapillare,
- Streuung auf Grund des in der Kapillare zirkulierenden Puffers,
- physikalische Phänomene, wie beispielsweise Raman-Streuung.

**[0011]** Erfindungsgemäß können diese Nachteile mit einer kolinearen Detektionsanordnung überwunden werden, insbesondere weil die Raman-Rückstreuung in der Anregungsachse vermieden wird, wie dies in der genannten Publikation J. Chromatogr. 559 (1991) beschrieben ist (verglichen mit dem nächstliegenden Maximalniveau in einer Richtung senkrecht zum einfallenden Strahl). Die anderen Ursachen können dadurch beherrscht werden, indem man die Lichtstrahlen korrekt justiert und man an geeigneter Stelle einen Raumfilter oder eine Blende mit einem ausgewählten Durchmesser (0,5 – 1,5 mm) anordnet. Die Verwendung einer Zelle mit spezieller geometrischer Form verhindert die laminare Vermischung und die Turbulenz, was notwendig ist, um die bessere Trennwirkung aufrecht zu erhalten.

**[0012]** In dem vorliegenden Text bedeutet der Ausdruck „bei der Laserwellenlänge fluoreszierende Substanz“ soviel wie „Substanz, bei der Wellenlänge des Lasers ausstrahlt die Fluoreszenzlicht“. Außerdem sollte der Begriff „kolinear“ nicht in seiner geometrischen Bedeutung verstanden werden, sondern ist so zu verstehen, dass, soweit er auf optische Strahlen angewendet wird, die Strahlen entlang von in gleiche Richtungen verlaufenden Wegen geführt werden, wobei sie jedoch nicht notwendigerweise

übereinander liegen oder gleichgerichtet sind.

**[0013]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine LIF-Vorrichtung für die HPLC oder CE bereitzustellen, die eine gesteigerte Empfindlichkeit besitzt auf Grund der Verwendung von Kapillaren mit einem Innendurchmesser, der wesentlich größer als  $15\mu\text{m}$  ist, und die eine vergrößerte Detektionszelle und eine kugelförmige Linse aufweist, was das größtmögliche bestrahlte Volumen und die beste Effizienz beim Sammeln der Fluoreszenzstrahlung ermöglicht.

**[0014]** Diese Aufgabe wird gelöst durch einen Detektor für laserinduzierte Fluoreszenz mit:

- Mitteln zum Ausstrahlen eines Laserstrahls,
- einer Zelle im Inneren einer Kapillare, wobei die Zelle eine Lösung aufnimmt, die wenigstens eine Unbekannte, bei der Wellenlänge des Lasers fluoreszierende Substanz enthält und die eine bestimmte geometrische Kontur aufweist, um beim Durchströmen der Lösung eine laminare Vermischung und Turbulenz zu vermeiden,
- Beleuchtungsmitteln der durch die Zelle der Kapillare strömenden fluoreszierenden Substanz durch den Laserstrahl, wobei diese Mittel einen divergenten Strahl erzeugen, der das Volumen der Zelle beleuchtet,
- Sammelmitteln für die durch die fluoreszierende Substanz in der Zelle emittierte Fluoreszenzstrahlung, wobei der Emissionslaser, die Kapillare und der Fluoreszenzsammler so angeordnet sind, dass sie optisch kolinear zusammenwirken,
- Mitteln zum Filtern der gesammelten Fluoreszenzstrahlung,
- Mitteln, die eine Photomultiplerröhre verwenden, um die gefilterte Fluoreszenzstrahlung zu verarbeiten, und
- Mitteln zur Analyse der durch die Mittel, die eine Photomultiplerröhre verwenden, erzeugten Signale und zur Darstellung der Ergebnisse der Analyse.

**[0015]** Eine vergrößerte Kapillare mit spezieller geometrischer Kontur zur Bildung der Zelle ermöglicht es, eine größere Menge der unbekannt Substanz durch den Laserstrahl anzuregen als in einer herkömmlichen zylindrischen Kapillare. Die Detektionsempfindlichkeit für die durch den Laser induzierte Fluoreszenz wird signifikant erhöht, indem man beispielsweise einen Zelltyp einsetzt, wie er in dem oben genannten Patent US-A-5 061 361 vorgeschlagen wird, bei dem vorgesehen ist, dass das gesamte Zellvolumen durch den Laserstrahl beleuchtet wird. Die Verwendung einer Zelle mit spezifischen geometrischen Formen verhindert gleichzeitig eine laminare Vermischung und Turbulenz, was notwendig ist, um die bessere Trennwirkung aufrecht zu erhalten.

**[0016]** Vorteilhaft weisen die Mittel zur Beleuchtung der in der Kapillarzelle strömenden fluoreszierenden

Substanz durch den Laserstrahl einerseits eine Emissionslinse, die einen leicht konvergenten Laserstrahl liefert, und andererseits ein optisches Mittel mit großer numerischer Öffnung, das den leicht konvergenten Strahl in den das Volumen der Zelle beleuchtenden divergenten Strahl umwandelt, auf; man kann vorsehen, dass der Abstand zwischen der Emissionslinse und dem optischen Mittel mit großer numerischer Öffnung zur Beleuchtung der Zelle so gewählt wird, dass der Laserstrahl im Inneren des optischen Mittels mit großer numerischer Öffnung fokussiert wird, wobei der Brennpunkt in der Nähe der Außenfläche des optischen Mittels mit großer numerischer Öffnung liegt; vorzugsweise sind die Beleuchtungsmittel und die Zelle aufeinander abgestimmt und besitzen eine Anordnung zueinander, die das durch den Laserstrahl beleuchtete Volumen der fluoreszierenden Substanz maximiert. Man kann vorsehen, dass die Mittel zum Sammeln der Fluoreszenzstrahlung ein optisches Mittel mit großer numerischer Öffnung aufweisen; wenn die Emissionslinse, die Kapillare und die Mittel zum Sammeln der emittierten Fluoreszenzstrahlung kollinear angeordnet sind, können das zur Beleuchtung der Zelle verwendete optische Mittel mit großer numerischer Öffnung und dasjenige, das in den Sammelmitteln enthalten ist, aus einem einzigen Mittel bestehen. Die Verwendung von optischen Mitteln mit großer numerischer Öffnung zum Sammeln der Fluoreszenzstrahlung ermöglicht es, die Effizienz beim Sammeln zu maximieren und das Streuniveau des Laserlichts am niedrigsten zu halten. Die Eigenschaften des Laserstrahls ergeben eine einzigartige Möglichkeit, die maximale Bestrahlung der Kapillare zu erreichen.

**[0017]** Vorteilhaft ist das einzige optische Mittel mit großer numerischer Öffnung eine kugelförmige Linse, beispielsweise eine Saphirkugel.

**[0018]** Das erfindungsgemäße optische System ist vorzugsweise so ausgelegt, dass der Laserstrahl in der kugelförmigen Linse fokussiert wird, damit man einen divergenten Strahl in der Zelle erhält: durch Justieren der Elemente des Systems kann der Ausgangsdurchmesser des Strahls so verändert werden, dass das gesamte Innenvolumen der Zelle beleuchtet wird; besonders vorteilhaft bestehen die Beleuchtungsmittel und die Sammelmittel aus denselben optischen Mitteln.

**[0019]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle im Inneren einer Quarzkapillare ausgebildet; sie kann im Wesentlichen eiförmig sein und gemäß einer Variante ist die Eiform der Zelle ein Ellipsoid.

**[0020]** Die Verwendung einer herkömmlichen Zelle auf einer Kapillare mit sehr geringem Innendurchmesser (was eine sehr hohe chromatographische und elektrophoretische Auflösung ermöglicht) führt

zu geringen Empfindlichkeiten. Die Kombination einer eiförmigen Zelle mit geringem Innendurchmesser der Kapillare und einer kugelförmigen Linse, insbesondere aus Saphir, mit sehr großer numerischer Öffnung ermöglicht die Kontrolle der Divergenz des Laserstrahls und führt zu einem optimal beleuchteten Volumen und einer besseren Sammelausbeute und somit zu einer besseren Empfindlichkeit. Auf diese Weise steht ein geringer Innendurchmesser bei der Kapillare einer hohen Detektionsempfindlichkeit nicht mehr entgegen. Außerdem ist mit der verwendeten kollinearen Anordnung eine geringe Lichtstreuung verbunden, was zu einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis und folglich zu einer besseren Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen optischen Anordnungen führt.

**[0021]** Vorzugsweise verwendet man eine Saphirlinse in Form einer Kugel, denn eine solche Linse kombiniert einen hohen Brechungsindex mit einer Kugelform, wodurch man eine große numerische Öffnung erhält, die übrigens weiter erhöht werden kann, indem man zwischen der Linse und der Kapillare eine Flüssigkeit mit geeignetem Brechungsindex verwendet. Außerdem eröffnet die korrekte Übertragung des Lichts durch den Saphir mit den entsprechenden Lasern die mögliche zukünftige Verwendung von laserinduzierter Fluoreszenz im UV- und IR-Bereich zu vertretbaren Kosten.

**[0022]** Vorteilhaft sind die Mittel zur Ausstrahlung des Laserstrahls, die Emissionslinse, das optische Mittel mit großer numerischer Öffnung zur Beleuchtung der Zelle und die Zelle selbst so angeordnet, dass der Laserstrahl die Emissionslinse bezüglich ihrer optischen Achse leicht versetzt erreicht und anschließend das optische Mittel mit großer numerischer Öffnung unter einem kleinen Winkel mit der Achse erreicht.

**[0023]** Die erfindungsgemäßen Detektoren zur laserinduzierten Fluoreszenz können in der Flüssigchromatographie und der Kapillarelektrophorese (CE) eingesetzt werden.

**[0024]** Gegenstand der Erfindung ist folglich auch eine Kapillarelektrophoresevorrichtung oder eine Flüssigchromatographievorrichtung mit einem wie oben definierten Detektor für laserinduzierte Fluoreszenz.

**[0025]** Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation von unbekanntem Substanzen mit den folgenden Schritten:

- Ausstrahlen eines Laserstrahls zu einer im Inneren einer Kapillare ausgesparten Zelle, wobei die Zelle eine Lösung aufnimmt, die wenigstens eine unbekanntes Substanz enthält, die bei der Wellenlänge des Lasers eine Fluoreszenzstrahlung erzeugt, wobei die Zelle bestimmte geometrische

Konturen aufweist, um eine laminare Vermischung und Turbulenz während des Durchströmens der Lösung zu vermeiden, Beleuchten der fluoreszierenden Substanz durch den Laserstrahl mittels optischer Mittel, die einen divergenten Strahl erzeugen, die das Volumen der Zelle beleuchtet,

- Sammeln der durch die fluoreszierende Substanz emittierten Fluoreszenzstrahlung, wobei der Emissionslaser, die Kapillare und die Fluoreszenzsammelmittel so angeordnet sind, dass sie optisch kolinear zusammenwirken,
- Sammeln und Filtern der Fluoreszenzstrahlung,
- Übertragen der gefilterten Fluoreszenzstrahlung auf eine Photomultiplerröhre,
- Analysieren der durch die Photomultiplerröhre erzeugten Signale und Darstellen der Analyseergebnisse.

**[0026]** Vorteilhaft kann das erfindungsgemäße Verfahren außerdem dadurch gekennzeichnet sein, dass man den Laserstrahl mittels einer Emissionslinse mit geringer numerischer Öffnung zunächst in einen leicht konvergenten Laserstrahl umwandelt und dass man dann den konvergenten Strahl mittels einer Linse mit großer numerischer Öffnung in einen divergenten Strahl umwandelt. Außerdem verwendet man vorteilhaft zum Sammeln der Fluoreszenz dieselben optischen Mittel wie zum Beleuchten der Zelle.

**[0027]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst der Schritt des Ausstrahlens eines Laserstrahls einen Schritt zum Sammeln des Laserstrahls in einer Kugel und Richten des sogenannten divergenten Strahls ins Innere der eiförmigen Zelle. Der Schritt des Sammelns der Fluoreszenzstrahlung verwendet dieselbe Kugel, die eine sehr große numerische Öffnung besitzt. Die eiförmige Zelle besitzt spezielle geometrische Formen um beim Durchströmen der Lösung die laminare Vermischung oder die Turbulenz zu verhindern.

**[0028]** Beim Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens bietet eine Verstärkung der Empfindlichkeit um einen Faktor 10 einem Geräteentwickler zahlreiche Möglichkeiten. Beispielsweise kann ein Laser mit niedriger Leistung eingesetzt werden, was bei gleichbleibender Empfindlichkeit eine signifikante Verringerung des Preises mit sich bringt, die mehr als 70% betragen kann, dann so wird der Einsatz eines Diodenlasers oder eines auf einer Diode basierenden Lasers (durch eine Diode gepumpter Laser, dessen Frequenz verdoppelt oder verdreifacht wird) möglich.

**[0029]** Diese Kostenreduktion ist ein wichtiger Faktor um die Zahl der potenziellen Nutzer dieses Nachweisverfahrens zu erhöhen. Außerdem wird so die Detektion von Substanzen möglich, die in sehr niedrigen Konzentrationen in einer Kapillare eluiert wer-

den, welche mit anderen herkömmlichen Detektionsmitteln für laserinduzierte Fluoreszenz nicht nachgewiesen werden können.

**[0030]** Zum besseren Verständnis des Gegenstands der Erfindung wird im Folgenden rein illustrativ und nicht einschränkend ein in der beigefügten Zeichnung dargestelltes Ausführungsbeispiel näher beschrieben.

**[0031]** In der Zeichnung:

- zeigt [Fig. 1](#) eine schematische Ansicht eines erfindungsgemäßen Detektors mit einer kolinearen optischen Anordnung;
- zeigt [Fig. 2](#) im Detail das Profil des Laserstrahls beim Durchqueren der Anordnung (kugelförmige Linse/eiförmige Zelle) in der Ebene der [Fig. 1](#);
- zeigt [Fig. 3](#) im Detail das Profil des Laserstrahls beim Durchqueren der Anordnung (kugelförmige Linse/eiförmige Zelle) in der in [Fig. 1](#) durch III-III angedeuteten Ebene.

**[0032]** In [Fig. 1](#) erkennt man, dass die Emissions- und Sammelmittel kolinear angeordnet sind. Der erfindungsgemäße Detektor **1** umfasst eine Laserlichtquelle **5**, die einen Laserstrahl **8** ausstrahlt, einen dichroitischen Spiegel **17**, der den Laserstrahl **8** orthogonal durch eine Linse mit niedriger numerischer Öffnung **6** in Richtung einer kugelförmigen Saphirlinse **10** mit einem Durchmesser von etwa 1-3 mm lenkt. Die Linse **10** arbeitet als optisches Mittel mit großer numerischer Öffnung um mit dem Laserstrahl **8** eine eiförmige Zelle **4** zu beleuchten und um die induzierte Fluoreszenz zusammen, wobei ein im Wesentlichen paralleler gesammelter Lichtstrahl geliefert wird. Der gesammelte Lichtstrahl **16** wird durch eine Filtergruppe **11** gefiltert und fällt auf eine Photomultiplerröhre **12**, die Signale liefert, welche die Intensität der Fluoreszenzstrahlung repräsentieren. Die Signale werden durch einen Rechner **13** oder ein analoges System bearbeitet und analysiert.

**[0033]** Die Achse der Saphirkugel liegt auf der Achse der Linse **6**; die Kugel wandelt den von der Linse **6** kommenden, leicht konvergenten Laserstrahl in einen kurzen divergenten Laserstrahl um, der das gesamte Innenvolumen der eiförmigen Zelle **4** einschließt, wenn die Eigenschaften des konvergenten Strahls optimiert werden (Durchmesser des Laserstrahls, numerische Öffnung der Linse **6**, Abstand zwischen der Linse **6** und der Saphirkugel **10**). Um einen kurzen divergenten Strahl zu erzeugen erreicht der Laserstrahl die Linse **6** gegenüber der Systemachse leicht versetzt und erreicht anschließend die Saphirkugel **10** unter einem kleinen Winkel bezüglich der Achse und gegenüber der Achse versetzt. Durch Einstellen des Abstandes zwischen der Linse **6** und der Saphirkugel kann der Laserstrahl bei F im Inneren der Kugel fokussiert werden, wobei der Brennpunkt F dicht an der Außenfläche der Kugel liegt, so

dass der aus der Saphirkugel austretende divergente Strahl zum Beleuchten der eiförmigen Zelle **6** zwischen 20 und 250  $\mu\text{m}$  eingestellt werden kann.

**[0034]** Die Saphirkugel mit hoher numerischer Öffnung wandelt den aus dem Probevolumen austretenden sehr divergenten Kegel des Fluoreszenzlichtes in einen leicht divergenten Lichtkegel um, der durch die Linse **6** praktisch kollimiert wird und mit geeigneten Mitteln gekoppelt werden kann, die eine Messung des Lichts ermöglichen, wie beispielsweise die Photomultiplerröhre **12**.

**[0035]** Außerdem unterdrückt die kolineare Anordnung, bei der derselbe optische Aufbau für die Emission und die Sammlung des Lichtes verwendet wird, die Schwierigkeit, zwei optische Einrichtungen in der gleichen Position in der Nähe des geringen Durchmessers der Kapillare (üblicherweise 375  $\mu\text{m}$  Außendurchmesser) anzuordnen, wie dies bei einem orthogonalen Aufbau notwendig ist.

**[0036]** [Fig. 2](#) zeigt die große numerische Öffnung der Kugel; der leicht konvergente Laserstrahl wird in der Kugel fokussiert, woraus ein divergenter Laserstrahl resultiert, der die Saphirkugel verlässt und das gesamte Innenvolumen der eiförmigen Zelle beleuchtet.

**[0037]** Eine Flüssigkeit **3** mit einer unbekannt Substanz, die bei der Wellenlänge des Lasers Fluoreszenzlicht emittiert, fließt durch die Zelle **4** aus einer (nicht dargestellten) Chromatographiesäule (oder Mikrosäule) oder einem Kapillarelektrophoresesystem.

**[0038]** Im Falle einer Chromatographiesäule (oder einer Mikrosäule) ist die Kapillare **2** eine Kapillare mit geringem aktiviertem oder deaktiviertem Durchmesser, der je nach Ausstoß bei einem Innendurchmesser von 50 bis 350  $\mu\text{m}$  liegt; im Fall eines Kapillarelektrophoresesystems ist die Kapillare **2** eine Kapillare mit geringem Durchmesser, wobei der Innendurchmesser unter 100  $\mu\text{m}$  beträgt.

**[0039]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Detektors **1** kann die Laserquelle **5** ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm (ILT, Salt Lake City (Utah)), mit einer maximalen Emissionsleistung von 7 mW oder ein Heliumneonlaser mit einer Wellenlänge von 543 nm von Melles Griot, Irvine (Kalifornien) mit einer Maximalleistung von 1,5 mW sein. Die Linse **6** ist ein  $5 \times 0,12$  Achrostigmat-Objektiv (Zeiss (Deutschland)).

**[0040]** Die Kapillare **2** ist eine 70 cm lange Quarzkapillare (75  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser, 375  $\mu\text{m}$  Außendurchmesser) von Polymicro Technology Phoenix (Arizona). Die Kapillare **2** wird in einen Kapillarelektrophoreseapparat eingebaut, beispielsweise einen

SpectraPHORESIS 100 TSP (Fremont (Kalifornien)). Die Photomultiplerröhre (PMT) **12** ist ein R928 PMT von Hamamatsu Photonics (Japan). Das Signal am Ausgang des PMT wird von einem Rechner **13**, beispielsweise einem 486er Personal Computer verarbeitet, der ein Datenerfassungssystem verwendet.

### Patentansprüche

1. Detektor für laserinduzierte Fluoreszenz mit

- Mitteln (**5**) zum Ausstrahlen eines Laserstrahls (**8**)
- einer Zelle (**4**) im Inneren einer Kapillare (**2**), wobei die Zelle (**4**) eine Lösung aufnimmt, die wenigstens eine unbekannt bei der Wellenlänge des Lasers fluoreszierende Substanz enthält und die eine bestimmte geometrische Kontur aufweist, um beim Durchströmen der Lösung eine laminare Vermischung und Turbulenz zu vermeiden,
- Beleuchtungsmitteln (**6**, **10**) der durch die Zelle (**4**) der Kapillare (**2**) strömenden fluoreszierenden Substanz durch den Laserstrahl, wobei diese Mittel einen divergenten Strahl erzeugen, der das Volumen der Zelle (**4**) beleuchtet,
- Sammelmitteln (**10**, **6**) für die durch die fluoreszierende Substanz in der Zelle (**4**) emittierte Fluoreszenzstrahlung, wobei der Emissionslaser, die Kapillare (**2**) und der Fluoreszenzsammler so angeordnet sind, dass sie optisch kolinear zusammenwirken,
- Mitteln (**11**) zum Filtern der gesammelten Fluoreszenzstrahlung,
- Mitteln, die eine Photomultiplerröhre (**12**) verwenden, zur Verarbeitung der gefilterten Fluoreszenzstrahlung, und
- Mitteln (**13**) zur Analyse der durch die Mittel, die eine Photomultiplerröhre (**12**) verwenden, erzeugten Signale und zur Darstellung der Ergebnisse der Analyse.

2. Detektor gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungsmittel (**6**, **10**) einerseits eine Emissionslinse (**6**), die einen leicht konvergenten Laserstrahl liefert, und andererseits ein optisches Mittel (**10**) mit großer numerischer Öffnung, das den leicht konvergenten Strahl in den das Volumen der Zelle (**4**) beleuchtenden divergenten Strahl umwandelt, aufweisen.

3. Detektor gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand zwischen der Emissionslinse (**6**) und dem optischen Mittel (**10**) mit großer numerischer Öffnung zur Beleuchtung der Zelle (**4**) so gewählt wird, dass der Laserstrahl im Inneren des optischen Mittels (**10**) mit großer numerischer Öffnung fokussiert wird, wobei der Brennpunkt (F) in der Nähe der Außenfläche des optischen Mittels (**10**) mit großer numerischer Öffnung liegt.

4. Detektor gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungsmittel (**6**, **10**) und die Zelle (**4**) aufeinander abgestimmt sind und eine Rela-

tivanordnung besitzen, die das durch den Laserstrahl beleuchtete Volumen der fluoreszierenden Substanz maximiert.

5. Detektor gemäß einem der Ansprüche 1 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum Sammeln der Fluoreszenzstrahlung ein optisches Mittel (10) mit großer numerischer Öffnung aufweisen.

6. Detektor gemäß Anspruch 5 in Kombination mit einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das zur Beleuchtung der Zelle verwendete optische Mittel mit großer numerischer Öffnung mit demjenigen verbunden ist, das in dem Sammelmittel enthalten ist.

7. Detektor gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4 für sich betrachtet oder in Kombination mit einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass das zur Beleuchtung der Zelle und/oder als Sammelmittel verwendete optische Mittel mit großer numerischer Öffnung eine Linse (10) in Form einer Kugel ist.

8. Detektor gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Linse in Form einer Kugel eine Saphirkugel (10) ist.

9. Detektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zur Ausstrahlung des Laserstrahls, die Emissionslinse (6) das Mittel (10) mit großer numerischer Öffnung zur Beleuchtung der Zelle (4) und die Zelle (4) selbst so angeordnet sind, dass der Laserstrahl die Emissionslinse (6) bezüglich ihrer optischen Achse leicht versetzt erreicht und anschließend das optische Mittel (10) mit großer numerischer Öffnung unter einem kleinen Winkel mit der Achse erreicht.

10. Detektor gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Beleuchtungsmittel und die Sammelmittel aus denselben optischen Mitteln bestehen.

11. Detektor gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Flüssigkeit zwischen der Kapillare (2) und dem optischen Mittel (10) mit großer numerischer Öffnung angeordnet ist.

12. Detektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eiförmig ist.

13. Vorrichtung zur Kapillarelektrophorese mit einem Detektor für laserinduzierte Fluoreszenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12.

14. Vorrichtung zur Flüssigchromatographie mit einem Detektor für laserinduzierte Fluoreszenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12.

15. Verfahren zur Identifikation von unbekanntem Substanzen, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

- Ausstrahlen eines Laserstrahls zu einer im Inneren einer Kapillare (2) ausgesparten Zelle (4), wobei die Zelle (4) eine Lösung aufnimmt, die wenigstens eine unbekanntes Substanz enthält, die bei der Wellenlänge des Lasers eine Fluoreszenzstrahlung erzeugt, wobei die Zelle (4) bestimmte geometrische Konturen aufweist, um eine laminare Vermischung und Turbulenz während des Durchströmens der Lösung zu vermeiden

- Beleuchten der fluoreszierenden Substanz durch den Laserstrahl mittels optischer Mittel (6, 10) die einen divergenten Strahl erzeugen, der das Volumen der Zelle (4) beleuchtet,

- Sammeln der durch die fluoreszierende Substanz emittierte Fluoreszenzstrahlung, wobei der Emissionslaser, die Kapillare (2) und die Fluoreszenzsammelmittel so angeordnet sind, dass sie optisch kollinear zusammenwirken,

- Sammeln und Filtern der Fluoreszenzstrahlung,

- Übertragen der gefilterten Fluoreszenzstrahlung auf eine Photomultiplirohre (12),

- Analysieren der durch die Photomultiplirohre (12) erzeugten Signale und Darstellen der Analyseergebnisse.

16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass man den Laserstrahl (8) zunächst mittels einer Emissionslinse (6) mit geringer numerischer Öffnung in einen leicht konvergenten Strahl umwandelt und dass man anschließend den konvergenten Strahl mittels einer Linse (10) mit großer numerischer Öffnung in einen divergenten Strahl umwandelt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass man zum Sammeln der Fluoreszenz dieselben optischen Mittel (6, 10) wie zum Beleuchten der Zelle verwendet.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

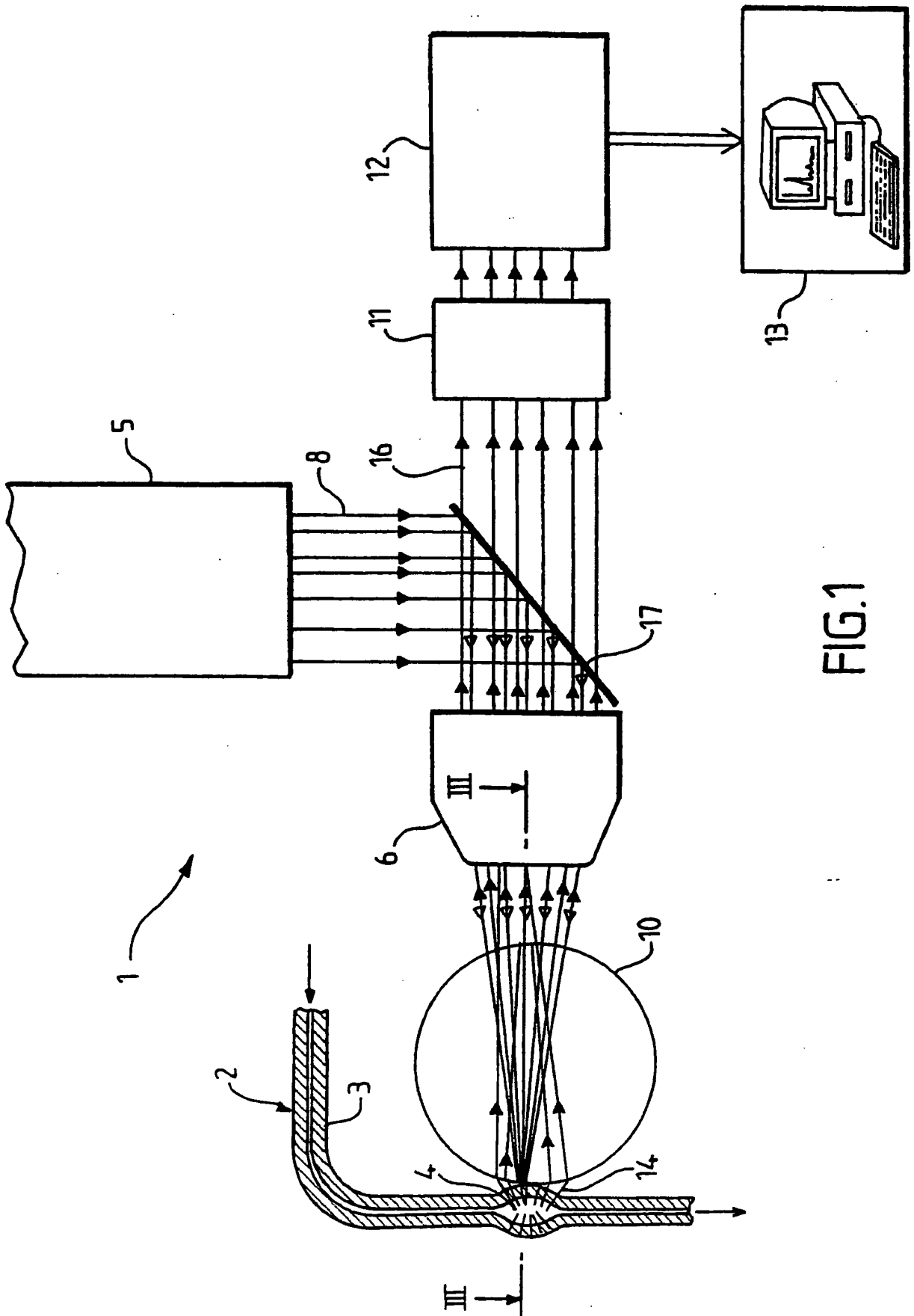


FIG.1

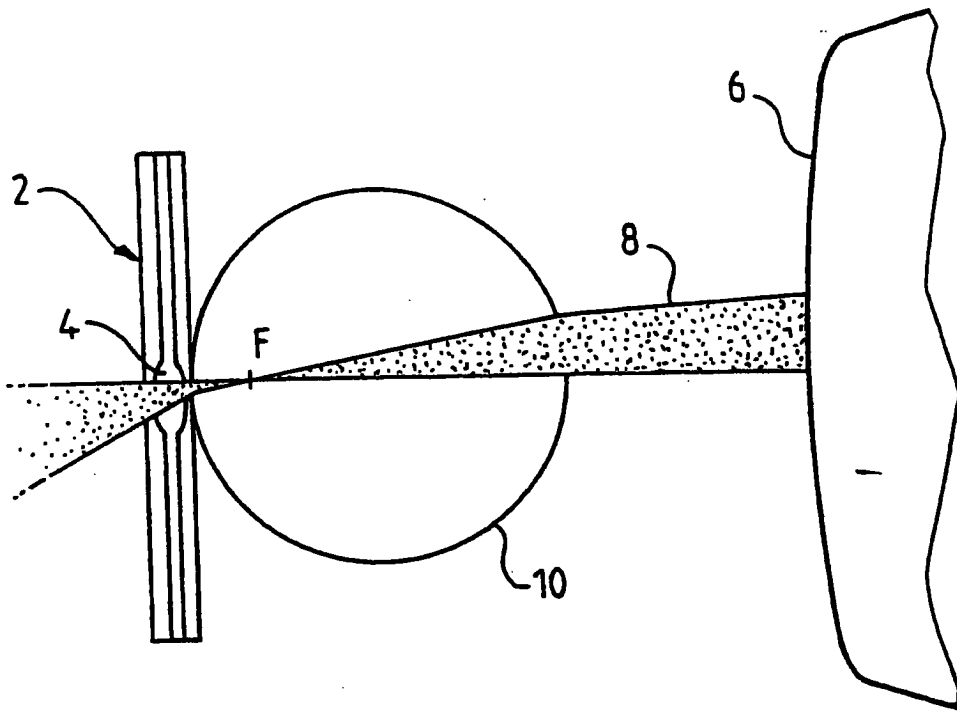


FIG. 2

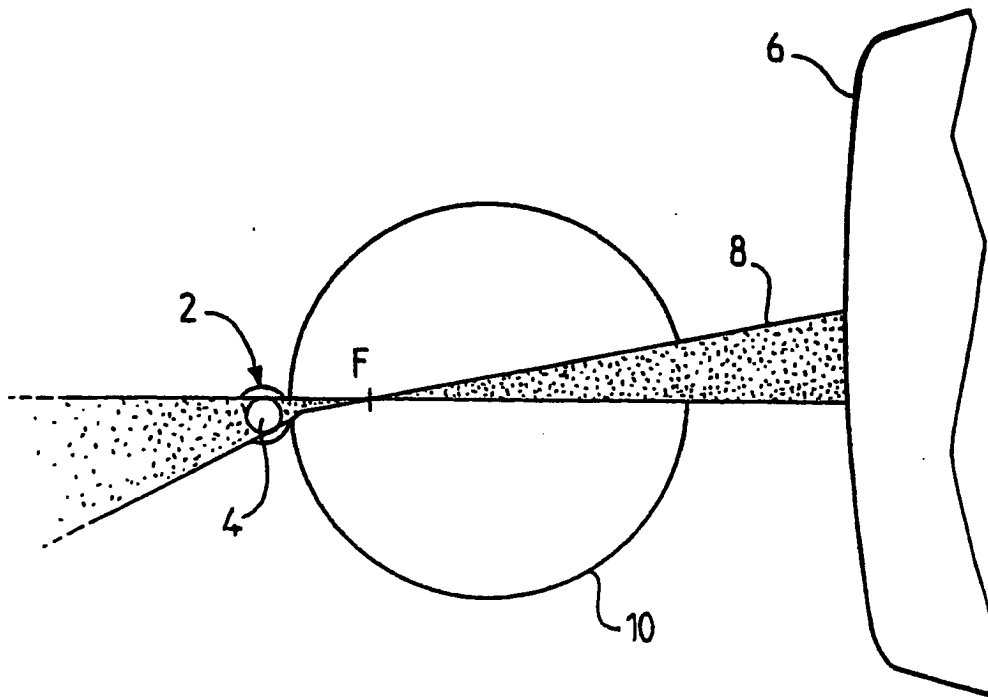


FIG. 3