

Tabelle 4. Transsialylierungen mit immobilisierter Sialidase.

Acceptoren	(2-6)-Isomere	Produkte	(2-3)-Isomere
β Gal-OCH ₃ 3			
α Gal-OCH ₃ 5			
β Glc-OCH ₃ 7			
β Gal(1-4) β Glc-OCH ₃ 9			
β Gal(1-4)GlcNAc-OH 11			

nicht nur mit klassisch-chemischen Methoden sondern auch mit der (2-3)-Sialyl-Transferase unbefriedigend sind, solange dieses Enzym noch nicht auf gentechnologischem Wege in ausreichendem Maße produziert wird. Auch die geringe Aglycon-Spezifität der Sialidasen erweist sich von Vorteil, da sie Sialylierungen unphysiologischer Acceptoren zuläßt. Sialidasen sind zudem vergleichsweise problemlos zu isolieren, leicht zu handhaben und begnügen sich mit relativ einfachen Ausgangsverbindungen.

Arbeitsvorschriften

Immobilisierung der Sialidase: In 1 mL Enzymlösung (1 U mL⁻¹) und 4 mL 1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7.5) werden 500 mg VA-Epoxy suspendiert und 3 d bei 20 °C geschüttelt. Danach wird das Immobilisat mehrmals mit 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer gewaschen (pH 7.5) und anschließend mit 2 mL 5 proz. Mercaptoethanol-Lösung (pH 8.0) 3 d bei 20 °C unter Schütteln nachbehandelt. Nach nochmaligem Waschen betrug die Aktivitätsausbeute des lyophilisierten Präparats 68 % (1.36 U g⁻¹).

Sialylierungen mit immobilisierter Sialidase: a) 25 µmol Donor 2, 175 µmol Acceptor und 40 mg (60 mU) Immobilisat werden in 130 µL entgastem Inkubationspuffer (0.1 M NaOAc, 0.5 mM CaCl₂, 0.03 % NaN₃, pH 5.5) angeteigt und bei 26 °C inkubiert (siehe Tabelle 2). Die Reaktionen werden durch Verdünnen mit bidestilliertem H₂O und sofortigem Abzentrifugieren des Immobilisats abgebrochen. Die Aufarbeitung erfolgt durch Anionenaustauschchromatographie (Dowex 1 × 2, PO₄³⁻-beladen) [3b]. Die sich anschließende gelchromatographische Entsalzung (Sephadex G15) der Produktfraktionen wird konduktometrisch überprüft. b) Dem Inkubationspuffer werden 30 Vol.-% DMSO zugesetzt, ansonsten gleiche Vorgehensweise wie unter a) beschrieben. Analytische HPLC zur Quantifizierung der Stellungsisomere [12] (siehe Tabelle 2): Säule: Lichrosorb-NH₂ (5 × 240 mm), Laufmittel: 15 mM KH₂PO₄/Acetonitril 28 : 72, Flußrate: 1.2 mL min⁻¹, Detektion bei 200 nm.

Eingegangen am 18. Juni 1991 [Z 4729]

- [1] a) R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40 (1982) 131; b) *Sialic Acids Chemistry, Metabolism and Function* (Cell Biology Monographs Vol. 10) Springer, Wien 1982; c) *Biochem. Soc. Trans.* 11 (1983) 270; d) J. C. Paulson, G. N. Rogers, S. M. Carroll, H. H. Higa, T. Pritchett, G. Milks, S. Sabesan, *Pure Appl. Chem.* 56 (1984) 797; e) S. Hakomori, *Annu. Rev. Immunol.* 2 (1984) 103; f) M. H. Ravindranath, H. H. Higa, E. L. Cooper, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8850.
[2] a) H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* 125 (1984) 47; b) T. Ogawa, M. Sugimoto, *ibid.* 135 (1985) C5; c) H. Paulsen, U. von Deessen, *ibid.* 146 (1986) 147; d) K. Okamoto, T. Goto, *Tetrahedron* 46 (1990) 5835.

- [3] a) J. Thiem, W. Treder, *Angew. Chem.* 98 (1986) 1100; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 1096; b) S. Sabesan, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 2068; c) E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *ibid.* 110 (1988) 7159; d) E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* 45 (1989) 5365.
[4] a) K. G. J. Nilsson, *Trends Biochem. Sci.* 6 (1988) 256; b) S. C. T. Svensson, J. Thiem, *Carbohydr. Res.* 200 (1990) 391.
[5] Sialidase aus *Vibrio Cholerae* (EC 3.2.1.18) wurde dankenswerterweise von den Behringwerken AG, Marburg, zur Verfügung gestellt.
[6] K. Burg, O. Mauz, S. Noetzel, K. Sauber, *Angew. Makromol. Chem.* 157 (1988) 105.
[7] V. Eschenfelder, R. Brossmer, *Carbohydr. Res.* 162 (1987) 294.
[8] a) S. L. Haynie, C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 5416; b) J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.* 102 (1990) 78; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 80.
[9] A. P. Corfield, J.-C. Michalski, R. Schauer in G. Tetamanti, P. Durand, S. DiDonato (Hrsg.): *Sialidases and Sialidases, Perspectives in Inherited Metabolic Diseases*, Vol. 4, Edition Ermes, Mailand 1981.
[10] a) H. Wiegandt in L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus, P. F. Urban (Hrsg.): *Structure and Function of Gangliosides*, Plenum Press, New York 1980; b) N. K. Kochetkov, I. G. Zhukova, G. P. Smirnova, I. S. Glukhoded, *Biochim. Biophys. Acta* 326 (1973) 74.
[11] a) J. Montreuil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37 (1980) 158; b) A. Kobata, *Cell. Struct. Funct.* 4 (1979) 169; c) B. L. Slomiany, V. L. N. Murty, A. Slomiany, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 9719.
[12] M. L. E. Bergh, P. Koppen, D. H. van den Eijnden, *Carbohydr. Res.* 94 (1981) 225.

Mikroporöse Siliciumdioxidfilme

Von Wilhelm F. Maier*, Michael Wiedorn und Herbert O. Schramm

Dünne keramische Filme werden zunehmend als optische oder schützende Beschichtung in der Mikroelektronik eingesetzt. Mikroporöse Keramikmembranen mit Porendurch-

[*] Prof. Dr. W. F. Maier, Dipl.-Chem. M. Wiedorn, Dipl.-Chem. H. O. Schramm
Institut für Technische Chemie der Universität-Gesamthochschule Schützenbahn 70, W-4300 Essen 1

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert.

messern von 5–10 Å sind für Trennprozesse in der Lebensmittelindustrie und in der Gastrennung ebenso von Interesse wie für Anwendungen in der nichtlinearen Optik oder bei mikroelektronischen Sensoren. Bisher basieren die Untersuchungen zur Herstellung mikroporöser Keramikfilme immer auf den durch eine definierte Mikroporenstruktur charakterisierten Zeolithe. Die Herstellung homogener loch- und rißfreier Filme ist jedoch vor allem wegen der begrenzten Kristallitgröße von Zeolithen noch sehr schwierig. Wir berichten nun über die Porenradienverteilung in neuen mikroporösen, homogenen Siliciumdioxidfilmen, die durch Elektronenstrahlverdampfung in beliebiger Dicke hergestellt werden können und prinzipiell als mikroporöse Keramikmembranen geeignet sind.

Unser Interesse an der Mikroporosität von dünnen Siliciumdioxidfilmen stammt aus der heterogenen Katalyse. In Untersuchungen über den Mechanismus heterogener Hydrier- und H/D-Austauschreaktionen an Kohlenwasserstoffen haben wir dünne Siliciumdioxidfilme (50–200 nm) als Schutzschichten auf den Katalysatoren verwendet^[1], um eine direkte Wechselwirkung des katalytisch aktiven Metallfilms (Pt auf Si-Wafer) mit dem organischen Reagens zu verhindern. Die Oxidschicht war für die organischen Reaktanten weitgehend undurchlässig, während der Wasserstoff durch die Oxidschicht diffundierte, an der Pt-SiO₂-Grenzschicht aktiviert wurde und als Spillover-Wasserstoff zur Oberfläche zurückdiffundierte, um dort mit dem organischen Reaktanten zu reagieren (Einstellung eines Gleichgewichtskonzentrationsgradienten an aktiviertem Wasserstoff in der Oxidschicht). Allerdings blieb der Diffusionsprozeß unklar, da die Untersuchungen keine Hinweise auf Risse oder Löcher ergaben. Als einzige Möglichkeit, unsere Daten zu erklären, blieben Mikroporen, deren Nachweis und die Bestimmung, der für die Interpretation der Ergebnisse entscheidenden Porendurchmesser uns jedoch aufgrund der geringen Filmmenge damals unmöglich schienen. Unsere überraschenden Befunde stießen auf großes Interesse^[2].

Um die Porenradienverteilungen der Siliciumdioxidfilme, die mit Elektronenstrahlverdampfung hergestellt wurden, durch Stickstoffadsorption zu bestimmen, verwendeten wir zur Filmherstellung nicht wie früher einen dünn mit Pt beschichteten Si-Wafer als Substrat, sondern kommerzielle Aluminiumfolie, da der Siliciumdioxidfilm hier nicht nur mechanisch, sondern auch durch Auflösen der Aluminiumfolie in 2 N HCl oder durch Ablösen in reinem Wasser vom Substrat separiert werden kann. Da schon gezeigt wurde, daß die Filme amorph sind, und sich die Filmstruktur auf Platin von der auf Aluminium höchstens bei den ersten Atomlagen unterscheidet, sollte die Filmstruktur, besonders in Dicken größer als 50 nm, trägerunabhängig sein. Aus der Stickstoffadsorptionsisotherme wurden die spezifische Oberfläche und das Porenvolumen nach BET^[3] und nach Dubinin^[4] berechnet, und die Porenradienverteilung wurde (von 3–300 Å) nach der Kelvin-Gleichung^[5] und nach der Mikroporen(MP)-Methode^[6] aus den Adsorptionsdaten ermittelt.

Die Adsorptionsisotherme, die typisch für ein hochmikroporöses Material ist (Abb. 1), liefert nach der Kelvin-Gleichung die in Abbildung 2 gezeigte Porenradienverteilung des Siliciumdioxidfilms. Obgleich die Gleichung ihre Gültigkeit für die Radienzuordnung bei Poren kleiner als 15 Å verliert^[7], zeigt die Auswertung doch, daß eine enge Porenverteilung mit Durchmessern deutlich unter 15 Å vorliegt und daß keine Poren mit größerem Durchmesser vorhanden sind. Bei der Analyse von Mikroporen im Radienbereich < 10 Å ist man auf die MP-Methode, für die der t-Plot (t steht für die Schichtdicke) nach de Boer et al.^[8] benötigt wird, angewiesen. Als Qualitätskriterium für deren Anwendbarkeit wur-

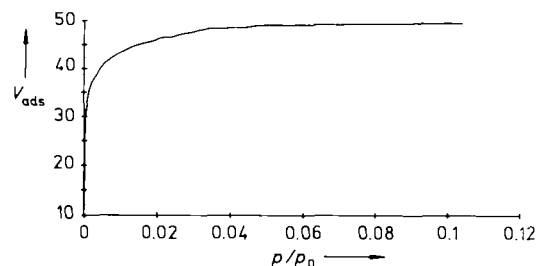


Abb. 1. Ausschnitt aus der Stickstoffadsorptionsisotherme eines mit Elektronenstrahlverdampfung hergestellten Siliciumdioxidfilms. Bei $p/p_0 > 0.1$ (nicht dargestellt) wurde keine weitere N₂-Adsorption gemessen. Adsorptionsvolumen V_{ads} in $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$.

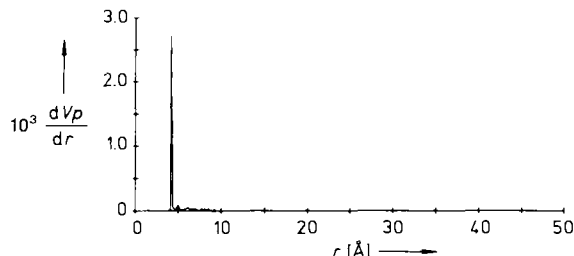


Abb. 2. Porenradienverteilung des Siliciumdioxidfilms von Abbildung 1, erhalten durch Auswertung nach der Kelvin-Gleichung. dVp/dr in $\text{mL} \text{Å}^{-1}$.

den die berechneten Werte für Oberfläche und Porenvolumen mit denen der BET- und Dubinin-Auswertung verglichen. Mit der Halsey-Gleichung^[9] als Standardisotherme für den t-Plot resultierten keine sinnvollen Oberflächen und Porenvolumina. Als unporöses Referenzmaterial erwies sich fein zerriebene Quarzwolle als geeignet. Abbildung 3 zeigt die Mikroporenverteilung aus dem t-Plot^[6]. Die negative Steigung weist auf ein Maximum der Porenradienverteilung kleiner oder gleich 3 Å hin. Diese Art der Auswertung wurde an mehreren Molekularsieben überprüft. Wir können daher die Genauigkeit der Auswertung auf besser als $\pm 1 \text{ Å}$ abschätzen, was für das mikroporöse Siliciumdioxid Porendurchmesser von $6 \pm 2 \text{ Å}$ ^[13] ergibt.

Ob das gemessene Porenvolumen auf eine innere oder eine äußere Porenstruktur zurückzuführen ist, wurde durch Adsorptionsmessungen an 10 unterschiedlich dicken Filmen überprüft (Dicke 250–4000 nm, Gesamtoberfläche 155–259 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, Porenvolumen 0.055–0.09 $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, von der Schichtdicke unabhängig). Das Maximum der Porenradienverteilung war in allen Fällen gleich. Das gemessene Porenvolumen ist somit nicht durch eine äußere Rauigkeit des Films, sondern nur durch innere Poren- oder Kanalstrukturen zu erklären.

Da der Bereich der Porengröße an der Grenze der Berechnungsmethoden liegt, waren wir an einer besseren Abschätzung der tatsächlichen Porengröße im unteren Größenbe-

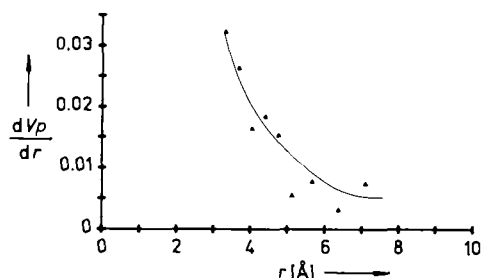


Abb. 3. Porenradienverteilung des Siliciumdioxidfilms von Abbildung 1, erhalten durch Auswertung nach der MP-Methode.

Tabelle 1. BET-Auswertung von Stickstoffadsorptionsisothermen.

	SiO ₂ -Film	3 Å	Zeolith 4 Å	5 Å	NaY
Porenvolumen [cm ³ g ⁻¹]	0.07	0.003	0.013	0.23	0.34
Oberfläche [m ² g ⁻¹]	192	9.3	37.2	661.7	960

reich interessiert, um festzustellen, ob kleinere Poren vorliegen, die durch Stickstoffadsorption nicht mehr erfaßt werden können. Wir ermittelten dazu die Adsorptionsisothermen von drei Molekularsieben und einem reinen NaY-Zeolithen (Tabelle 1). Während der NaY-Zeolith und das 5 Å-Molekularsieb Stickstoff leicht adsorbieren, zeigen das 4 Å- und das 3 Å-Molekularsieb nur geringe N₂-Adsorption, d. h. in Übereinstimmung mit der Literatur^[11], sind hier die Poren für Stickstoff (Rotationsdurchmesser 4.3 Å) als Adsorbat zu klein.

Um zu klären, ob die Siliciumdioxidfilme eventuell ähnlich kleine Poren enthalten, mußten sie mit einem Adsorbat, das kleiner als Stickstoff ist, überprüft werden. Eines der wenigen hierfür geeigneten ist Wasser mit einem Rotationsdurchmesser von 2.6 Å. Da die Aufnahme der Adsorptionsisothermen von Wasser jedoch technische Probleme verursacht, haben wir uns mit der Thermogravimetrie (TGA) beholfen. Zwei Siliciumdioxidfilme und drei Molekularsiebe wurden mit Wasser gesättigt, getrocknet (1 h bei 120 °C im Trockenschrank, 1 h bei 80 °C für den 4000 nm-Film) und thermoanalytisch an einem SETARAM TGA92 untersucht (Tabelle 2). Die Temperatur der maximalen Wasserabgabe nimmt mit abnehmender Porengröße der Molekularsiebe zu. Die wesentlich niedrigeren Wasserabgabetemperaturen der Siliciumdioxidfilme weisen darauf hin, daß das Wasser von diesen weniger stark adsorbiert wird. Für die drei Molekularsiebe erhält man aus den Gewichtsverlusten, anders als bei der Stickstoffadsorption, aber in Einklang mit der zu erwartenden gleichen Porosität der Molekularsiebe, nahezu identische Werte für die Porenvolumina. Im Falle des 5 Å-Molekularsiebs liegt der durch TGA ermittelte Wert ca. 40 % unter dem BET-Volumen von 0.23 cm³ g⁻¹, das dem Literaturwert für die Wasseradsorptionskapazität dieses Molekularsiebs^[11] entspricht. Die Abweichung läßt sich vermutlich auf die Vortrocknung der Molekularsiebe zurückführen, da beim sehr schonend vorbehandelten 4000 nm-Film das der Gewichtsänderung entsprechende Porenvolumen mit dem BET-Porenvolumen übereinstimmt. Damit sind alle erfaßten Mikroporen in den Siliciumdioxidfilmen größer als der kritische Stickstoffdurchmesser.

Aus unseren Untersuchungen folgern wir, daß Siliciumdioxidfilme, die durch Elektronenstrahlverdampfung hergestellt wurden, eine enge Mikroporenverteilung ähnlich der des 5 Å-Molekularsiebs und eine Porosität von 14 % aufweisen. Sie sind daher potentielle Materialien für die Herstellung von mikroporösen Membranen und Oberflächenbeschichtungen. Die Homogenität und die relativ einfache

Herstellung der Filme lassen dieses Material als vielversprechende Alternative zu Zeolithfilmen erscheinen.

Die extreme Mikroporosität der Siliciumdioxidfilme bestätigt unsere ursprüngliche Interpretation der katalytischen Untersuchungen an den mit SiO₂ überschichteten Pt/Si-Katalysatoren^[1]. Die ca. 6 Å engen Poren sind für Wasserstoff leicht passierbar, während die Diffusion der organischen Reaktanten durch die mikroporöse SiO₂-Überschichtung stark gehemmt ist. Auch die Einstellung eines Konzentrationsgradienten von aktiviertem Wasserstoff (Spillover) als Erklärung des beobachteten katalytischen Phänomens^[1] scheint plausibel.

Experimentelles

Die Filme wurden in einer Verdampfungseinheit von Balzers (BAE 250) mit einer 3 kW-Elektronenstrahlkanone E036-15 von Edwards hergestellt. Die Verdampfungsgeschwindigkeit lag zwischen 2 und 20 nm min⁻¹ und der Verdampfungsdruck bei $p < 10^{-5}$ Torr. Der Siliciumdioxidfilm wurde auf eine Aluminiumfolie aufgedampft und anschließend von dieser abgelöst. Nach Waschen und Trocknen des Oxids wurde die Stickstoffadsorptionsisotherme in einer umgebauten Sorptomatic 1900 von Carlo Erba (kleinere Probengefäße, Dosageeinheit für geringere Dosagedrücke ($p = 0-100$ Torr), Druckmeßdose, die Gleichgewichtsdrücke von 0-100 Torr erfaßt) aufgenommen. Durch die Umbauten sank der Bedarf an Probenmaterial, und man konnte mehr Punkte im Mikroporenbereich zuverlässiger bestimmen. Die Datenauswertung [12] wurde mit einem in Excel programmierten Makro durchgeführt. Wiederholungen der Messungen zeigten nur geringe Abweichungen in den bestimmten Oberflächen und Porenvolumina.

Eingegangen am 7. Juni 1991 [Z 4685]

- [1] A. B. McEwen, R. H. Fleming, S. Baumann, W. F. Maier, *Nature* 329 (1987) 531; J. M. Cogen, K. Ezaz-Nikpay, R. H. Fleming, S. Baumann, W. F. Maier, *Angew. Chem.* 99 (1987) 1222; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 1182; W. F. Maier, *ibid.* 101 (1989) 135 bzw. 28 (1989) 135.
- [2] K. Seshan, *Appl. Catal.* 50 (1989) N14; S. J. Teichner, *ibid.* 51 (1989) N18; *CHEMTECH* 1988, 518.
- [3] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309; S. Brunauer, L. S. Deming, W. E. Deming, E. Teller, *ibid.* 62 (1940) 1723.
- [4] M. M. Dubinin, *J. Colloid. Interface Sci.* 23 (1967) 487.
- [5] D. Dollimore, G. R. Heal, *J. Appl. Chem.* 14 (1964) 109.
- [6] R. S. Mikhail, S. Brunauer, E. E. Bodor, *J. Colloid. Interface Sci.* 26 (1968) 45.
- [7] J. Seifert, G. Emig, *Chem. Ing. Tech.* 59 (1987) 475.
- [8] B. C. Lippens, J. H. de Boer, *J. Catal.* 4 (1965) 319.
- [9] G. D. Halsey, *J. Chem. Phys.* 16 (1948) 931.
- [10] G. Horváth, K. Kawazoe, *J. Chem. Eng. Jpn.* 16 (1983) 470.
- [11] J. Schröder, *GIT Fachz. Lab.* 30 (1986) 978, 1095.
- [12] S. Lowell, J. E. Shields: *Powder Surface Area and Porosity*, 2. Auflage, Chapman and Hall, London 1984.
- [13] **Nachtrag vom 30. September 1991:** Nach Einreichung dieses Manuskripts wurde von der Firma Micromeritics mit dem neuen Adsorptionsgerät ASAP 2000-M eine Mikroporenbestimmung an unserem SiO₂-Film durchgeführt. Die Auswertung nach Horváth und Kawazoe [10] ergab in guter Übereinstimmung mit unseren Befunden ein Porenverteilungsmaximum bei 5.5 Å.

Photolytische DNA-Spaltung mit [Pt₂(P₂O₅H₂)₄]⁴⁻**

Von William A. Kalsbeck, Neena Grover und H. Holden Thorp*

Die oxidative DNA-Spaltung mit Metallkomplexen ist für Chemiker, die sich mit der Entwicklung von Wirkstoffen und von synthetischen Restriktionsenzymen beschäftigen,

[*] Prof. H. H. Thorp, W. A. Kalsbeck, N. Grover
Department of Chemistry
North Carolina State University
Raleigh, NC 27695-8204 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (Presidential Young Investigator Award, CHE-9157411), der Camille and Henry Dreyfus Foundation (New Faculty Award) und dem North Carolina Biotechnology Center (Academic Research Initiation Grant) gefördert.

Tabelle 2. Thermogravimetrische Untersuchung der Wasseraufnahme von Zeolithen und Siliciumdioxidfilmen.

	3 Å	Zeolith 4 Å	5 Å	SiO ₂ -Film-Schichtdicke 30 000 Å	40 000 Å
Einwaage [mg]	85.0	86.7	85.6	41.7	54.9
ΔM [mg][a]	11.7	11.9	11.9	2.0	3.9
ΔM [Gew.-%][a]	13.8	13.7	13.9	4.7 (6.6)[b]	7.1
T _{max} [°C][c]	211.9	206.0	201.9	118.1	121.2

[a] ΔM = Gewichtsänderung. [b] Bei dem Wert in der Klammer ist der Gewichtsverlust durch die Vortrocknung berücksichtigt (siehe Text). [c] T_{max} = Temperatur der maximalen Gewichtsabnahme.