

# ANGEWANDTE CHEMIE

105. Jahrgang 1993

Heft 5

Seite 659–804

## Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten

Von Heinz Engelhardt\*, Wolfgang Beck, Jörg Kohr und Thomas Schmitt

Die Kapillarelektrophorese ist ein neues instrumentelles Analyseverfahren, das in den letzten Jahren einen starken Aufschwung erfahren hat, weil sie die Vorteile der elektrophoretischen Trennmethode mit der Möglichkeit zur Automatisierung und zu einfacher, direkter Quantifizierbarkeit verknüpft. Wie mit der herkömmlichen Elektrophorese lassen sich Proben über einen weiten Molekulargewichtsbereich trennen, der von anorganischen Ionen bis hin zu Biopolymeren wie DNA und Proteinen reicht. Durch Zusatz von micellenbildenden Detergentien können auch ungeladene Moleküle getrennt werden. Der zusätzliche Verteilungsmechanismus erhöht die Trenneffizienz dieser micellaren elektrokinetischen Chromatographie. Chirale Zusätze wie Cyclodextrine ermöglichen darüber hinaus die Trennung von Enantiomeren. Der schnelle Aufschwung der Kapillarelektrophorese spiegelt sich vor allem auf dem Gerätemarkt sowie in der wachsenden Zahl der wissenschaftlichen Publikationen wider, was optimistisch für die Zukunft dieser Methode stimmt.

### 1. Einleitung<sup>[\*\*]</sup>

Zur Aufklärung der Zusammensetzung komplexer biologischer, umweltrelevanter und industrieller Proben haben die analytischen Trennverfahren wie Chromatographie und Elektrophorese wesentlich beigetragen. Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsfüssigkeitschromatographie (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) ermöglichen die Trennung von komplexen Gemischen sowie die Identifizierung und Quantifizierung der Bestandteile in kürzester Zeit. Durch Kombination der Hochleistungstrennsysteme mit empfindlichen, selektiven und spezifischen Detektoren, z.B. dem UV/VIS-Diodenarray-Detektor dem

Massenspektrometer oder der Fourier-Transform-Infrarot(FTIR)-Spektrometer gelingt die eindeutige Identifizierung der getrennten Substanzen. Die Geräteentwicklung ist so weit fortgeschritten, daß die chromatographischen Analysen weitgehend automatisiert sind.

Die Abgrenzung der Einsatzgebiete von GC und HPLC ergibt sich eindeutig aus den Anforderungen, die an die Probe durch das Analysenverfahren gestellt werden. Wegen der großen Zahl an nichtflüchtigen Verbindungen ist es nicht weiter verwunderlich, daß die HPLC heute das am weitesten verbreitete Trennverfahren ist und noch beträchtliche Zuwachsrate verzeichnet. (Der Markt für HPLC-Geräte wächst immer noch um über 10% pro Jahr.) Probleme treten bei der HPLC immer dann auf, wenn polare und ionogene, insbesondere basische Proben, aber auch Biopolymere, schnell und effizient zu analysieren sind. Dies ist ein inhärentes Problem der Chromatographie an stationären Phasen auf Kieselgelbasis. Obwohl in der Zwischenzeit auch Phasen zur Verfügung stehen, bei denen derartige Probleme kaum noch zutage treten (stationäre Phasen auf rein organischer Basis haben wegen ihres Quellvermögens, schlechterer Effizienz und begrenzter Druckstabilität noch keine weite Verbreitung gefunden), erfordert die Entwicklung einer Analysenmetho-

[\*] Prof. Dr. H. Engelhardt, Dipl.-Chem. W. Beck, Dipl.-Chem. T. Schmitt  
Institut für angewandte physikalische Chemie der Universität  
W-6600 Saarbrücken 11

Dr. J. Kohr  
Lonza AG, CH-3930 Visp (Schweiz)

[\*\*] Häufig gebrauchte Abkürzungen: GC = Gaschromatographie, HPLC = Hochleistungsfüssigkeitschromatographie, SDS = Natriumdodecylsulfat, CE = Kapillarelektrophorese, EOF = elektroosmotischer Fluß, CGE = Kapillargelelektrophorese, EC = Elektrochromatographie, MEC = micellare elektrokinetische Chromatographie, IEF = isoelektrische Fokussierung, ITP = Isotachophorese, RSD = relative Standardabweichung.

de für die Trennung ionogener Substanzen trotzdem noch großes Geschick und grundlegendes Verständnis für die vielfältigen, daran beteiligten Sorptions- und Austauschprozesse.

Geladene Teilchen wandern in Lösung unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Bereits in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts wurden dafür die Begriffe „Elektrophorese“ und „elektrische Überführung“ geprägt<sup>[1–4]</sup>. Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten können zwei Ursachen haben: Die Teilchen tragen ungleiche Ladungen und werden daher durch das angelegte Feld entweder verschieden stark beschleunigt oder sie setzen der Wanderung einen unterschiedlichen Reibungswiderstand entgegen. Im einfachsten Fall ist die Trennstrecke, die Elektrolytlösung, in einer Röhre, da hierbei keine Wechselwirkungen mit einer stationären Phase auftreten können. In der Praxis treten allerdings Verzerrungen der Substanzzonen durch unterschiedliche Dichten des Elektrolyts und durch Konvektionsströmungen beim Abtransport der Jouleschen Wärme auf. Bei der klassischen Elektrophorese, eingeführt von Tiselius<sup>[5]</sup>, verwendet man Gele oder Papierstreifen, die mit Elektrolytlösungen imprägniert sind, um die

Störungen durch Konvektion zu mindern, aber auch, um für Makromoleküle mit geringen Ladungsunterschieden den Reibungswiderstand und damit den Trenneffekt zu erhöhen. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese(PAGE) ermöglicht die effiziente Trennung von DNA-Molekülen und von Proteinen. Durch Änderung des Vernetzungsgrades der Gele kann die Trennleistung optimiert werden. Werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) denaturiert, so lassen sich mit der Gelelektrophorese direkt die Molekulargewichte bestimmen. Der Trenneffekt beruht hier ausschließlich auf der gehinderten Migration der Proben durch das Gel (ohne Gel würden alle mit SDS denaturierten Proteine nahezu gleich schnell wandern).

Die klassische Gel- oder Paperelektrophorese hat aber zwei entscheidende Nachteile: Erstens ist eine quantitative Analyse nur mit Reflexionsmessungen möglich, bei Proteinen erst nach ihrer Anfärbung und daher stark fehlerbehaftet. Zweitens darf das Spannungsgefälle über dem Gelbett nicht zu hoch sein, da die Wärmeentwicklung quadratisch mit der Spannung anwächst, so daß eine effektive Kühlung notwendig ist, um das Austrocknen des Gels zu vermeiden. Die Analysenzeit kann daher für eine 10 cm



Heinz Engelhardt



Wolfgang Beck



Jörg Kohr



Thomas Schmitt

**Heinz Engelhardt**, 1936 in Nürnberg geboren, studierte an der Universität Erlangen-Nürnberg, wo er 1965 in Organischer Chemie promovierte. 1969–1970 war er Postdoktorand an der Northeastern University in Boston. 1971 erhielt er die *Venia legendi* für das Fach Organisch-analytische Chemie. Noch im selben Jahr folgte er einem Ruf an die Universität des Saarlandes, wo er bis heute am Lehrstuhl für angewandte physikalische Chemie tätig ist. Er veröffentlichte mehr als 130 Arbeiten auf dem Gebiet der Chromatographie und ist Autor des Buches „Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie“, das ins Englische, Russische und Chinesische übersetzt wurde. Er ist Herausgeber einiger Zeitschriften sowie Vorsitzender des Arbeitskreises Chromatographie der GDCh und Mitglied des Vorstandes der Fachgruppe Analytische Chemie. 1992 erhielt er den Dal Nogare Award, 1993 den Martin Award der Chromatographic Society of Great Britain.

**Wolfgang Beck**, 1964 in Fürth/Bayern geboren, studierte von 1985 bis 1990 an der Universität des Saarlandes Chemie. In der Diplomarbeit synthetisierte und charakterisierte er stationäre Phasen zur HPLC-Trennung von chiralen Verbindungen. Seit 1990 promoviert er bei H. Engelhardt auf dem Gebiet der Kapillarelektrophorese. Dabei beschäftigt er sich mit der Verbesserung von Detektionsverfahren wie der UV-Detektion, der Diodenarray-Detektion und der indirekten UV-Detektion.

**Jörg Kohr**, geboren 1963 in Saarlouis/Saarland, studierte Chemie an der Universität Saarbrücken (Diplom 1989) und promovierte 1992 bei H. Engelhardt über den Einsatz polymerbelegter Quarzkapillaren in der Kapillarelektrophorese.

**Thomas Schmitt**, 1964 in Quierschied/Saar geboren, studierte von 1985 bis 1991 an der Universität des Saarlandes Chemie. In der Diplomarbeit beschäftigte er sich mit der Trennung von DNA-Restriktionsfragmenten mit der Kapillar-Gelelektrophorese. Seit 1991 arbeitet er weiter bei H. Engelhardt an seiner Dissertation, die Temperatureffekte und Trennungen chiraler Moleküle in der Kapillarelektrophorese umfaßt.

lange Gelstrecke einige Stunden betragen. Vorteile sind gegenüber den modernen automatisierten Trennverfahren, daß gleichzeitig mehrere Trennungen in einem Gel auf getrennten Bahnen durchgeführt werden können. Dadurch wird der Probendurchsatz stark erhöht. Darüber hinaus ist bei der Flachbettmethode ohne Schwierigkeiten zweidimensionales (2D) Arbeiten unter Ausnutzung unterschiedlicher Trennmechanismen möglich. Die ausgezeichnete Trennleistung der 2D-Gelelektrophorese in der Proteinanalytik soll hierbei nur exemplarisch erwähnt werden.

## 2. Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Mehrere Versuche wurden unternommen, beim Einsatz von offenen Röhren Konvektionsströmungen in freien Elektrolyten zu vermindern, z.B. die Rotation des Rohres um seine Achse<sup>[6]</sup>. Erfolgreich war jedoch der Einsatz dünner Kapillaren aus Glas<sup>[6], [7]</sup> und Teflon<sup>[8]</sup> mit Innendurchmessern von 200 bis 500 µm. Quarzkapillaren<sup>[9] – [12]</sup> mit Innendurchmessern von 50 bis 200 µm ermöglichen hocheffiziente Trennungen von Proteinen und Dansyl-Aminosäuren. Wegen des relativ großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen konnte bei den Kapillaren der störende Einfluß der thermisch induzierten Konvektion stark vermindert werden. Quarzkapillaren aus der GC bieten die Möglichkeit, HPLC-Detektoren zum direkten Nachweis der getrennten Substanzen in der Kapillare zu verwenden. Aufgrund der Einfachheit der Apparatur stieg in der zweiten Hälfte der 80er Jahre das Interesse an dieser vielfach auch als Kapillarzonenelektrophorese (CZE) bezeichneten Methode deutlich an. Da bei fast allen Trennverfahren die zu analysierenden Substanzen als diskrete Zone am Anfang der Trennstrecke aufgegeben werden und die Probenbestandteile als Zonen wandern, wird hier in diesem simplen Fall vereinfacht von CE gesprochen.

Der prinzipiell einfache Aufbau einer CE-Apparatur ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Die dünne Quarzka-

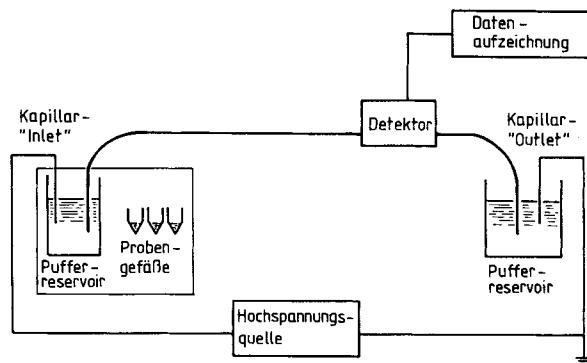


Abb. 1. Schematischer Aufbau eines CE-Systems.

pillare (25 – 100 µm Durchmesser) mit einer Länge von 20 bis 100 cm überbrückt die beiden Puffergefäße, zwischen denen eine Spannung von bis zu etwa 30 000 Volt angelegt wird. Ein relativ kurzer Probennpfropfen (einige nL!) wird am anodischen Ende der Kapillare aufgegeben. Dazu muß das Puffergefäß gegen ein Probengefäß ausgetauscht werden, d.h. das Kapillarenden taucht in die Probenlösung. Die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden der Probenaufgabe wer-

den dabei in Abschnitt 3 „Apparatur“ ausführlich diskutiert.

Die angelegte Spannung bewirkt die Migration der Probenzonen. Der elektrophoretischen Wanderung ist immer ein mehr oder minder starker elektroosmotischer Fluß (EOF) überlagert, der passiv zum Transport der Probenzonen, nicht aber zu ihrer Trennung beiträgt. Dieser EOF hängt stark vom pH-Wert des Puffers und von den Oberflächeneigenschaften der Kapillare ab. Er kann so groß sein, daß nicht nur neutrale Moleküle bewegt werden, sondern selbst negativ geladene Ionen entgegen ihrer elektrophoretischen Migration zum Detektor transportiert werden können. Nachdem in den meisten Puffern an der Oberfläche von Quarzkapillaren durch Dissoziation der Silanolgruppen negative Ladungen vorliegen, die positive Ladungen in der Nähe der Wand induzieren, geht der EOF in Richtung Kathode, weshalb der Detektor üblicherweise in der Nähe des Kathodenraums angebracht wird. Der EOF hilft, die Probenzonen zum Detektor zu transportieren, so daß bei genügend hohem EOF auch Anionen zur Kathode transportiert werden. Das Ergebnis einer Trennung von Kationen, Anionen und neutralen Verbindungen mit CE ist in Abbildung 2 gezeigt. Unter diesen Bedingungen wandern alle ungeladenen Moleküle mit der gleichen Geschwindigkeit, der des EOF, und können nicht voneinander getrennt werden, während die Trennung der Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität möglich ist.

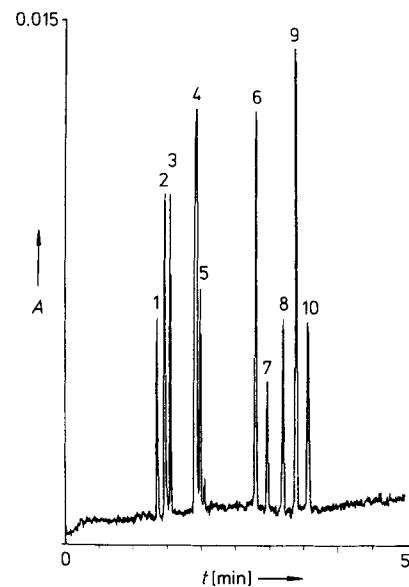


Abb. 2. Demonstrationstrennung von positiv und negativ geladenen Ionen sowie von neutralen Verbindungen mit der Kapillarelektrophorese. Trennbedingungen: Kapillare:  $L$  (Länge der Kapillare) = 30/37 cm,  $ID$  (innerer Durchmesser) = 75 µm; Puffer: 33 mM Borat, pH = 9.5; Feld:  $E$  = 350 Vcm<sup>-1</sup>; UV-Detektion bei 214 nm. Probe: 1 = Trimethylphenylammoniumbromid, 2 = Histamin, 3 = 4-Aminopyridin, 4 = Benzylalkohol, 5 = Phenol, 6 = Syringaldehyd, 7 = 2-(*p*-Hydroxyphenyl)essigsäure, 8 = Benzoesäure, 9 = Vanillinsäure, 10 = *p*-Hydroxybenzoësäure.

Über diese einfachste Form der CZE hinaus, bei der die Trennung nur nach Mobilitätsdifferenzen erfolgt und die zur Zeit das verbreitetste Verfahren ist, wird eine Vielzahl von Varianten eingesetzt: Als erste wäre die Kapillargelelektrophorese (CGE) mit gel gefüllten Kapillaren zu nennen. Die elektrophoretische Migration von Makromolekülen wird

dabei durch eine Gelmatrix beeinflußt und so eine Auf trennung nach Molekülgrößen erreicht. Ungeladene Moleküle können in offenen Röhren mit micellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEC) getrennt werden. Dabei werden dem Puffer Detergentien zugesetzt, und die neutralen Moleküle verteilen sich entsprechend ihrer Hydrophobie zwischen dem Puffer und den Micellen, so daß es sich in diesem Fall um ein chromatographisches Verfahren handelt. Die Trennung beruht schließlich auf der Mobilität der meist negativ geladenen Micellen. Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wird die Trennung in einem pH-Gradienten erreicht, der sich durch Zusatz von Ampholyten zum Puffer im elektrischen Feld bildet. Von geringerer Bedeutung ist bisher die Elektrochromatographie (EC), bei der stationäre Phasen der HPLC verwendet werden und der Transport der Proben lediglich auf dem EOF basiert. Als älteste Kapillar trenntechnik sei schließlich die Isotachophorese (ITP) erwähnt, die neuerdings zur Probenkonzentrierung in der CZE wieder an Bedeutung gewinnt.

## 2.1. Elektrophoretische Wanderung

Zunehmende Spannung  $U$  und damit wachsende Feldstärke  $E$  führt stets zu einer Erhöhung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  der Ionen und damit höherer Analysengeschwindigkeit. Die angelegte Spannung fällt über die gesamte Kapillarlänge  $L_{\text{ges}}$  ab. Die Wanderungsgeschwindigkeit und damit die Mobilität bestimmt man aber aus der Aufenthaltszeit  $t$  der Probe in der Kapillare zwischen Probenaufgabe (meistens anodisches Kapillarenden) und dem Detektor, der effektiven Länge  $L_{\text{eff}}$ . Bei käuflichen Geräten kann der Abstand zwischen Detektor und Kapillarenden (üblicherweise Kathode) zwischen 5 und 20 cm betragen. Bei Bestimmung der Mobilität  $\mu$  der Ionen ist dies zu berücksichtigen. Den Zusammenhang beschreibt Gleichung (1). Das einzelne Ion unterliegt einer Beschleunigungskraft  $K_B$  [Gl. (2)], wobei  $F$  die Faraday-Konstante

$$\mu = \frac{u}{E} = \frac{L_{\text{eff}}}{Et} = \frac{L_{\text{eff}} L_{\text{ges}}}{U t} \quad (1)$$

$$K_B = zFE \quad (2)$$

(96 500 C mol<sup>-1</sup>) und  $z$  die effektive Ladung des Ions ist. Dieser Kraft stellt sich die Reibungskraft  $K_R$ , angenähert durch das Stokessche Gesetz [Gl. (3)], entgegen. Hierbei ist  $\eta$

$$K_R = 6\pi\eta r \quad (3)$$

die dynamische Viskosität [Pa s] und  $r$  der Stokessche Radius [cm]. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  ist demnach durch Gleichung (4) gegeben. Elektropho-

$$u = \frac{zFE}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

retische Trennungen sind nur dann möglich, wenn sich die Ionen in ihrer Mobilität unterscheiden. Die effektive Ladung ist dabei die Ladung des Ions abzüglich des Ladungsanteils der umgebenden, entgegengesetzt geladenen *starren* Doppelschicht<sup>[14]</sup>. Bei der Wanderung zieht das Ion diesen Teil der

Doppelschicht mit sich und wandert daher langsamer, als es seiner tatsächlichen Ladung entspricht. Man nennt dies den elektrophoretischen Effekt. Dieser ist am größten für dünne diffuse Doppelschichten um das Ion herum. Die charakteristische Doppelschicht lässt sich aus der Debye-Hückel-Theorie berechnen, und ihre Größe ist umgekehrt proportional zur Wurzel der Elektrolytkonzentration. Es lässt sich zeigen, daß die effektive Ionenladung und damit die Wanderungsgeschwindigkeit mit zunehmender Ionenstärke abnimmt.

Für große Teilchen mit einem Radius größer als die Doppelschicht ist die Mobilität bei Teilchen ähnlicher Zusammensetzung von der Größe unabhängig<sup>[14]</sup>, was die Trennung von großen Molekülen durch Elektrophorese erschwert, denn die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Molekülen oder von mit SDS denaturierten Proteinen ist in reinem Elektrolyt identisch. Trenneffekte erreicht man nur, wenn die Migration durch Siebeffekte (z.B. in Gelen) oder Ausschlußeffekte beeinflußt wird.

## 2.2. Elektroosmotischer Fluß

Während die Elektrophorese die Trennung von Teilchen unterschiedlicher Mobilität bewirkt, verursacht die Elektroosmose einen Fluß der Pufferlösung im elektrischen Feld. In den meisten Fällen ist in der CE die elektrophoretische Wanderung der Ionen vom EOF überlagert. Der EOF hängt von der Ladungsverteilung in der Nähe der Kapillaroberfläche ab. Nahezu alle Oberflächen tragen eine Ladung, im Falle von Quarzkapillaren negative Ladungen durch Dissoziation der Silanolgruppen. Diesen Oberflächenladungen entsprechen Gegenionen in der Flüssigkeit, was eine Doppelschicht ergibt (schematisch in Abb. 3 dargestellt). In dieser

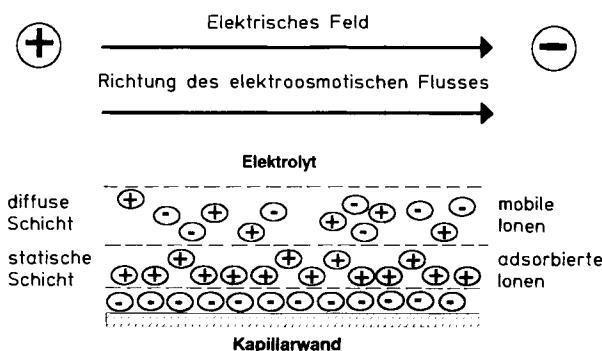


Abb. 3. Schematische Darstellung der Ladungsverteilung an der Kapillaroberfläche.

überwiegen in Quarzkapillaren die positiven Ionen, die sich in einer starren und einer beweglichen Schicht an der Oberfläche anordnen. Liegt parallel zur Oberfläche ein Feld an, so setzt das Feld die Gegenionen in der mobilen Schicht längs seiner Achse in Bewegung und zieht die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. Im Falle von Quarzkapillaren wird der EOF daher zur Kathode hin induziert. Es bildet sich ein extrem flaches (stempelförmiges) Strömungsprofil aus. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Bandenverbreiterung als bei hydrodynamischen Flüssen, wo das stark vom Kapillarradius und der Strömungsgeschwindigkeit ab-

hängige parabolische Hagen-Poiseuille-Strömungsprofil auftritt. In mit Glaskugeln oder Kieselgelteilchen gepackten Kapillaren sollte der EOF unabhängig vom Teilchendurchmesser des Packungsmaterials sein und die gleiche Richtung haben wie in der ungepackten Kapillare – der Verwendung sehr kleiner Teilchen (Teilchendurchmesser um 1 µm oder kleiner) oder langer Säulen in der Chromatographie stünde daher von der Theorie her nichts mehr im Wege. Aus diesem Grund gewinnt das Verfahren der Elektrochromatographie (EC) zunehmend an Interesse<sup>[15]</sup>, da es die Selektivität der HPLC mit der Trennschärfe der CE vereinen könnte. Durch Verwendung unporöser Teilchen kann dabei der Beitrag der Diffusion in den Poren zur Bandenverbreiterung ausgeschaltet werden.

Die Größe des EOF lässt sich vereinfacht mit der Helmholtz-Gleichung [Gl. (5)] beschreiben und ist umgekehrt pro-

$$\mu = \frac{\epsilon E \zeta}{4\pi\eta} \quad (5)$$

portional der Viskosität  $\eta$  des Elektrolyten, proportional seiner Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , der angelegten Feldstärke  $E$  und der Zahl der Ladungen an der Kapillarwand, also dem dadurch aufgebauten  $\zeta$ -Potential („Zeta-Potential“). Bei Quarzkapillaren sinkt der EOF mit der Konzentration des Elektrolyten und nach Zusatz organischer Komponenten, wächst jedoch mit dem Dissoziationsgrad der Oberflächensilanolgruppen, d. h. mit steigenden pH-Wert. Die pH-Abhängigkeit des EOF bei Quarzkapillaren und die entsprechende Reproduzierbarkeit der Mobilität ist in Abbildung 4 dargestellt. Die größten Veränderungen treten im mittleren

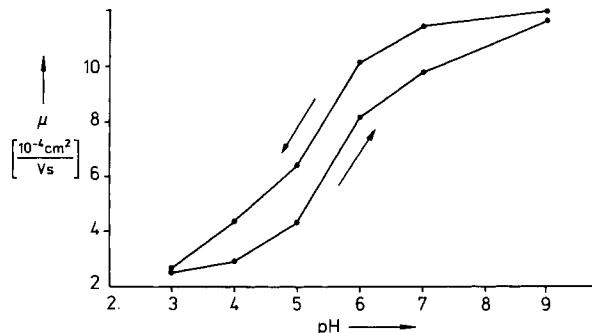


Abb. 4. pH-Abhängigkeit des elektroosmotischen Flusses  $\mu$ . Bedingungen: Kapillare:  $L = 40/47$  cm,  $ID = 75$  µm; Puffer: 10 mM Phosphat; Neutralmarker: Benzylalkohol; Feld:  $E = 425$  Vcm<sup>-1</sup>.

pH-Bereich auf, in der Nähe des pK-Wertes von Kieselsäure. Durch Verlängerung der Konditionierungszeiten nach Veränderung des pH-Wertes der Puffer können die Abweichungen jedoch vermindert werden; die Hystereserscheinungen verringern sich. Für reproduzierbares Arbeiten in unbehandelten Kapillaren ist es daher erforderlich, bei Pufferwechsel die Spül- und Konditionierungszeiten der Kapillare zu standardisieren, womit auch Hystereserscheinungen des EOF reduziert werden können<sup>[16]</sup>.

Der EOF tritt bei allen elektrophoretischen Trennmethoden auf, da Oberflächenladungen nie vollkommen ausgeschaltet werden können. Er kann einerseits zu einer konvektiven Vermischung der elektrophoretischen Zonen führen,

spielt aber auch andererseits beim Transport der Zonen durch die Kapillare eine entscheidende Rolle. Wegen des stets gegenwärtigen EOF ist üblicherweise in der CE der Detektor kathodenseitig angeordnet. Wenn die Geschwindigkeit der elektrophoretischen Wanderung der Anionen niedriger ist als der EOF, so werden diese zur Kathode transportiert. Der EOF ermöglicht somit die Trennung von Kationen und Anionen in einer Analyse. Bei anderen CE-Methoden (z.B. der MEC) wird ausschließlich der EOF zum Transport der (teilweise ungeladenen) Proben zum Detektor ausgenutzt. Durch chemische Modifikation der Kapillaroberfläche kann der EOF kontrolliert, ausgeschaltet, ja sogar umgekehrt werden. Die Größe des EOF ist die einzige Möglichkeit, Veränderungen an der Kapillaroberfläche, z.B. durch irreversible Adsorption von Probenbestandteilen, zu bestimmen. Alle anderen Methoden zur Oberflächencharakterisierung versagen wegen der sehr geringen Oberfläche (<10 cm<sup>2</sup>). Oberflächenmodifizierte Kapillaren zeigen kaum Hystereserscheinungen bei Pufferwechsel und sind wegen verminderter Adsorption sehr gut geeignet für die Analyse von Proteinen (siehe Abschnitt 4.2.2. „Chemisch modifizierte Kapillaren“).

Durch Zusatz langkettiger kationischer Detergentien wie Cetyltrimethylammoniumsalze, die an den Silanolgruppen der Oberfläche adsorbiert werden können, lässt sich der EOF sogar umkehren<sup>[17]</sup>. Dabei bildet sich eine Detergens-Doppelschicht mit in Richtung des Elektrolyten gerichteten positiven Ladungen aus. Mit derartig belegten Kapillaren gelingt die Trennung auch schnell wandernder anorganischer Ionen<sup>[18]</sup>.

### 2.3. Bandenverbreiterung

Der Hauptbeitrag zur Bandenverbreiterung in der Kapillarchromatographie röhrt von der Hagen-Poiseuille-Strömung her. Dieser Beitrag wächst mit dem Quadrat des Durchmessers der Kapillare und ist umgekehrt proportional dem Diffusionskoeffizienten der Probe im Elektrolyten (Aris-Taylor-Gleichung und Massentransport-Term der Golay-Gleichung<sup>[19]</sup>). Bedingt durch die geringe radiale Diffusion wird bei Flüssigkeiten das Strömungsprofil nicht ausgeglichen. Aus diesem Grunde ist Kapillarflüssigkeitschromatographie mit praktikablen Kapillardurchmessern (> 50 µm) nicht möglich. In Gasen dagegen sind die Diffusionskoeffizienten um den Faktor 10<sup>4</sup> größer, und das parabolische Strömungsprofil wird schnell durch radiale Diffusion nivelliert. Die Kapillargaschromatographie ist daher ein hocheffizientes Trennverfahren. Nachdem in der CE, bedingt durch den EOF, ein stempelförmiges Strömungsprofil auftritt, ist der Beitrag des Strömungsprofils zur Bandenverbreiterung zu vernachlässigen, so daß ausschließlich der Term der Longitudinaldiffusion zu berücksichtigen ist. Die Bandenverbreiterung  $H$  berechnet sich nach Gleichung (6),

$$H = \frac{2D}{u} = \frac{2D}{\mu E} \quad (6)$$

wobei  $D$  der Diffusionskoeffizient der Probe im Elektrolyten ist. Mit der Beziehung  $H = L/N$  lässt sich die Bodenzahl  $N$  nach Gleichung (7) berechnen. Es sei darauf hingewiesen,

$$N = \frac{\mu U}{2D} \quad (7)$$

daß sich die Gesamtmobilität des Ions aus seiner elektrophoretischen ( $\mu_{ep}$ ) und elektroosmotischen Beweglichkeit ( $\mu_{eo}$ ) zusammensetzt. Die Bodenzahl wächst mit zunehmender Spannung und abnehmenden Diffusionskoeffizienten der Proben (im Gegensatz zur HPLC, wo die Bodenzahl mit abnehmenden Diffusionskoeffizienten stark abnimmt). Giddings<sup>[14]</sup> zeigte, daß bei Raumtemperatur und über einen weiten Bereich sich diese Beziehung reduzieren läßt zu Gleichung (8). Mit Spannungen zwischen 100 und 50 000 Volt

$$N = 20 z U \quad (8)$$

sowie effektiven Ladungen  $z$  zwischen 1 und 10 lassen sich bis zu 10 Millionen theoretischen Böden pro Meter erzielen. Dieser Betrag zeigt, daß die CE der HPLC in dieser Hinsicht überlegen ist. Zur Beschreibung der Bandenverbreiterung in der CE wurden die bekannten Größen der Chromatographie adaptiert und sind als solche zur Beschreibung von Transportphänomenen in der Kapillare auch ohne weiteres zu gebrauchen. Es sei jedoch bemerkt, daß in der Chromatographie die Proben stets mit der gleichen Geschwindigkeit durch den Detektor transportiert werden – nach Elution von der Säule und entsprechender Verdünnung. In der CE – mit On-column-Detektion – ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proben am Detektorfenster jedoch unterschiedlich. Ein Vergleich der Bodenzahlen ist daher nur bedingt möglich.

Die vorhergesagten hohen Bodenzahlen  $N$  wurden in gefüllten Kapillaren für DNA-Moleküle auch gemessen<sup>[20]</sup>. Nun sind DNA-Moleküle hierbei ein Sonderfall, da sie durch die Vielzahl negativer Ladungen nicht mit der Kapillaroberfläche in Wechselwirkung treten. Mit Proteinen hat man derartige Bodenzahlen bisher noch nicht erreicht, obwohl mit belegten Kapillaren bis zu 500 000 Böden pro Meter erzielt werden können. Geringfügige Adsorption an der Oberfläche führt zu lokaler Veränderung des EOF und damit zu Verzerrungen des Pfropfenprofils. Darauf hinaus trägt jegliche Adsorption zu einer Verzögerung des Massentransportes bei. Der Massentransport-Term der Golay-Gleichung ist dann nicht mehr zu vernachlässigen, und die Bandenverbreiterung nimmt zu.

Mit steigender Spannung wächst die Mobilität und der EOF, die Analysenzeit läßt sich verkürzen. Bedingt durch den kürzeren Aufenthalt der Probe in der Säule sinkt die Bandenverbreiterung, die Bodenzahl steigt. Mit steigender Spannung wächst jedoch auch die Joule-Aufheizung des Elektrolyten. Die Wärme wird ausschließlich über der Kapillarwand abtransportiert, so daß ein radialer Temperatur- und damit Viskositätsgradient senkrecht zur elektrophoretischen Wanderung entsteht<sup>[21, 22]</sup>. Kühlung der Kapillare verstärkt den Temperaturgradienten, ist aber notwendig, um Entgasung und lokale Überhitzung zu vermeiden. Viskositätsunterschiede zwischen Kapillarmitte und Wand führen zu Migrationsunterschieden und damit zu Bandenverbreiterung und schlechterer Auflösung.

Der störende Einfluß dieses radialen Temperaturgradienten kann nur durch Reduzierung des Kapillarinndurchmessers verhindert werden. Die Temperaturdifferenz zwischen Kapillarmitte und Wand wächst in einem zylindrischen Rohr mit dem Quadrat des Kapillardurchmessers.

Dies ist der Grund, warum in der CE sehr dünne Kapillaren (Durchmesser 25 bis 100 µm) verwendet werden. Mit abnehmendem Durchmesser nimmt aber die optische Dichte der Schichten und damit die Nachweisempfindlichkeit ab (Lambert-Beersches-Gesetz). Eine andere Möglichkeit zur Verminde rung der Jouleschen Wärme besteht in der Herabsetzung der Pufferkonzentration und/oder der Verwendung von Puffern mit geringerer Ionenleitfähigkeit.

Der Verminderung der Leitfähigkeit des Puffers sind aber Grenzen gezogen. Bestehen große Unterschiede zwischen der Leitfähigkeit im Puffer und in den Probenzonen, so führen die lokalen Störungen des elektrischen Feldes zur Verzerrung der Zonen und damit wiederum zur Verminderung der Trennleistung. Ist die Leitfähigkeit innerhalb der Probenzone größer als im Trägerelektrolyten, so führt der verminderte Widerstand zu einer reduzierten Feldstärke. Dadurch wandern am Konzentrationsmaximum die Probenmoleküle langsamer als an den Flanken. Dies führt zu einer starken Verzerrung der Zonen mit langsamem Anstieg und schnellem Abfall (Leading). Im umgekehrten Falle entstehen Peaks mit starkem Tailing. Nur wenn die Leitfähigkeiten in der Probzone und dem Puffer identisch sind, erhält man symmetrische Peaks. Die Pufferkonzentration ist daher dem jeweiligen Trennproblem (Dissoziation und Mobilität der Proben) anzupassen. Außerdem kann es durch Mobilitätsdifferenzen zwischen Proben-Ion und Puffer-Ion zu isotachophoretischen Effekten kommen. Dies führt meist zu dreieckigen Peakformen, welche häufig Probleme bei der Integration bereiten.

Die Pufferkonzentration kann jedoch nur in engen Grenzen variiert werden. Mit der Erhöhung der Pufferkonzentration steigt die Joulesche Wärme, was wiederum durch Herabsetzung der Spannung kompensiert werden kann. Allerdings erhöht sich dadurch die Analysenzeit und damit die Aufenthaltszeit der Probe in der Trennkapillare. Dies führt zu größerer Bandenverbreiterung durch Zunahme der Longitudinaldiffusion. Bei der Optimierung der Trennleistung in der CE muß man den Einfluß der Jouleschen Wärme, die Unterschiede der Leitfähigkeiten zwischen Probenzonen und Elektrolyten sowie die erreichbare Nachweisempfindlichkeit berücksichtigen, um kurze Analysenzeiten bei hoher Auflösung zu erzielen.

### 3. Apparatur

Seit 1988 gibt es käufliche CE-Apparaturen; die Zahl der Anbieter ist steigend. Die einzelnen Geräte zeigen kaum prinzipielle Unterschiede, da das eigentliche Trennsystem sehr einfach ist. Graduelle Unterschiede bestehen bei der Probenaufgabe und der Zahl und Art der angebotenen Detektoren. Hier soll keine Marktübersicht gegeben werden – der Schwerpunkt soll vielmehr bei den typischen Anforderungen liegen, die an die verschiedenen Bauteile der Apparatur gestellt werden.

#### 3.1. Spannungsquelle

Die Spannung sollte sich im Bereich von – 30 bis + 30 kV einstellen lassen und es sollte möglich sein, diese beim vorgegebenen Wert konstant zu halten. Darüber hinaus hat es sich

als vorteilhaft erwiesen, wenn Spannung oder Strom unabhängig voneinander konstant gehalten werden können. Eine Aufzeichnung von Spannungs- oder vorteilhafter Stromkurven gibt Hinweise auf eventuelle Störungen während der Analyse und kann bei der Fehlersuche behilflich sein. Bei käuflichen Geräten schaltet sich beim Öffnen des Analysenraums automatisch die Hochspannungsquelle ab, so daß Unfälle mit Hochspannung vermieden werden. Bei Eigenbaugeräten sind entsprechende Vorkehrungen unerlässlich.

### 3.2. Probenaufgabe

Die reproduzierbare Probenaufgabe ist das schwierigste Problem in der CE, soll die Probenzone doch so klein gehalten werden, daß sie zur Bandenverbreiterung nicht beiträgt. Um dies zu erreichen, müssen sehr kleine Probenvolumina im Bereich von 5 bis 50 nL injiziert werden<sup>[23–25]</sup>. Zu große Probenvolumina führen sehr schnell zu Peakverzerrung und schlechterer Auflösung<sup>[26, 27]</sup>. Um diesen hohen Anforderungen gerecht zu werden und um diese kleinen Volumina besser handhaben zu können, sind Miniaturisierung<sup>[28, 30]</sup> und Automatisierung der Probenaufgabe unerlässlich<sup>[29–31]</sup>. Die reproduzierbare Aufgabe der kleinen Probenvolumina ist für die Quantifizierung und die Bestimmung der Standardabweichung bei der Analyse ein zentraler Gesichtspunkt. Die wichtigsten Injektionsarten, die in den automatisierten käuflichen Geräten Anwendung finden, sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

#### 3.2.1. Elektrokinetische Injektion

Bei diesem Injektionsverfahren wird das Probengefäß, in das die Kapillare eintaucht, mit der Spannungsquelle verbunden, und durch Anlegen eines kurzen Spannungsintervalls wandern die Probenbestandteile in die Trennkapillare. Die aufgegebene Probenmenge  $Q$  (in mol) ist bei diesem Injektionsverfahren von der Höhe der angelegten Spannung  $U_i$ , der Zeit  $t_i$ , in der die Spannung anliegt, und der Mobilität der Probenkomponenten abhängig [Gl. (9)]<sup>[30]</sup>, wobei  $c$  die

$$Q = \frac{(\mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}})\pi r^2 U_i t_i c}{8\eta L} \quad (9)$$

Konzentration der Probe in der Probenlösung ist. Aus diesem Zusammenhang ist das Problem dieser Injektions-

Tabelle 1. Gegenüberstellung von Injektionsarten für die Kapillarelektrophorese.

	Elektrokinetische Injektion	Hydrostatische Injektion	Hydrodynamische Injektion	Injektion durch Probensplitter
Injection durch	elektrisches Feld	Siphoneffekt	Druck oder Vakuum	elektrische Probensplitter oder Split-Fluß-Systeme
Automatisierung	ja	ja	ja	nein
Mindest-probenmenge	<10 µL (Mehrfachinjektion)	<10 µL (Mehrfachinjektion)	≈ 10 µL (Mehrfachinjektion)	>10 µL mit Dosierkapillare oder HPLC-Spritze (keine Mehrfachinjektion)
Diskriminierungs-effekte bei der Probenaufgabe	ja	nein	nein	ja (für elektrischen Splitter) nein (für Split-Fluß-Systeme)
RSD-Werte	4.1% (aus Lit. [30])	<2.9% (aus Lit. [30, 33])	2–3% (Erfahrungswert)	<3% (Idealfall für elektr. Splitter) (aus Lit. [34]) ≈ 2% (für Split-Fluß-System) (aus Lit. [35])

methode, die Diskriminierung der Probenkomponenten unterschiedlicher Mobilität, ersichtlich. Auch der elektrische Widerstand der Probenlösung (Ionenstärke) im Vergleich zur Elektrolytlösung beeinflußt die Reproduzierbarkeit des Verfahrens<sup>[32]</sup>.

Für die automatisierte elektrokinetische Probenaufgabe wurde eine relative Standardabweichung (RSD) für die Peakflächenauswertung von 4.1% festgestellt<sup>[30]</sup>. Generell kann die Reproduzierbarkeit der quantitativen Analyse wie bei allen Verfahren mit Problemen bei der Probenaufgabe, z.B. der Kapillargaschromatographie, durch Verwendung eines internen Standards wesentlich verbessert werden.

#### 3.2.2. Hydrostatische Injektion

Bei dieser Methode wird eine Höhendifferenz zwischen dem Puffergefäß und dem Probengefäß zum Einführen kleiner Probenvolumina ausgenutzt. Durch den Siphoneffekt wird die Probenlösung in die Trennkapillare gesaugt. Die aufgegebene Probenmenge ist abhängig von der Höhendifferenz (d.h. üblicherweise 5–10 cm), der Zeit und den hydrodynamischen Eigenschaften (Viskosität  $\eta$ , Dichte  $\rho$ ) der Elektrolytlösung. Dichte- und Viskositätsunterschiede zwischen Proben- und Elektrolytlösung sind daher zu vernachlässigen. Die aufgegebene Probenmenge berechnet sich nach Gleichung (10); sie ist demnach nur von der Höhendifferenz

$$Q = \frac{\rho g \pi r^4 \Delta h t_i c}{8\eta L} \quad (10)$$

und der Injektionszeit abhängig. Sinnvoll sind Injektionszeiten von einigen Sekunden. Die Höhendifferenz ist entsprechend anzupassen. Auch hier liefert die manuelle Injektion schlechtere Reproduzierbarkeiten bei der Quantifizierung (RSD 10%), während bei automatischer und computerunterstützter Durchführung RSDs von 2.9%<sup>[30]</sup> und besser<sup>[33]</sup> erzielt wurden.

#### 3.2.3. Druckinjektion

Die Probe wird hier durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß und Kapillarenden aufgegeben, wobei entweder beim Probengefäß der Druck erhöht oder am Kapillarenden der Druck verringert wird. Diese beiden Möglichkeiten erlauben auch ein einfaches Spülen der Kapillare mit

frischen Pufferlösungen. Die aufgegebene Probenmenge berechnet sich nach Gleichung (11) und ist nur von der Druck-

$$Q = \frac{\Delta p \pi r^4 l_i c}{8 \eta L} \quad (11)$$

differenz und der Injektionszeit abhängig. Bei Injektionszeiten im Sekundenbereich liegt die Druckdifferenz bei einigen Torr. In käuflichen Geräten ist dies das verbreiteste Injektionsverfahren. Die RSD liegt hier nach unseren Erfahrungen zwischen 2 und 3%; bei Verwendung eines internen Standards kann sie auf Werte unter 1% gedrückt werden.

### 3.2.4. Probensplitter

In Analogie zur Kapillargaschromatographie wurden bei der CE auch Splitsysteme zur Probenaufgabe beschrieben. Man kann zwischen elektrischen und hydrodynamischen Splitsystemen unterscheiden.

Beim elektrischen Probensplitter (Abb. 5) befindet sich in der Mitte der Dosierkapillare die Abzweigung zur Trennkapillare. Über beiden Kapillaren liegen unterschiedliche Feld-

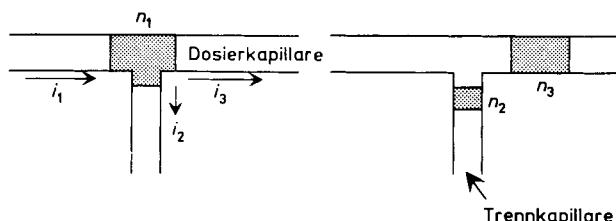


Abb. 5. Schematische Darstellung des elektrischen Probensplitters.  $i_1$ ,  $i_2$  und  $i_3$  entsprechen den Strömen in den jeweiligen Kapillarteilstücken;  $n_1$  entspricht der Probenmenge vor der Probenteilung,  $n_2$  der aufgegebenen und  $n_3$  der Restprobenmenge. Links: während des Probensplits. Rechts: nach dem Probensplit.

stärken an. Die Probe bewegt sich also in zwei verschiedenen Stromkreisen, wobei das Splitverhältnis durch das Verhältnis der beiden Ströme in den Kapillaren gegeben ist. Die Genauigkeit dieser Methode wurde mit einer RSD < 3% angegeben<sup>[34]</sup>. Beim Split-Fluß-System wird mit einer HPLC-Spritze das Probenvolumen in ein T-Stück dosiert. Das Splitverhältnis ist durch die Verhältnisse von Durchmesser und Länge der Trennkapillare und Überlaufkapillare festgelegt<sup>[35]</sup>. Für dieses Verfahren wurde eine RSD von ca. 2% erwähnt, allerdings sind relativ große Probenvolumina notwendig. Andere Splitsysteme, teilweise mit HPLC-Pumpen<sup>[36]</sup>, sind ebenfalls bekannt, bessere Reproduzierbarkeiten konnten aber auch hiermit nicht erreicht werden.

### 3.2.5. Reproduzierbarkeit der Probenaufgabe

Die Reproduzierbarkeit der Probenaufgabe wird durch viele Faktoren beeinflußt: Leitfähigkeitsdifferenzen zwischen Trennelektrolyt und Probenlösung<sup>[37]</sup>, große Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Probenbestandteile<sup>[33]</sup> und deren elektrophoretischer Mobilität<sup>[38]</sup> sowie Unterschiede in der Probenmatrix<sup>[32]</sup>. Dagegen liegen die Vorteile der CE dort, wo insgesamt nur sehr geringe Proben-

volumina zur Verfügung stehen, z.B. bei der Ionenanalytik in Regentropfen<sup>[39]</sup>.

Die Miniaturisierung der Probenaufgabe bei käuflichen Geräten ist mittlerweile so weit fortgeschritten, daß mit insgesamt 3 µL Probenvolumen in automatisierten Geräten mehrere Injektionen durchgeführt werden können.

Die Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Probenaufgabe bei der CE sind auf die benötigten geringen Druckdifferenzen und kurzen Injektionszeiten zurückzuführen. Größere injizierte Volumina vermindern sehr schnell die Effizienz der Trennung. Man versucht daher, größere Volumina aufzugeben und die Zonen vor der Trennung zu schärfen. Dies gelingt durch Ausnutzung von ITP-Effekten vor der eigentlichen CE-Trennung und wird in Abschnitt 4.6 behandelt. Konzentrieren lassen sich Proben auch durch kurzzeitige Erhöhung der Feldstärke. Am einfachsten gelingt dies, wenn man vor der eigentlichen Probenaufgabe einen Wasserpfropfen in die Kapillare injiziert („sample stacking“)<sup>[40]</sup>. Der Spannungsabfall ist über dem „Nichtleiter“ Wasser so hoch, daß die nachfolgende Probenzone im dort vorliegenden wesentlich höheren Feld konzentriert wird. Anreicherungsfaktoren bis 100 wurden erzielt.

## 3.3. Thermostatisierung

Hauptsächlich dient die Thermostatisierung zur Abführung der Jouleschen Wärme. Luft- wie auch Flüssigthermostate finden in käuflichen Geräten Verwendung, wobei die Temperaturen von 15 bis etwa 60 °C variiert werden können. Für die meisten Anwendungszwecke reicht jedoch der Abtransport der Wärme durch starke Luftkühlung<sup>[41]</sup>. Welchen Einfluß die Temperatur auf Effizienz und Selektivität hat, wird zur Zeit noch diskutiert. Mit ein Grund für diesen lückenhaften Kenntnisstand ist, daß bei käuflichen Geräten nur die Kapillare (oder Teile davon) thermostatisiert wird, während die Puffergefäße nicht immer auf der gleichen Temperatur wie die Kapillare gehalten werden. Im Falle der Trennung von DNA-Bruchstücken in gel gefüllten Kapillaren wurde jedoch gezeigt, daß mit Erhöhung der Temperatur sich zwar die Trennleistung vermindert, aber die relativen Migrationen, d.h. die Selektivität der Trennungen, verbessert werden können<sup>[42]</sup>.

## 3.4. Kapillaren

In der CE werden üblicherweise außen mit Polyimidbeschichtete Quarzkapillaren mit 25 bis 100 µm Durchmesser verwendet. Prinzipiell können auch Glas- oder Kunststoffkapillaren verwendet werden, diese weisen aber im kurzweligen UV-Bereich keine ausreichende Durchlässigkeit auf. Die Polyimidschicht der Quarzkapillaren muß vor der Beschichtung der inneren Oberfläche oder Verwendung an der Stelle, wo detektiert werden soll, mechanisch oder durch Abbrennen<sup>[13]</sup> entfernt werden. Neuerdings sind auch Kapillaren mit UV-durchlässiger Beschichtung erhältlich. Für die meisten Anwendungen werden unbehandelte und unmodifizierte Kapillaren eingesetzt. Die Quarzkapillaren der verschiedenen Hersteller unterscheiden sich hinsichtlich der Genauigkeit und Konstanz des Innendurchmessers sowie der Behandlung der inneren Oberfläche und der optischen

Durchlässigkeit im unteren Wellenlängenbereich. Grundsätzlich sollten neue Kapillaren vor ihrer ersten Verwendung zur vollständigen Hydroxylierung der Oberfläche mit 1 M NaOH behandelt werden.

Oberflächen von Kapillaren lassen sich mit den gleichen Methoden modifizieren wie die von Kieselgelen zur Herstellung stationärer Phasen für die HPLC oder zur Beschichtung von Kapillarsäulen für die GC. Wie bereits ausgeführt, steht zur Charakterisierung modifizierter Kapillaroberflächen hauptsächlich die Änderung des EOF zur Verfügung. Die Charakterisierung mit gaschromatographischen Verfahren wurde ebenfalls beschrieben<sup>[43]</sup>. Vor- und Nachteile von modifizierten und von gel gefüllten Kapillaren werden bei den einzelnen Trenntechniken diskutiert, für die sie auch eingesetzt werden.

### 3.5. Detektion

Die größte apparative Herausforderung der CE ist die Detektion. So stehen bei der On-column-Detektion durch Messung der UV-Absorption in den engen Kapillaren nur Schichten geringer Dicke zur Verfügung. Die am häufigsten verwendeten Detektoren sind trotzdem modifizierte UV-Detektoren aus der HPLC. Wegen der geringen Schichtdicke (= mittlerer Kapillarinnendurchmesser) werden hohe Anforderungen bezüglich Empfindlichkeit, Rauschen, Streulichteinfluß etc. an die Detektoren gestellt. Um Effizienzverluste durch Vermischungseffekte außerhalb der Kapillare zu vermeiden, wird direkt in der Kapillare detektiert. Typische Bandbreiten der Zone in der Kapillare liegen bei 5 mm ( $N = 500\,000$ ), was einem Volumen von 10 nL (50- $\mu\text{m}$ -Kapillare) entspricht. Diese extrem kleinen Volumina sind auch der Grund für die oftmals als erstaunlich propagierte Massenempfindlichkeit. Der Weltrekord liegt z.Zt. bei einer Nachweisgrenze von 300 Molekülen bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von drei zu eins<sup>[44]</sup> für derivatisierte Aminosäuren und Detektion durch laserinduzierte Fluoreszenz. Für den täglichen Gebrauch wichtiger ist jedoch die Konzentrationsempfindlichkeit. Diese ist, bedingt durch den kurzen Absorptionsweg (mittlerer Kapillardurchmesser!), eher bescheiden. Verglichen mit der HPLC ist die Konzentrationsempfindlichkeit bei der UV-Detektion in der CE 30- bis 100fach geringer<sup>[45]</sup>. Diese hängt bei querdurchstrahlten Kapillaren vom Detektorrauschen und der effektiven Schichtdicke ab, die geringer als die nominelle Schichtdicke (= Kapillardurchmesser) ist. Störend bemerkbar machen sich der Streulichtanteil durch mangelhafte Fokussierung (Licht durch Kapillarwand!) und eine nicht ideale zylindrische Kapillargeometrie<sup>[46]</sup>. Durch Optimierung des optischen Systems (Spalt, Linse, etc.) können diese Effekte größtenteils ausgeschaltet werden. Der am häufigsten verwendete Detektor ist der UV-Detektor mit fester oder variabler Wellenlänge. Trotz der geringen Schichtdicke ist die Aufnahme von UV-Spektren mit empfindlichen Diodenarray-Detektoren oder schnell registrierenden Detektoren ebenfalls möglich<sup>[47, 48]</sup> (siehe Abb. 14).

Proben ohne Absorption im UV-Bereich lassen sich mit käuflichen UV-Detektoren mit indirekter UV-Detektion empfindlich nachweisen<sup>[18, 49–53]</sup>. Man gibt dem Puffer einen Elektrolyten mit UV-Absorption zu, der eine ähnliche Mobilität wie die zu trennenden Proben hat. An der Stelle

der Probe muß wegen der erforderlichen Elektroneutralität die Menge des zugesetzten Elektrolyten geringer sein (Verdrängungsmechanismus), so daß hier der Puffer stärker durchlässig ist, was sich durch einen negativen Peak bemerkbar macht. Dies ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Anwendungsbeispiele sind in den Abschnitten 4.1.4 und 4.2.1 aufgeführt (vgl. Abb. 12 und 17). Die Nachweisempfindlichkeit der indirekten UV-Detektion hängt vom molaren Extinktionskoeffizienten des zugesetzten UV-absorbierenden Hintergrundeletrolyten ab und entspricht der normalen UV-Absorption<sup>[54]</sup>.

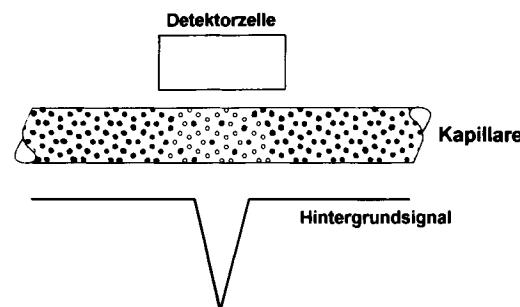


Abb. 6. Prinzip der indirekten UV-Detektion. ● = UV-absorbierende Puffer-Ionen; ○ = ionische Probenbestandteile ohne UV-Absorption.

Neben den UV-Detektoren aus der HPLC sind seit kurzem auch Fluoreszenzdetektoren auf dem Markt, die sich von den erstgenannten hauptsächlich in ihren Lichtquellen unterscheiden. Angeboten werden neben den gebräuchlichen Deuterium- und Xenon-Blitzlampen auch wesentlich aufwendigere Lasersysteme, wobei hier im sichtbaren Wellenlängenbereich angeregt wird, so daß die Proben entsprechend derivatisiert werden müssen. Indirekte Fluoreszenzdetektion ist ebenfalls möglich; dabei dürfte es sich um eine universelle Detektionsmethode handeln, vorausgesetzt, geeignete Fluorophore ohne Quencheffekte sind verfügbar<sup>[55–57]</sup>.

Leitfähigkeitsdetektoren und auch andere Detektoren auf elektrochemischer Basis bieten sich an, sind aber derzeit noch nicht käuflich zu erwerben. Als Glanzlicht sei der Spurenachweis von Alkali- und Erdalkalimetall-Ionen mit Mikroelektroden direkt in der Kapillare erwähnt<sup>[58]</sup>.

Bei der Leitfähigkeitsdetektion stellt sich das Problem, daß neben der Grundleitfähigkeit des Elektrolyten die geringfügig höhere Leitfähigkeit in der Substanzzone bestimmt wird. Suppressionstechniken zur Unterdrückung der Pufferleitfähigkeit wie in der HPLC sind hier nicht einsetzbar. Die Leitfähigkeitsdetektion wurde in der CE bereits mehrfach mit Erfolg eingesetzt<sup>[59–64]</sup>. Mit amperometrischer Detektion gelang der direkte Nachweis von Neurotransmittern in Nervenzellen, wobei 5  $\mu\text{m}$  weite Kapillaren zur Trennung verwendet wurden<sup>[65–68]</sup>.

Auch die Massenspektrometrie(MS)-CE-Kopplung erscheint bei Betrachtung der niedrigen Flußgeschwindigkeiten ( $100 \text{ nL min}^{-1}$ ) als unproblematisch. Das Hauptproblem bei der MS-CE-Kopplung besteht jedoch darin, zu vermeiden, daß beim Übergang der Kapillare in die Ionenquelle durch das dort herrschende Vakuum der Eluent aus der Kapillare gesaugt wird. Bei einem Druckabfall von 1 bar entsteht an einer 1 m langen Kapillare (50  $\mu\text{m}$  Innen-

durchmesser) eine lineare Strömungsgeschwindigkeit von  $1 \text{ cm s}^{-1}$ . Das dadurch entstehende laminare parabolische Strömungsprofil würde zu merklichem Effizienzverlust führen. Aus diesem Grunde muß vor der Ionisation ein „Schönungsfluß“ um die Kapillare herum zugeführt werden. Electrospray-MS ermöglicht die Detektion von Biopolymeren durch mehrfache Ionisierung<sup>[69–72]</sup>.

Andere Detektionsmethoden (Raman-Spektroskopie<sup>[73]</sup>, On-line-Radioaktivitätsmessung<sup>[74]</sup>, Bestimmungen des Circulardichroismus<sup>[75]</sup>, des Brechungsindex<sup>[76]</sup> und der Capillary-Vibration<sup>[77]</sup>) wurden vorgestellt. Ob sie für den Routineeinsatz geeignet sind, ist zur Zeit noch offen.

In Tabelle 2 sind die erzielbaren Nachweisgrenzen der häufigsten Detektionssysteme zusammengestellt. Es zeigt sich, daß wohl – bedingt durch die kleinen Volumina – exzellente Massenempfindlichkeiten erzielt werden können. Die Konzentrationsempfindlichkeiten liegen in dem Bereich, der auch mit HPLC zugänglich ist.

Selbstverständlich lassen sich vor der Trennung in nicht UV-aktive und nicht fluoreszierende Proben mit den gebräuchlichen Derivatisierungsreagentien Chromophore einführen. Spezielle Reagentien für die Elektrophorese, bei denen bei der Derivatisierung von Neutralsubstanzen gleichzeitig auch Ladungen mit eingeführt werden, sind im Gespräch<sup>[78–81]</sup>.

Tabelle 2. Detektionsmethoden in der Kapillarelektrophorese.

Detectionsarten	Nachweisgrenzen absolute Menge [mol]	Konzentration [mol L <sup>-1</sup> ]	typische Anwendung	Bemerkungen
UV-Absorption	$10^{-15}$ – $10^{-13}$	$10^{-7}$ – $10^{-4}$	aromatische Verbindungen, Proteine, Nukleinsäuren, ...	Standarddetektion in der CE (Bestandteil aller käuflichen Apparaturen)
indirekte UV-Absorption	$10^{-16}$ – $10^{-13}$	$10^{-8}$ – $10^{-4}$	Metall-Ionen, Amine, organische und anorganische Ionen, Zucker	mit käuflichen Apparaturen durchführbar
Fluoreszenz	$10^{-18}$ – $10^{-13}$	$10^{-9}$ – $10^{-4}$	derivatisierte Aminosäuren, DNA, Peptide, Proteine	Derivatisierung für viele Proben notwendig
Laser-fluoreszenz	$10^{-21}$ – $10^{-17}$	$10^{-13}$ – $10^{-7}$	DNA-Fragmente, derivatisierte Aminosäuren	Laser sind noch sehr kostenintensiv (Einsatzbereiche im VIS und nahen UV)
indirekte Fluoreszenz	$10^{-16}$ – $10^{-14}$	$10^{-7}$ – $10^{-5}$	Alkohole, Amine, Anionen, Kationen, Zucker	bisher wenige Anwendungen bekannt
Amperometrie	$10^{-16}$ – $10^{-14}$	$10^{-8}$ – $10^{-6}$	leicht reduzierbare und oxidierbare Substanzen, z.B. Neurotransmitter	Kapillaren bis 2 µm innerer Durchmesser einsetzbar
Konduktometrie	$10^{-18}$ – $10^{-16}$	$10^{-7}$ – $10^{-5}$	ionische Proben, z.B. Metall-Ionen, Amine, Carbonsäuren	schwierige Handhabung bei Kapillarwechsel
Potentiometrie	$10^{-19}$	$10^{-8}$	Alkali- und Erdalkalimetall-Ionen; selektiver Nachweis durch ionenselektive Mikroelektroden	schwierige Handhabung und Herstellung der Mikroelektroden
Massenspektrometrie	$10^{-17}$	$10^{-8}$	Proteine, Peptide, Drug-monitoring	Interfaces käuflich; Kopplung mit automatisierten Geräten möglich
On-line-Radioaktivitätsmessung	$10^{-18}$ – $10^{-16}$	$10^{-10}$ – $10^{-8}$	<sup>32</sup> P und <sup>14</sup> C in biochemisch relevanten Verbindungen	gute Nachweisempfindlichkeit durch Stop-flow-Systeme

## 4. Trennmethoden in der Kapillarelektrophorese

### 4.1. Kapillarelektrophorese in unbeschichteten Kapillaren

#### 4.1.1. Einfluß des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes auf den Transport der Proben zum Detektor hat zwei Ursachen: Zum einen ist, wie bereits ausgeführt, die auf elektrophoretischer Migration basierende Trennung mehr oder minder vom EOF überlagert, dessen Größe von der Dissoziation der Oberflächensilanolgruppen beeinflußt wird. Zum anderen wird die Beweglichkeit von Ionen durch ihren Dissoziationsgrad im Trägerelektrolyten und damit von dessen pH-Wert bestimmt. Damit kann durch Änderung des pH-Wertes und der Art des Puffers die Trennung optimiert werden. Die größten Wanderungsunterschiede bei schwachen Elektrolyten, d. h. die höchste Selektivität, erhält man, wenn der pH-Wert des Puffers zwischen den  $pK_s$ -Werten der Probenbestandteile liegt, wie aus der klassischen Elektrophorese bekannt. Undissocierte Probenbestandteile wandern mit der Geschwindigkeit des EOF durch die Kapillare. Der EOF hängt, wie gezeigt, ebenfalls vom pH-Wert und anderen Elektrolyteigenschaften, insbesondere der Ionenstärke, ab. Die Abhängigkeit des EOF vom pH-Wert bei Quarzkapillaren wurde bereits in Abbildung 4 gezeigt.

Die Möglichkeiten, die sich aus der Überlagerung von elektrophoretischer Wanderung und EOF ergeben, lassen sich am Beispiel der Nucleotide demonstrieren. Der EOF ist zur Kathode gerichtet, die Nucleotide wandern zur Anode, am schnellsten die Triphosphate, da sie die höchste Ladung tragen. Selbst bei hohen pH-Werten (pH > 10) reicht der EOF nicht aus, um die Triphosphate zum Detektor an der Kathode zu transportieren. Wenn die elektrophoretische Mobilität der Mono- und Diphosphate niedriger ist als der EOF, werden sie zum Detektor transportiert, den sie zu unterschiedlichen Zeiten erreichen. Die Trennung derartiger Proben ist in Abbildung 7 gezeigt. Unter diesen experimen-

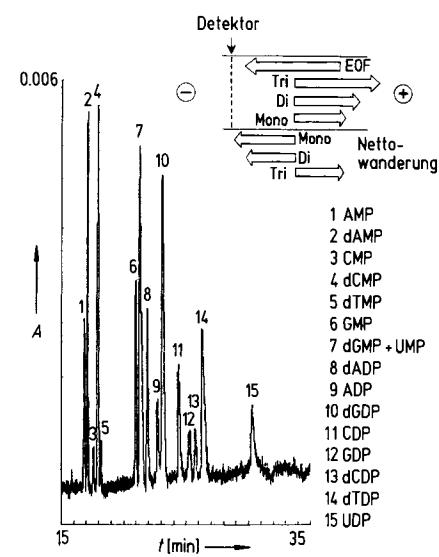


Abb. 7. Trennung von Mono- und Dinucleotiden mit einer unbeschichteten Kapillare. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 75 \text{ cm}$ ,  $ID = 75 \mu\text{m}$ ; Puffer:  $100 \text{ mM}$  CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure),  $\text{pH} = 10.5$ ; Feld:  $E = 200 \text{ Vcm}^{-1}$ ,  $I = 35 \mu\text{A}$ , Probenkonzentration:  $100$ – $250 \mu\text{M}$ . Trinucleotide wandern schneller zur Anode und können nicht detektiert werden.

tellen Bedingungen ist der vektorielle Beitrag des EOF nicht ausreichend zum Transport der Triphosphate, die somit in den Anodenraum wandern. Bei Umpolung kann man die Triphosphate bestimmen, während die Di- und Monophosphate mit dem EOF in die andere Richtung getrieben werden. Durch Zusatz von Ionenpaarbildnern kann die Mobilität so variiert werden, daß alle Nucleotide getrennt werden können<sup>[18,2]</sup>. Auch durch Umkehr des EOF durch Oberflächenmodifikation bei gleichzeitiger Feldumkehr ist eine Trennung von Anionen mit stark unterschiedlicher Mobilität in einer Analyse möglich (siehe Abb. 16).

#### 4.1.2. Einfluß der Ionenstärke

In Abbildung 8a ist der Einfluß der Ionenstärke auf den EOF und die Mobilität der Ionen gezeigt. Der Strom wurde in allen Fällen konstant gehalten. Der Neutralmarker (Benzylalkohol) wird bei einer Konzentration von 100 mM nach etwa 15 Minuten eluiert, die zur Anode wandernden Carbonsäuren überhaupt nicht. Reduziert man die Ionenkonzentration auf 20 mM, so ist die Trennung nach etwa 20 Minuten und bei 10 mM nach 5 Minuten beendet. Die Analysenzeit wird hier durch die Größe des EOF bestimmt, da die effektive Probenmigration kaum von der Pufferkonzentration beeinflußt wird. Die Di- und Tricarbonsäuren wandern als asymmetrische Peaks mit Tailing (Dreieckpeaks mit fast senkrechtem Anstieg), was auf ihre geringere Mobilität gegenüber den Borat-Ionen des Puffers zurückzuführen ist. Diese Dreieckpeaks entstehen immer bei zu großen Mobilitätsunterschieden zwischen Probe und Trägerelektrolyt<sup>[8]</sup>. Proben mit größerer Mobilität als das Puffer-Ion zeigen Leading. Voraussetzung für symmetrische Peaks und damit hohe Bodenzahlen ist Übereinstimmung in der Mobilität von Probe und Trägerelektrolyt. Analoge Effekte treten auf, wenn bei konstanter Spannung gearbeitet wird, wie in

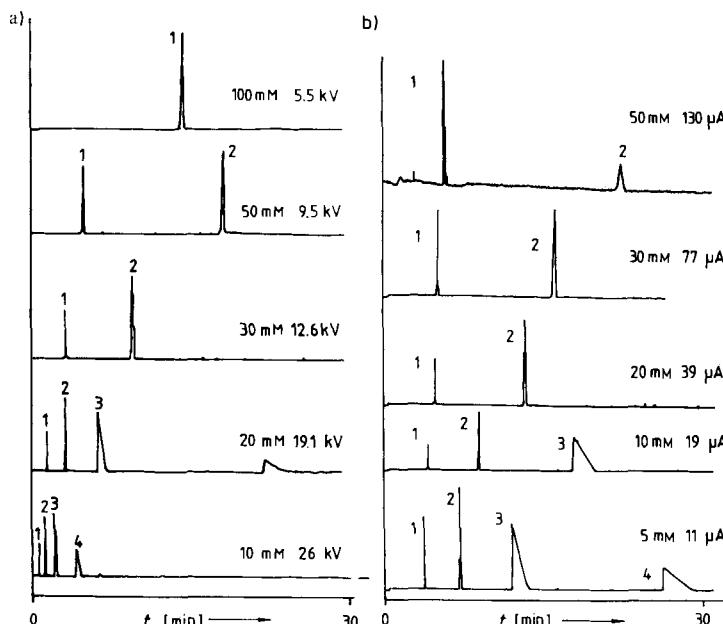


Abbildung 8. Abhängigkeit des EOF von der Ionenstärke des Puffers. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 44$  cm,  $ID = 75$   $\mu\text{m}$ ; Puffer: Borat unterschiedlicher Konzentration,  $\text{pH} = 9.5$ . a) Strom konstant ( $100 \mu\text{A}$ ); b) Feld konstant ( $230 \text{ V cm}^{-1}$ ). Probe: 1 = Benzylalkohol, 2 = Benzoësäure, 3 = Benzol-1,2-dicarbonsäure, 4 = Benzol-1,3,5-tricarbonsäure.

Abbildung 8b demonstriert. Beim Vergleich beider Abbildungen ist der Vorteil der niedrigen Pufferkonzentrationen und der damit möglichen höheren Spannungen klar zu erkennen, da die Analysenzeiten wesentlich verkürzt werden können (Abb. 8a). Optimal sind demnach niedrige Pufferkonzentrationen und hohe Feldstärken.

Abbildung 9 zeigt den Einfluß der Pufferkonzentration auf die Bandenverbreiterung  $H$  von Proben unterschiedlicher Mobilität. Für den Neutralmarker (Durchbruch der

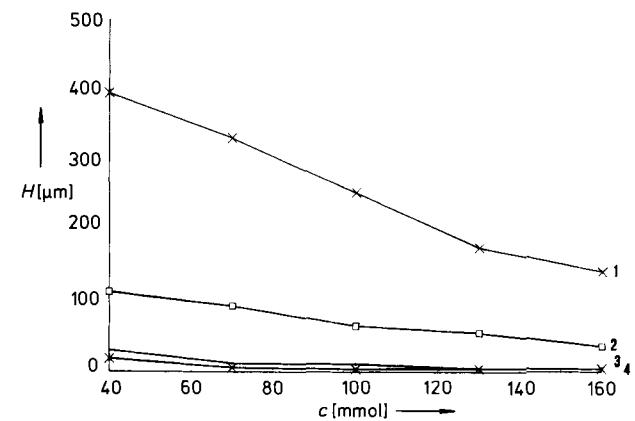


Abbildung 9. Einfluß der Pufferkonzentration auf die Bandenverbreiterung  $H$  von Proben. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 50/54$  cm,  $ID = 50$   $\mu\text{m}$ ; Puffer: Borat unterschiedlicher Konzentration,  $\text{pH} = 8.5$ ;  $E = 560 \text{ V cm}^{-1}$ ; UV-Detektion bei  $214 \text{ nm}$ . Probe: 1 = Benzol-1,3,5-tricarbonsäure, 2 = Benzol-1,2-dicarbonsäure, 3 = p-Hydroxybenzoësäure, 4 = Benzylalkohol.

Zone mit dem EOF) Benzylalkohol und für die nur schwach dissozierte para-Hydroxybenzoësäure erhält man auch mit niedriger Pufferkonzentration (50 mM) geringe Bandenverbreiterung und hohe Trennleistung. Die Bandenverbreiterung für die Di- und Tricarbonsäuren ist bei dieser Pufferkonzentration untragbar hoch. Auch bei hohen Pufferkonzentrationen erreicht die Bandenverbreiterung nie den niedrigen Wert, den man für nicht oder schwach dissozierte Proben erhält.

#### 4.1.3. Auswahl des Puffers

Bei der Auswahl des Puffers sind mehrere Gesichtspunkte zu beachten. Wie eben gezeigt, müssen die Mobilitäten übereinstimmen, um hohe Trennleistungen zu erzielen. Die Konzentration der Puffer-Ionen sollte größer sein als die Konzentration der Ionen in der Probenlösung. Dies führt ebenfalls zu symmetrischen, scharfen Zonen. Hohe Ionenstärke bedeutet jedoch bei gegebenem Spannungsabfall hohe Stromdichte und damit einen Anstieg der Jouleschen Wärme. Diese Effekte lassen sich einfach als Abweichungen vom Ohmschen Gesetz messen. Dies ist in Abbildung 10 für zwei Puffersysteme und Kapillaren mit unterschiedlich großen Innendurchmessern dargestellt. Der Vorteil organischer Puffer mit ihrer geringeren Leitfähigkeit ist klar zu erkennen. Auch bei der dicken Kapillare ist das Ohmsche Gesetz für den 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure(CAPS)-Puffer im gesamten Bereich erfüllt, während mit der gleichen Kapillare und dem Boratpuffer bei 10 kV der Linearitätsbereich verlassen wird. Beim Boratpuffer sind auch die Vorteile der dünnen Kapillaren beim Wärmeabtransport zu sehen. Mit

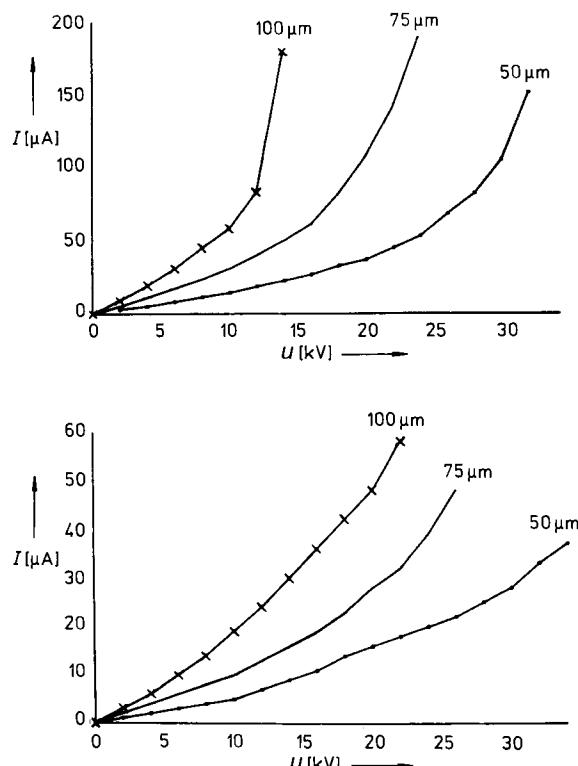


Abb. 10. Strom-Spannungs-Kurven in Abhängigkeit vom Kapillardurchmesser und der Pufferkonzentration. Obere Kurven: Puffer: 20 mM Borat, pH = 9.5; Untere Kurven: Puffer: 25 mM CAPS, pH = 11.

der 50-μm-Kapillare kann auch bei 25 kV noch gearbeitet werden. Da die Dauer der Analyse der angelegten Feldstärke umgekehrt proportional ist, sind damit auch kürzere Analysezeiten erzielbar.

#### 4.1.4. Einsatzgebiete

Die Elektrophorese in unbeschichteten Kapillaren ist das Standardverfahren, das sich besonders für kleine Moleküle mit permanenten Ladungen eignet. So lassen sich ohne Schwierigkeiten aliphatische und aromatische Carbonsäu-

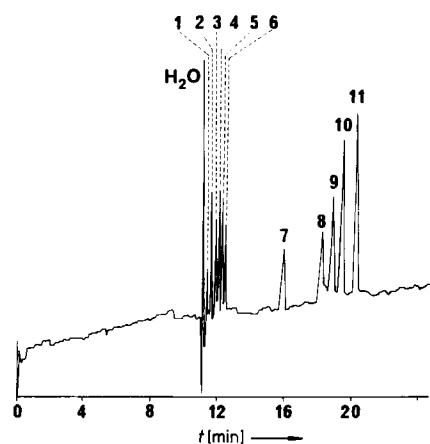


Abb. 11. Trennung von Kohlenhydraten mittels CZE. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 100/122$  cm,  $ID = 50$  μm; Puffer: 6 mM Sorbat, pH = 12.1; Feld:  $E = 230$  Vcm $^{-1}$ ;  $I = 13$  μA,  $T = 30$  °C, UV-Detektion bei 256 nm; CE-Instrument: ABI Model 270 A. Probe: 1 = Raffinose, 2 = 2-Desoxy-D-ribose, 3 = Galactose, 4 = Glucose, 5 = Rhamnose, 6 = Mannose, 7 = N-Acetylneuraminsäure, 8 = Gluconsäure, 9 = Galacturonsäure, 10 = Glucuronsäure, 11 = Mannuronsäure (aus Lit. [85]).

ren, Sulfonsäuren, Aminosäuren, Phenole, Nucleotide und Amine trennen. Eine gute Zusammenstellung aktueller Anwendungsbeispiele findet sich in den beiden Übersichtsartikeln von Kuhr<sup>[83, 84]</sup>. Ein Beispiel einer Trennung von Zukkern und Zuckersäuren zeigt Abbildung 11<sup>[85]</sup>. In Abbildung 12 ist die Trennung von Kationen und niederen aliphatischen Aminen mit indirekter UV-Detektion gezeigt.

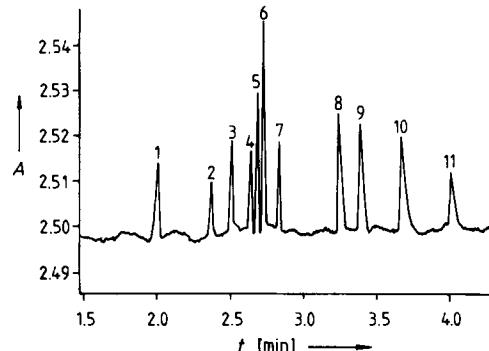


Abb. 12. Trennung von Metall-Ionen, Aminen und Aminoalkoholen mit indirekter UV-Detektion. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 50/58$  cm,  $ID = 75$  μm; Puffer: 5 mM Imidazol, pH = 4.5; Feld:  $E = 430$  Vcm $^{-1}$ ,  $I = 9$  μA; Probe: 1 =  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ , 2 =  $\text{Na}^+$ , 3 = Dimethylamin, 4 =  $\text{Ca}^{2+}$ , 5 = Trimethylamin, 6 =  $\text{Mg}^{2+}$ , 7 =  $\text{Li}^+$ , 8 = Diethylamin, 9 = Triethylamin, 10 = Diethanolamin, 11 = Triethanolamin. Probenkonzentrationen: 1–3 ppm (aus Lit. [51]).

Als Elektrolytkomponente, die gleichzeitig als UV-Absorber dient, wird Imidazol verwendet<sup>[51]</sup>. Abbildung 13 zeigt die CE eines natürlichen Tanningemisches. Die Trennung von geladenen Molekülen mit relativ großen hydrophoben Resten lässt sich durch Zusatz von SDS verbessern, wie in Abbildung 14a am Beispiel aromatischer Sulfonsäuren veranschaulicht. Die Auflösung der ersten Komponenten ist nur in Gegenwart von SDS möglich, die Migration der als Kuppelungskomponenten in der Farbstoffchemie verwendeten „Buchstabensäuren“ wird durch SDS erwartungsgemäß nicht beeinflusst. Die Optimierungsmöglichkeiten von CE-Trennungen durch Zusatz von Detergentien werden in Ab-

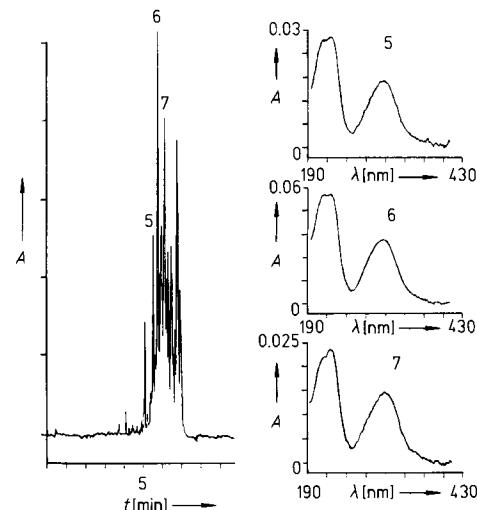


Abb. 13. Trennung von Tanninsäuren und deren Charakterisierung mit Diodearray-Detektion. Repräsentativ sind zu den gekennzeichneten Peaks einige Spektren angegeben. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 50/80$  cm,  $ID = 75$  μm; Puffer: 50 mM Borat, pH = 9.5; Feld:  $E = 375$  Vcm $^{-1}$ ,  $I = 32$  μA; Perkin Elmer LC-480.

schnitt 4.5, der sich mit micellarer elektrokinetischer Chromatographie befaßt, ausführlich diskutiert. In den Abbildungen 13 und 14b ist auch die Leistungsfähigkeit des Diodenarray-Detektors in der Kapillarelektrophorese demonstriert. Selbst bei diesen scharfen Peaks (vgl. Abb. 13) ist

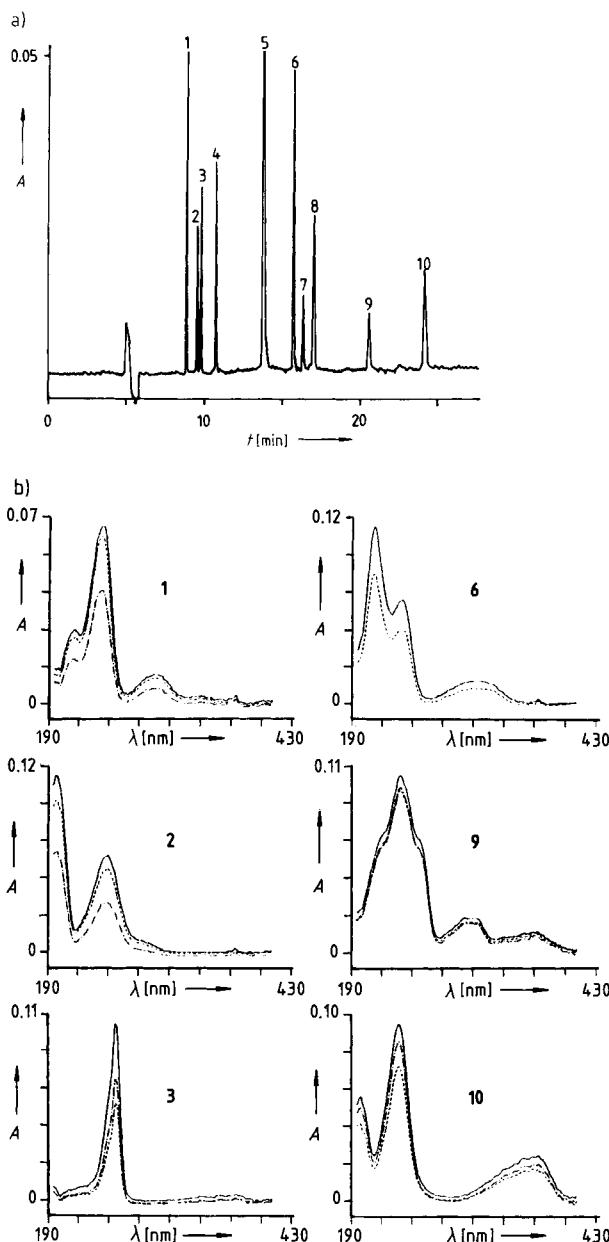


Abbildung 14. Trennung von aromatischen Sulfonsäuren und deren Charakterisierung mit Diodenarray-Detektion. a) Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 50/80 \text{ cm}$ ,  $ID = 75 \mu\text{m}$ ; Puffer: 59 mM Borat, 50 mM SDS, pH = 9.5; Feld:  $E = 310 \text{ Vcm}^{-1}$ ,  $I = 39 \mu\text{A}$ . Probe: 1 = 2-Naphthylamin-6-sulfosäure, 2 = Sulfanilsäure, 3 = Benzolsulfosäure, 4 = Anthracen-2-sulfosäure, 5 = 1-Naphthylamin und 2-Methylnaphthalin (als Marker), 6 = 1-Hydroxymethyl-2-naphtol-6-sulfosäure, 7 = 2-Naphtol-6-sulfosäure, 8 = R-Säure, 9 = G-Säure, 10 = H-Säure. b) Repräsentative Spektren für die jeweils angegebenen Probenkomponenten. Die Detektion erfolgte mit einem an die Kapillarelektrophorese angepaßten Perkin Elmer LC-480.

die Reinheitsüberprüfung durch Aufnahme von UV-Spektren am Peakmaximum und an den jeweiligen Wendepunkten durch deren Überlagerung möglich. Abbildung 14b zeigt die Überlagerung der online aufgenommenen UV-Spektren der Säuren.

## 4.2. Kapillarelektrophorese in oberflächenmodifizierten Kapillaren

Durch chemische Modifikation der Kapillaroberfläche oder durch ihre dynamische Beschichtung kann der EOF kontrolliert werden. Gleichzeitig wird dadurch die mögliche Adsorption von Probenbestandteilen an der Kapillaroberfläche vermindert und die Reproduzierbarkeit der Analyse verbessert. Für die Analyse von Proteinen beispielsweise sind oberflächenmodifizierte Kapillaren unbedingt erforderlich.

### 4.2.1. Dynamisch modifizierte Kapillaren

Die einfachste Möglichkeit, die Oberfläche von Quarzkapillaren zu modifizieren, besteht darin, der Pufferlösung eine Komponente zuzusetzen, die bevorzugt von den Oberflächensilanolgruppen adsorbiert wird. Durch die Bildung dieser Schicht wird der EOF beeinflußt und die Adsorption durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkung vermindert.

Bei Verwendung von kationischen Detergentien bildet sich, wie in Abbildung 15 gezeigt, eine Doppelschicht, bei der positive Ladungen in das Kapillarinne zeigen. Dadurch kehrt sich der EOF um. Mit dieser Methode ist die

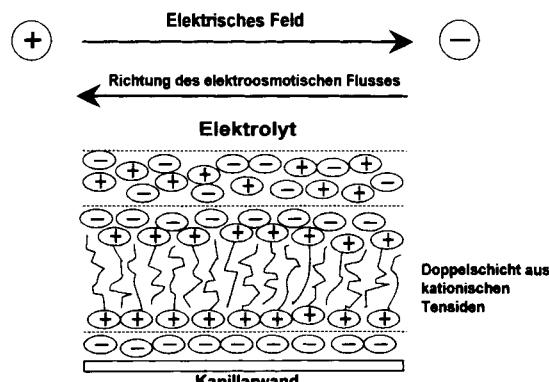


Abbildung 15. Schematische Darstellung der EOF-Umkehr durch kationische Detergentien.

Trennung auch schnell wandernder Anionen möglich, wenn das Feld zusätzlich noch umgepolt wird<sup>[17]</sup>. Abbildung 16 zeigt dies im Vergleich zu dem in Abbildung 7 skizzierten Fall. Dort war der EOF zur Kathode gerichtet, die schnell wandernden Triphosphate wanderten zur Anode. Durch Umpolen könnten diese detektiert werden, allerdings würden dann die langsam wandernden Anionen nicht mehr erfaßt. Wird zusätzlich auch der EOF umgedreht, dann können sowohl schnelle wie auch langsam wandernde Anionen detektiert und bestimmt werden. Abbildung 17 zeigt dies für eine Analyse von anorganischen und organischen Anionen mit indirekter UV-Detektion im ppm-Bereich. Als UV-Absober wird Chromat verwendet<sup>[18]</sup>, zur Belegung der Kapillaroberfläche wird z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid verwendet. Es ist darauf zu achten, daß mit dem zugesetzten Detergens die kritische micellare Konzentration nicht überschritten wird.

Positive Oberflächenladungen sind auch nützlich bei der Trennung von Proteinen. So können kationische Proteine

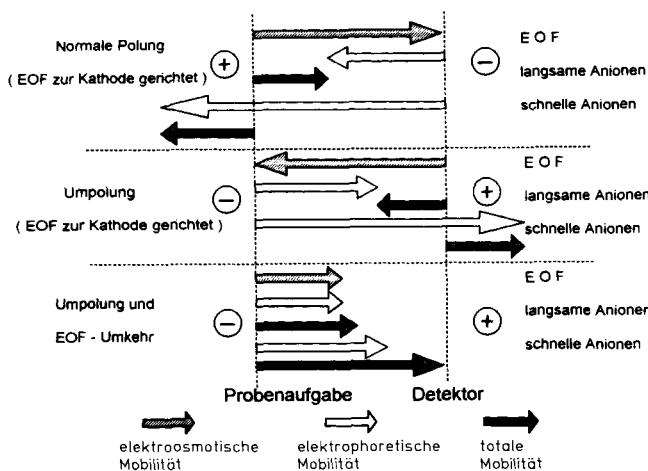


Abb. 16. Migration der Ionen bei normalem EOF und mit EOF-Umkehr.

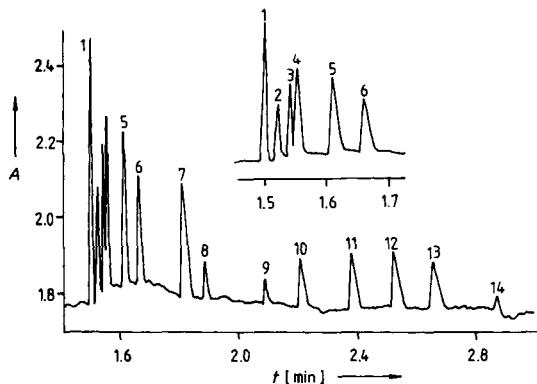


Abb. 17. Trennung von anorganischen und organischen Anionen. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 42/50 \text{ cm}$ ,  $ID = 75 \mu\text{m}$ ; Puffer: 5 mM Chromat, 0.5 mM Hexadecyltrimethylammoniumbromid (dynamische Belegung), pH = 8.1; Feld:  $E = 600 \text{ Vcm}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 254 nm. Probe: 1 = Bromid, 2 = Chlorid, 3 = Sulfat, 4 = Nitrit, 5 = Nitrat, 6 = Azid, 7 = Fluorid, 8 = Phosphat, 9 = Carbonat, 10 = Acetat, 11 = Propionat, 12 = Butyrat, 13 = Valerat, 14 = D-Gluconat.

durch elektrostatische Abstoßung an der Adsorption gehindert werden. Dies erreicht man entweder durch Zusatz von Detergentien<sup>[92]</sup> oder durch Beschichtung der Kapillarober-

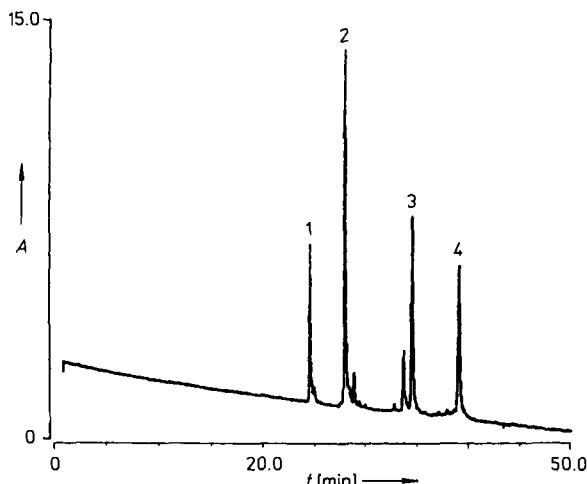


Abb. 18. Trennung basischer Proteine in einer unbelegten Kapillare. Bedingungen: Kapillare: Polymicro,  $L = 55/75 \text{ cm}$ ,  $ID = 50 \mu\text{m}$ ; Puffer: 50 mM Phosphat/40 mM 1,3-Diaminopropan/20 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH = 3.5; Feld:  $E = 200 \text{ Vcm}^{-1}$  (nach Lit. [90, 113]). Probe: 1 = Cytochrom c; 2 = Lysozym; 3 = Ribonuclease A; 4 = Chymotrypsinogen.

fläche mit Polyethylenimin, das an der Oberfläche zusätzlich quervernetzt werden kann<sup>[108]</sup>. Mit basischen Proteinen erzielt man auf diese Weise hohe Trennstufenzahlen und symmetrische Peaks. Auch durch Zusatz von niederen Polyaminen zum Puffer<sup>[90]</sup> lässt sich die störende Adsorption von Proteinen an der Kapillaroberfläche vermindern. Man erhält Trennungen mit hoher Effizienz, allerdings muß dann wegen der hohen Eigenleitfähigkeit des Puffers die Feldstärke niedrig gehalten werden. Da dabei zusätzlich der EOF herabgesetzt wird, sind die Analysenzeiten relativ hoch. Als Beispiel sei die Trennung von Standardproteinen in Abbildung 18 gezeigt. Eine Übersicht der hauptsächlich verwendeten Trennsysteme bei der Trennung von Proteinen in unbelegten Kapillaren gibt Tabelle 3.

Tabelle 3. Proteintrennungen mit Pufferzusätzen ohne Kapillarbelegungen.

Puffer [a]	$c [\text{mM}]$	pH	pI	$N [\times 10^3 \text{ m}^{-1}]$	Lit.
Tricin/KCl	10/20	8.3	5–7	500	[86]
CHES/ $\text{K}_2\text{SO}_4$ /EDTA	100/250/1	9.0	5–11	100	[87]
Phosphat/Betain/ $\text{K}_2\text{SO}_4$	40/2000/100	6.7	9–11	300	[88]
Phosphat/Sulton	100/1000	7.0	5–11	300	[89]
1,3-Diaminopropan/ $\text{K}_2\text{SO}_4$	40/20	3.5	9–11	300	[90]
Phosphat/BRIJ 35	10/10 ppm	7.0	3–11	100	[91]
Phosphat/FC 134	50/100 ppm	7.0	7–11	300	[92]
Borat/SDS	100/0.5 %	10.0	4–6	?	[93]

[a] Abkürzungen: Tricin = *N*-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin, CHES = 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure, BRIJ 35 = Polyethylenglycolaurylether, FC 134 = Fluorad (fluorhaltiges kationisches Detergens; 3 M Company, St. Paul, MN (USA)).

#### 4.2.2. Chemisch modifizierte Kapillaroberflächen

Zur Modifizierung von Kapillaren für die Elektrophorese wurden sowohl die für die Gaschromatographie entwickelten Techniken (Polymercoating) als auch Methoden zur Modifizierung von Kieselgeloberflächen (Silanierungsreaktionen, Oberflächenpolymerisation) eingesetzt. Eine Zusammenstellung der wichtigsten bekannten Beschichtungsmethoden, ihrer Haupteinsatzgebiete und die Stabilitätsbereiche der Beschichtungen gibt Tabelle 4. Die Haupteinschränkung bei der Silanierung ist die begrenzte Stabilität der Beschichtung bei höheren pH-Werten, eine aus der HPLC bekannte, schmerzhafte Tatsache. Der Nachteil der Polymerbeschichtung liegt in ihrer starken Hydrophobie, so daß derartige Phasen häufig in Gegenwart nichtionischer oder zwitterionischer<sup>[91]</sup> Detergentien für Proteintrennungen verwendet werden. Wie bereits ausgeführt, läßt sich die Beschichtung und ihre Stabilität am einfachsten über die Veränderung oder Konstanz des EOFs charakterisieren.

In Analogie zur klassischen Elektrophorese hat man für die Proteintrennung oft Acrylamidbeschichtungen verwendet<sup>[16, 103–105]</sup>. Häufig wird diese Beschichtung als „lineares Acrylamid“ bezeichnet. Abbildung 19 zeigt die Trennung der gleichen Standardproteine wie in Abbildung 18 an einer Polyacrylamid-beschichteten Kapillare. Trotz des hier auch merklich herabgesetzten EOF kann man mit normaler Feldstärke arbeiten, so daß die Trennung nach etwa 5 Minuten beendet ist. Ein weiterer Vorteil beschichteter Kapillaren ist die bessere Konstanz und Reproduzierbarkeit des EOF. Nachteilig macht sich die verminderte Stabilität bei hohen

Tabelle 4. Übersicht über Kapillarbelegungsverfahren.

Funktionalität	pH-Bereich	Anwendungen	Lit.
<i>Konventionelle Belegungen</i>			
Trimethylsilyl-	7	kleine Moleküle	[94]
Trimethylsilyl-	9	MEC	[95]
RP-C8 [a]	9	Proteine	[96]
RP-C18 [b]	9	Proteine	[96, 97]
Polyethylen glycol-	3–5	Proteine	[98]
Diol-[3-(2,3-Epoxypropoxy)propyl]-trimethoxysilan [c]	3–5	Proteine	[94, 99]
Maltose	3–7	Proteine	[99]
Pentafluoraryl- $\alpha$ -Lactalbumin	7	Proteine	[101]
<i>Polymerbelegungen</i>			
lineares Polyacrylamid	2–8 (bis 10) [d]	Proteine DNA-Fragmente	[16, 103, 104] [105, 106]
Polyethylenimin	3 bis 11	Proteine	[108]
1-Vinyl-2-pyrrolidin	2 bis 6	Proteine	[100]
Poly(methylglutamat)	7	Proteine	[109]
Polymethylsiloxan (OV1)	7	MEC	[110, 111]
Polyethylen glycol	7	MEC	[110, 111]
Polysiloxan/ $\beta$ -Cyclodextrin	7	chirale Trennungen	[112]

[a] RP-C8 = *n*-Octylsilyl. [b] RP-C18 = *n*-Octadecylsilyl. [c] Im Handel auch als „Glycidoxypropylsilan“. [d] Angegebener Stabilitätsbereich in Lit. [105] oder höchster bei Messungen verwendeter pH.

pH-Werten ( $\text{pH} > 7$ ) bemerkbar. Durch Verwendung ionischer Beschichtungen<sup>[108, 113]</sup> kann darüber hinaus ein pH-unabhängiger Fluß erzielt oder aber die Richtung des EOF umgekehrt werden.

Wie in den Abbildungen 18 und 19 gezeigt, gelingt die Trennung von Proteinen sowohl mit dynamisch als auch mit permanent beschichteten Kapillaren. Eine allgemein gültige Aussage über die Vor- und Nachteile der beiden unterschiedlichen Trenntechniken läßt sich über die hier angestellten allgemeinen Betrachtungen hinaus noch nicht geben.

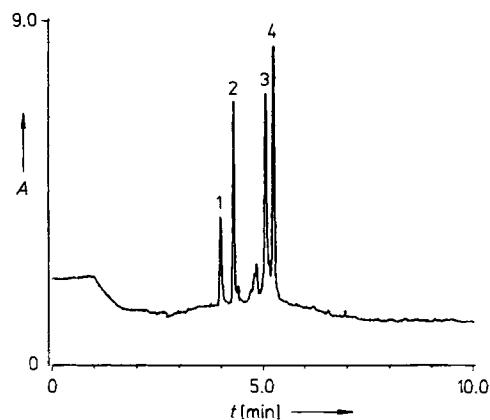


Abb. 19. Trennung von basischen Standardproteinen in einer mit linearem Polyacrylamid belegten Kapillare. Bedingungen: Kapillare:  $L = 31/48 \text{ cm}$ , Puffer: 30 mM Citrat,  $\text{pH} = 3.0$ ; Feld:  $E = 410 \text{ Vcm}^{-1}$ . Probe: 1 = Cytochrome C, 2 = Lysozym, 3 = Ribonuclease A, 4 = Chymotrypsinogen [ $c = 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ ].

Neben der Trennung von Proteinen werden beschichtete Kapillaren hauptsächlich auf dem Gebiet der micellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEC) eingesetzt, wo der EOF herabgesetzt werden muß, um lange Verweilzeiten in der Kapillare zu erzielen<sup>[100, 111]</sup>. Bei gelgefüllten Kapillaren ist durch Beschichtung der Oberfläche der EOF auszu-

schalten, um das Gel stationär in der Kapillare zu halten. An einer mit einem Cyclodextrin-gruppen-haltigen Polysiloxan belegten Kapillare wurde eine Enantiomeren-trennung beobachtet<sup>[112]</sup>, obwohl Wechselwirkungen mit der Kapillaroberfläche sonst immer zu starken Effizienzverlusten führen.

#### 4.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

In der klassischen Elektrophorese ist die IEF ein Trennverfahren von hoher Effizienz, das zusätzlich zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte von Proteinen eingesetzt wird. Dazu stellt man längs der Trennstrecke einen Ampholyt-stabilisierten pH-Gradienten in einem Gel her<sup>[114]</sup>. Die Proteine wandern in diesem pH-Gradienten nur, solange sie geladen sind; bei ihrem isoelektrischen Punkt (pI) kommen sie zum Stillstand. Die Ampholyte werden entweder dem Puffer zugesetzt oder kovalent am Gel gebunden<sup>[115–118]</sup>. Dies ist wegen der verhältnismäßig langen Analysenzeiten zur Stabilisierung des pH-Gradienten erforderlich. Der pH-Gradient wird vor der Probenaufgabe durch Anlegen der Spannung gebildet. Bei der Übertragung der IEF auf die CE sind Stabilisierungsgele für den pH-Gradienten nicht notwendig. Allerdings muß der EOF teilweise oder sogar komplett unterdrückt werden, um die Bildung des pH-Gradienten zu ermöglichen<sup>[119–122]</sup>. Neben der Belegung der Kapillaroberfläche kann dies auch durch Erhöhung der Viskosität der Pufferlösung durch Zusatz von hochviskosen Polymeren (z.B. Hydroxymethylcellulose) erreicht werden<sup>[123]</sup>. Letzteres ist von Vorteil, da sehr hohe pH-Werte bei der IEF verwendet werden müssen.

Im Gegensatz zur Flachbett-IEF findet in der Kapillare die Bildung des pH-Gradienten und die Fokussierung der Proteine im gleichen Schritt statt. Dazu füllt man die Kapillare mit der Lösung der Proben im Ampholytgemisch und gibt auf der Kathodenseite verdünnte Natronlauge und auf der Anodenseite Phosphorsäure in die Kapillare. Beim Anlegen der Spannung fließt primär ein hoher Strom. Den Abschluß der Fokussierung erkennt man am Abfall des Stroms auf einen konstanten, niedrigen Wert. Nachdem die Probe in der Kapillare fokussiert und damit getrennt ist, muß sie am Detektor vorbeitransportiert werden. Das erreicht man im allgemeinen durch Austausch der Kathodenelektrolyte gegen eine NaOH-NaCl-Lösung, die den pH-Gradienten zerstört, die fokussierten Proteine wieder mobilisiert und deren Transport zum Detektor ermöglicht<sup>[124]</sup>. Nachdem die Fokussierung in der gesamten Kapillare erfolgt, also auch zwischen Detektor und Kathode, können Proteine mit extrem hohen pI-Werten sich bei dieser Methode der Detektion entziehen. Durch Füllen der Kapillare mit NaOH bis über die Detektionsstelle hinaus kann dies verhindert werden. Ein Beispiel für die Möglichkeiten der IEF in Kapillaren zeigt Abbildung 20.

#### 4.4. Kapillargelelektrophorese (CGE)

Der gewaltige Aufschwung der Kapillarelektrophorese, insbesondere der Kapillargelelektrophorese, sowie die Einführung von käuflichen Geräten wurde durch das amerikanische Human-Genome-Projekt ausgelöst. Nahezu aus-

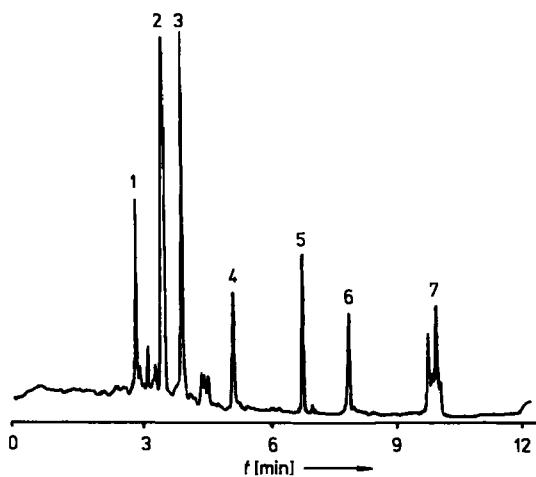


Abb. 20. Isoelektrische Fokussierung eines Protein-Standardgemisches ( $pI = 5.1\text{--}7.5$ ). Bedingungen: Kapillare:  $L = 12\text{ cm}$ ,  $ID = 25\text{ }\mu\text{m}$ , belegte Kapillare; Puffer: Bio-Lyte Ampholyte,  $\text{pH} = 3\text{--}10$ , Katholyt:  $0.01\text{ M}$  Phosphorsäure, Anolyt:  $0.02\text{ M}$  NaOH, Mobilisierung durch  $0.08\text{ M}$  NaCl und  $0.02\text{ M}$  NaOH; Spannung bei Fokussierung und Mobilisierung:  $7\text{ kV}$ ; UV-Detektion bei  $280\text{ nm}$  (0.1 AUFS (Absorption Units Full Scale)); (nach Application Note 31, BioRad). Probe: 1 = Humanhämoglobin C, 2 = Humanhämoglobin A, 3 = Pferdemyoglobin, 4 = Pferdemyoglobin (kleinerer Strang), 5 = Human-carboanhydrase, 6 = Rindercarboanhydrase, 7 =  $\beta$ -Lactoglobulin B.

schließlich wurden DNA-Bruchstücke aus Sequenzierungsreaktionen oder Restriktionsfragmente und ähnliches mit CGE getrennt<sup>[20, 125, 126]</sup>. Von den aus der klassischen Flachbett-Gelelektrophorese bekannten Geltypen wurden in Kapillaren hauptsächlich Acrylamide<sup>[127]</sup>, Agarose<sup>[128, 130]</sup> und Cellulose<sup>[129]</sup> als Matrix verwendet. Voraussetzung für die Stabilität des Gels in der Kapillare ist die vollständige Ausschaltung des EOF. Dies erreicht man durch Be-

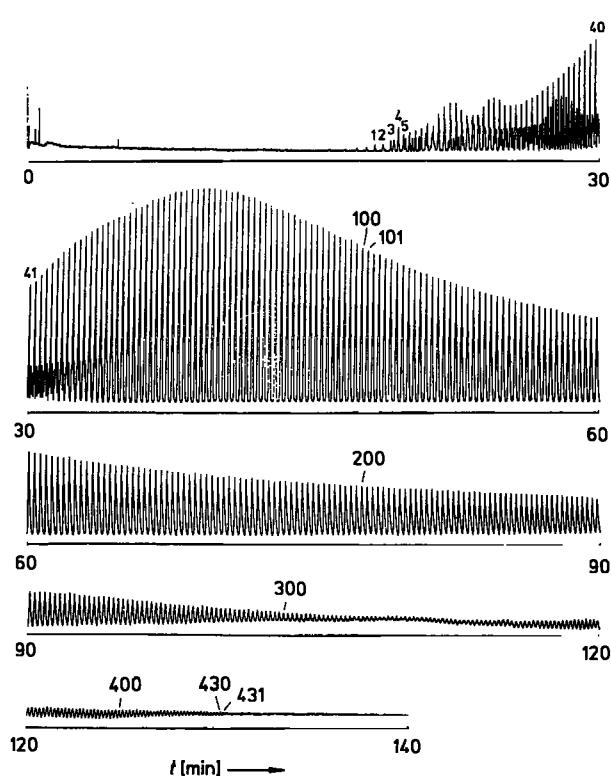


Abb. 21. Trennung von Poly(uridin-5'-phosphat). Bedingungen: Kapillare:  $L_{eff} = 45\text{ cm}$ ,  $ID = 100\text{ }\mu\text{m}$ ; Gel: Polyacrylamid 6% T, 5% C; Puffer:  $0.1\text{ M}$  Tris/0.25 M Borsäure/7 M Harnstoff; Feld:  $E = 300\text{ Vcm}^{-1}$ ,  $I = 12\text{ }\mu\text{A}$ ; Injektion: 5000 V, 2 s; UV-Detektion bei  $260\text{ nm}$  (entnommen aus Lit. [132]).

schichtung oder chemische Modifikation der Kapillarwand<sup>[103, 104]</sup>, wobei anfangs häufig das Gel bei der Polymerisation in der Kapillare mit der Oberflächenbeschichtung vernetzt wurde<sup>[20, 131]</sup>. Die Selektivität der Gele wurde über das Verhältnis Monomerkonzentration des Acrylamids (% T) zur Konzentration des Quervernetzers (% C) variiert. Die enorme Trennleistung dieser Kapillaren belegt eindrucksvoll Abbildung 21<sup>[132, 133]</sup>. Die Trennstufenzahl beträgt mehrere Millionen und steigt mit zunehmender Migrationszeit<sup>[133]</sup>. Dieser scheinbare Gegensatz zur Chromatographie zeigt, daß anscheinend nur die Longitudinaldiffusion zur Bandenverbreiterung beiträgt, und Gleichung (6) zumindest für die CGE die Abhängigkeit der Trennstufenzahl vom Diffusionskoeffizienten richtig wiedergibt.

Die fixierten Gele zeigten in der Praxis einige Nachteile. Sehr schnell trockneten die Gele an den Kapillarenden aus (Blasenbildung) und waren damit für die Weiterverwendung unbrauchbar. Der Austausch des Puffers in den Kapillaren war nicht oder nur mit großem Zeitaufwand möglich. Auch die thermische Stabilität derartiger Gele war gering. Eine beabsichtigte kommerzielle Nutzung scheiterte an diesen Problemen. Die Herstellung eigener Kapillaren erforderte hohes Geschick bei der Modifikation der Oberfläche und insbesondere bei der Durchführung der Polymerisation in der Kapillare<sup>[132, 134]</sup>.

Diese Probleme lassen sich vermeiden, wenn man in der Kapillare keine vernetzten Gele polymerisiert, sondern die Kapillare mit einer Lösung eines hochmolekularen wasserlöslichen Polymers füllt<sup>[135, 136]</sup>. Auch hierzu wird unter anderem „lineares“ Polyacrylamid (0% C) verwendet<sup>[142]</sup>. Die Polymere werden in das Puffergefäß eingebracht und durch Druck in die Kapillare gefüllt. Damit das Gel während der Trennung in der Kapillare nicht wandert, muß selbstverständlich auch hierbei der EOF ausgeschaltet werden. Jeglicher Fluß vermindert die Effizienz der Trennung. Die Selektivität sehr hochmolekularer „linearer Gele“ (z.B. 12% T) ähnelt den von quervernetzten Gelen, die in der Kapillare polymerisiert wurden. Abbildung 22 zeigt die Trennung von Restriktionsfragmenten (pBR 322) an einer mit „linearem Gel“ (3% T, 0% C) gefüllten Kapillare<sup>[137]</sup>. Die Trennstu-

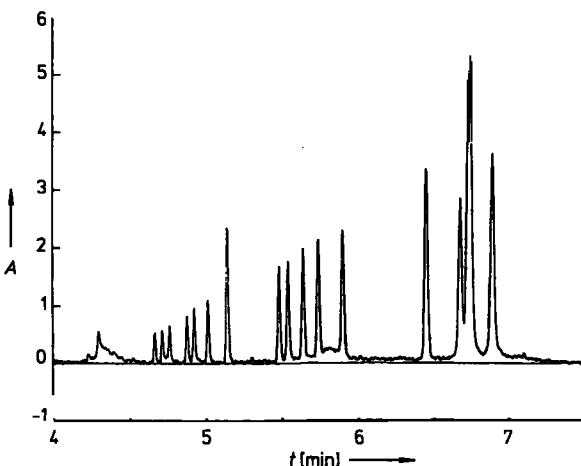


Abb. 22. Trennung von DNA-Restriktionsfragmenten mit „Flüssiggelen“. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 20/27\text{ cm}$ ; Puffer: 100 mM Tris-Borat,  $\text{pH} = 8.3$ ; 3% (w/v) lineares Polyacrylamid, Kapillarbelegung mit linearem Polyacrylamid; Feld:  $E = 300\text{ Vcm}^{-1}$ , UV-Detektion bei  $254\text{ nm}$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ . Probe: pBR 322-Hae-III-Restriktionsfragmente. Apparatur: Pace-System, Beckman Instruments.

fenzahl liegt hier bei etwa 600 000 Böden pro Meter. Bei diesen hohen Trennstufenzahlen scheint es wünschenswert, die Kapillare in gestreckter linearer Anordnung zu betreiben, da beim Wendeln der Kapillare Effizienzverluste beobachtet wurden<sup>[138]</sup>. Wie bereits ausgeführt, ist die Trennung von DNA-Bruchstücken in Gelen temperaturabhängig. Wie der Vergleich der Abbildung 22 mit Abbildung 23, bei der die gleiche Trennung bei 50 °C durchgeführt wurde, zeigt, nimmt die Selektivität, insbesondere bei den höhermolekularen Bruchstücken, mit der Temperatur zu, die Trennstufenzahl mit der Temperatur abnimmt. Auch hier stimmen Praxis und Theorie überein. Neben linearen Polyacrylamiden wurde auch Hydroxyethylcellulose erfolgreich zur Trennung von Restriktionsfragmenten eingesetzt<sup>[135, 139]</sup>.

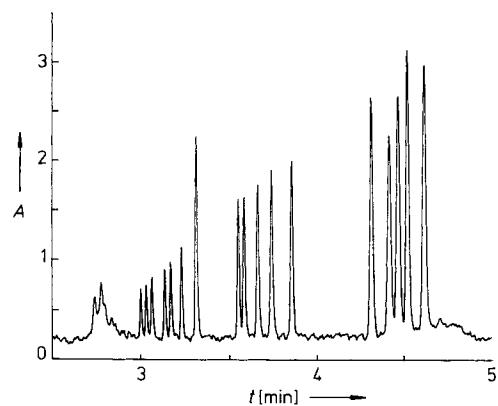


Abb. 23. Temperatureinfluß bei der Trennung von DNA-Restriktionsfragmenten. Trennbedingungen wie in Abbildung 22;  $T = 50^\circ\text{C}$ .

Die CGE wurde nahezu ausschließlich für die Trennung von DNA-Bruchstücken und weniger für die Proteintrennung verwendet. Ein empfindlicher Nachweis von Proteinen in gel gefüllten Kapillaren ist bei den erforderlichen niedrigen Wellenlängen ( $< 230 \text{ nm}$ ) im UV nicht möglich, da Acrylamide unter 250 nm optisch nicht mehr durchlässig sind. Hier dürften Cellulosederivate Vorteile bieten. Wechselwirkungen der Proteine mit den Gelen könnten ebenfalls mit einer Rolle spielen, da bisher nur mit SDS denaturierte Proteine in gel gefüllten Kapillaren getrennt werden konnten<sup>[138, 140, 141]</sup>. Bei der DNA-Sequenzierung wird ausschließlich mit laserinduzierter Fluoreszenz detektiert, da nur sehr geringe Probenmengen zur Verfügung stehen. Die Nachweisgrenze liegt hier bei  $10^{-11} \text{ mol pro Liter}$ .

#### 4.5. Micellare elektrokinetische Chromatographie (MEC)

Ungeladene Moleküle werden bei der CE ungetrennt zwischen den Kationen und den Anionen eluiert. Werden dem Puffer anionische Detergentien zugesetzt, am häufigsten wird SDS verwendet, so bilden sich um die ungeladenen Teilchen Micellen, die negativgeladen sind und zur Anode wandern<sup>[142, 143]</sup>. Ist bei unbelegten Kapillaren der EOF größer als die Wanderungsgeschwindigkeit der Micellen, so wandern diese auch zum Detektor an der Kathode. Hier ist die effektive Wanderungsgeschwindigkeit der Probenbe-

standteile die vektorielle Summe der elektrophoretischen Wanderung zur Anode und der elektroosmotischen Geschwindigkeit. Nachdem die Micellen stets mit annähernd gleicher Geschwindigkeit wandern, beruht die Trennung auf der Verteilung der ungeladenen Teilchen zwischen der Pufferlösung und dem Innern der Micellen. Dies ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt. Man kann hier mit Recht von einem chromatographischen Verfahren sprechen, da die Trennung der ungeladenen Teilchen auf einem Verteilungsgleichgewicht beruht. Bei geladenen Teilchen wird dieses Gleichgewicht von der eigenen elektrophoretischen Migration überlagert.

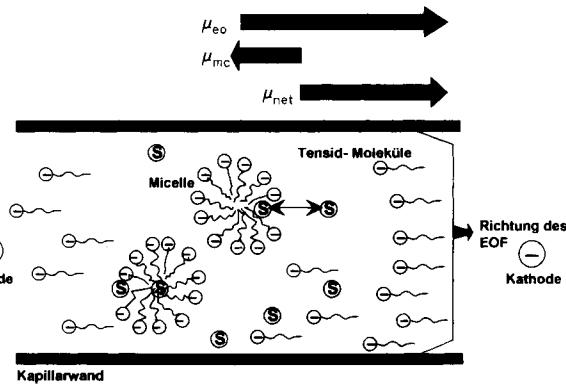


Abb. 24. Schematische Darstellung der micellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEC). S = Probenkomponente.  $\mu_{eo}$  = elektroosmotische Mobilität,  $\mu_{mc}$  = Mobilität der Micelle,  $\mu_{net}$  = Nettomobilität.

Am Beispiel der Trennung von Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Derivaten von Aminosäuren seien die Optimierungsmöglichkeiten für die MEC aufgezeigt. In Abbildung 25 ist die Trennung von elf Fmoc-Aminosäuren dargestellt. Durch den relativ großen und bei allen Proben identischen Beitrag des neutralen Derivatisierungsreagens ist die elektrophoretische Mobilität der Derivate sehr ähnlich und kaum eine Auf trennung erkennbar. Durch Zusatz von



Abb. 25. Trennung eines Gemisches von elf Fmoc-Aminosäuren mit CZE. Trennbedingungen: Kapillare: Chropack,  $L = 50/75 \text{ cm}$ ,  $ID = 50 \mu\text{m}$ . Feld:  $E = 330 \text{ Vcm}^{-1}$ ; UV-Detektion bei 200 nm. Puffer: 50 mM Borat, pH = 9.5; Probe: Fmoc-Aminosäuren.

SDS zum Puffer erhält man, unter sonst identischen Bedingungen, schon eine wesentlich bessere Auftrennung der Fmoc-Aminosäuren, wie in Abbildung 26 gezeigt. Durch

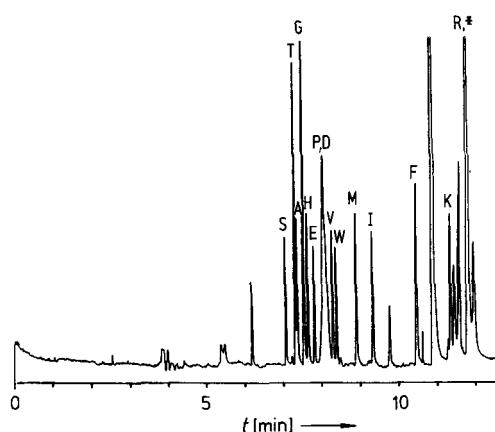


Abb. 26. Trennung von 16 Fmoc-Aminosäuren mit MEC. Die Peaks der identifizierten Aminosäuren sind entsprechend dem Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren gekennzeichnet; \* = Systempeak. Trennbedingungen: Puffer: 50 mM Borat, pH = 9.5, 50 mM SDS; sonst wie in Abbildung 25.

Zugabe einer organischen Komponente zum Puffer kann die Trennung weiter optimiert werden. Abbildung 27 zeigt die Trennung der Proben unter identischen Bedingungen, außer daß hier dem Puffer Methanol zugesetzt wurde. Durch diesen Zusatz wird das Verteilungsgleichgewicht der Proben zwischen dem Puffer und der Micelle beeinflußt, der EOF verändert sich ebenfalls und auch die Löslichkeit der Proben im Puffer<sup>[144]</sup>.

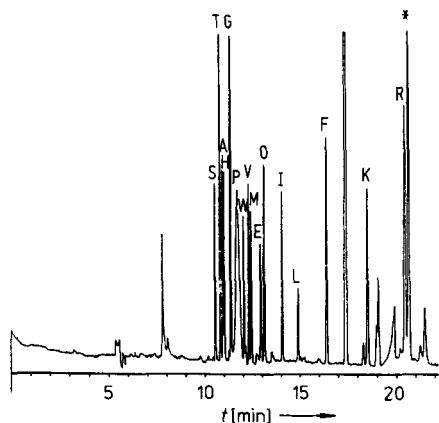


Abb. 27. Trennung von 16 Fmoc-Aminosäuren durch MEC mit Methanol als Pufferzusatz. Zur Kennzeichnung der Peaks vgl. Abbildung 26. Trennbedingungen: Puffer: 50 mM Borat, pH = 9.5, 50 mM SDS, 10% Methanol (v/v); sonst wie in Abbildung 25.

Zusätzlich zum anionischen Detergens und dem organischen Lösungsmittel können dem Puffer auch noch andere neutrale oder geladene Komponenten, z.B. Harnstoff, Zwitterionen oder andere Ionenpaarbildner, zugesetzt werden. Nachdem die Trennung auf Verteilungsgleichgewichten beruht, ist sie selbstverständlich auch temperaturabhängig. Die organischen Komponenten dürfen natürlich nicht in hohen Konzentrationen vorliegen, da sich dann kaum mehr Micellen bilden, obwohl man auch Trennungen erhält, wenn die

Konzentration des Detergents im submicellaren Bereich liegt. Auch gelang die Trennung chiraler Verbindungen durch Zusatz von chiralen Komponenten, z.B. alkylierten Aminosäurederivaten oder Cyclodextrinen, zum SDS-haltigen Puffer<sup>[145–147]</sup>. Mit einem solchen System war es sogar möglich, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe mit MEC zu trennen<sup>[148]</sup>. Zur Verbesserung der Löslichkeit dieser Verbindungen im wäßrigen Puffer wurden Harnstoff und Cyclodextrine in hohen Konzentrationen verwendet. Ein typisches Anwendungsbeispiel der MEC zur Trennung ungeladener Moleküle zeigt Abbildung 28. Die Variationsmöglich-

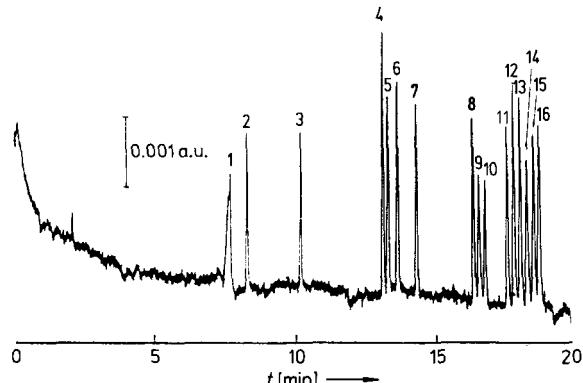


Abb. 28. Trennung von Phenolen mit MEC. Trennbedingungen: Kapillare:  $L = 65 \text{ cm}$ ,  $ID = 50 \mu\text{m}$ ; Puffer: 1 mmol SDS in 20 mM Borat-Phosphat-Puffer, pH = 7.0; Feld:  $E = 310 \text{ Vcm}^{-1}$ ,  $I = 28 \mu\text{A}$ , UV-Detektion bei 270 nm; T ca. 25 °C. Probe: 1 = Wasser, 2 = Acetylaceton, 3 = Phenol, 4 = o-Cresol, 5 = m-Cresol, 6 = p-Cresol, 7 = o-Chlorphenol, 8 = m-Chlorphenol, 9 = p-Chlorphenol, 10 = 2,6-Xylenol, 11 = 2,3-Xylenol, 12 = 2,5-Xylenol, 13 = 3,4-Xylenol, 14 = 3,5-Xylenol, 15 = 2,4-Xylenol, 16 = p-Ethylphenol (aus Lit. [142]). a.u. = Absorption Units Full Scale.

keiten im Hinblick auf zu trennende Proben und organische Zusätze zum wäßrigen Puffer scheinen keinen Begrenzungen zu unterliegen, so daß die MEC eine vielseitig anwendbare Technik ist. Eine soeben erschienene Monographie<sup>[149]</sup> gibt einen guten Überblick über die breiten Einsatzmöglichkeiten der MEC.

#### 4.6. Isotachophorese (ITP)

Entsprechen die bisher beschriebenen elektrophoretischen Trennverfahren in Kapillaren der Elutionschromatographie (diskontinuierliche Probenaufgabe, konstante Eluentenzusammensetzung, unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Probenbestandteile), so entspricht die ITP<sup>[150]</sup> der Verdrängungschromatographie. In beiden Fällen wandern alle Probenbestandteile mit der gleichen Geschwindigkeit. Die ITP wurde schon vor vielen Jahren beschrieben und wurde damals in Teflonschlüuchen durchgeführt. Wegen der Probleme bei der Auswahl geeigneter Elektrolyten vermochte sie sich aber als analytisches Verfahren nicht so richtig durchzusetzen. Bei der ITP gibt man die Probe zwischen zwei Elektrolyten mit unterschiedlicher Ionenbeweglichkeit auf, die so gewählt werden müssen, daß sie den Beweglichkeitsbereich der Probenbestandteile begrenzen. Üblicherweise hat der Leitelektrolyt die höchste und der Endeletrolyt die niedrigste Mobilität aller wandernden Ionen. Nach Erreichen des stationären Zustandes wandern alle Ionen gleicher

Ladung gleich schnell<sup>[151, 152]</sup>. In Abbildung 29 ist dies schematisch dargestellt und mit dem Potentialverlauf bei der CE verglichen. In jeder Zone herrscht bei der ITP eine andere Feldstärke. Innerhalb jeder Zone ist die Feldstärke konstant; sie ändert sich sprunghaft an der Zonengrenze. Bei der ITP werden daher stets nur Ionen gleichsinniger Ladung getrennt. Der Konzentrationsverlauf der Probenzonen lässt sich durch eine Rechteckfunktion darstellen. Die Zonen folgen wie bei der Verdrängungschromatographie unmittelbar aufeinander. Bei der Verwendung eines Leitfähigkeitsdetektors erhält man ein Stufensignal.

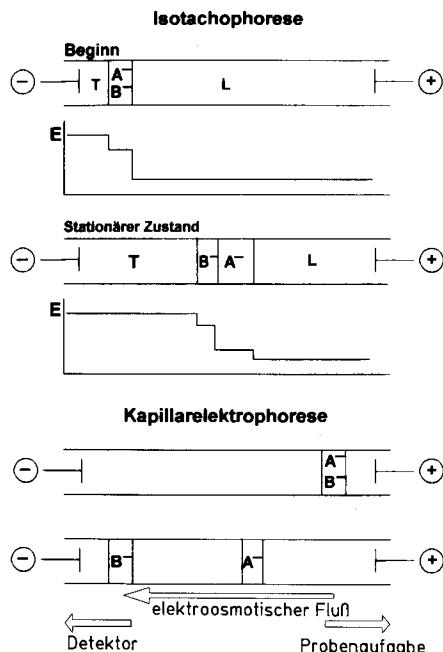


Abb. 29. Schematischer Vergleich zwischen ITP und CZE.

Die ITP wurde vornehmlich für die Trennung von anorganischen Ionen und von Carbonsäuren eingesetzt. Wegen Detektionsproblemen und der Schwierigkeit, bei Proben unbekannter Zusammensetzung geeignete Elektrolyte zu finden, konnte sich die ITP nicht durchsetzen. Insbesondere benötigt man z.B. bei Proteinen und anderen komplexen Gemischen auch geeignete Spacers, d.h. Elektrolyte mit einer Wanderungsgeschwindigkeit, die zwischen der der Probenbestandteile liegt, um die Zonen voneinander zu trennen. Wegen des Mangels an geeigneten Spacern bei der Analyse von Proteinen fand die ITP kaum Anwendung in der Bioanalytik. Die ITP führt, wie die Verdrängungschromatographie, zu einer Aufkonzentrierung verdünnter Proben, daher ist sie als Anreicherungsschritt vor einer CE-Trennung geeignet<sup>[153–156]</sup>. Damit lassen sich die Probleme bei der Dosierung relativ großer Volumina verdünnter Proben überwinden. Der Anreicherungsschritt kann in der CE-Trennkapillare direkt durchgeführt werden. In die mit dem Trennelektrolyten gefüllte Kapillare gibt man eine kurze Zone des Leitelektrolyten, dahinter wird die Probe injiziert. Probenvolumina im  $\mu\text{L}$ -Bereich können dabei dosiert werden. Hinter die Probe wird der normale Elektrolyt als Folgepuffer gegeben. Angereichert wird in Richtung Leitelektrolyt; Anreicherungsfaktoren um 100 wurden erzielt<sup>[153, 156]</sup>. Bei Proteinen hat die Zugabe von Ammoniumacetat zur Proben-

lösung<sup>[157]</sup> den gleichen Effekt: das Acetat-Ion wirkt dabei als Leitelektrolyt. Auch eine Kopplung zweier Apparaturen mit zwei UV-Detektoren, ITP zur Anreicherung und CE zur Trennung, wurde beschrieben<sup>[153]</sup>. Erreicht die aufkonzentrierte ITP-Zone den ersten Detektor, wird das System auf die CE-Trennung umgeschaltet. Die mit dieser Anordnung erhaltene Anreicherung mit nachfolgender CE-Trennung ist in Abbildung 30 gezeigt.

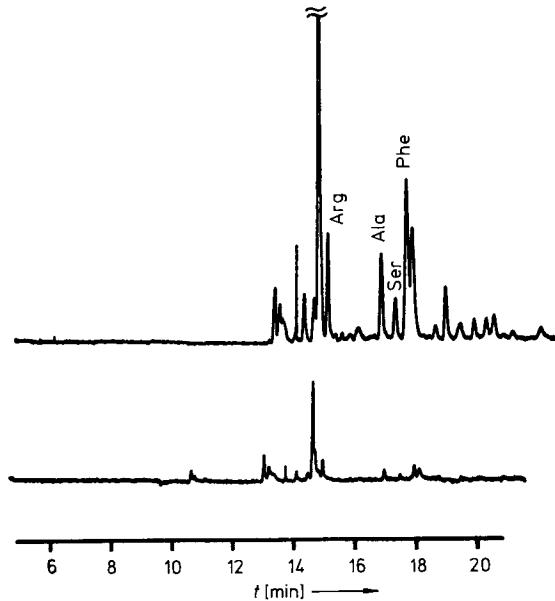


Abb. 30. Isotachophorese als Aufkonzentrierungsmethode in der CZE. Unteres Elektropherogramm: Fluoresceinisothiocyanat(Fitc)-derivatisierte Aminosäuren (ohne Aufkonzentrierung mit ITP), Injektion: 2 s/5 kV, Trennspannung 25 kV. Oberes Elektropherogramm: Kopplung einer ITP-Kapillare an die CZE-Kapillare. Spannung in der ITP: 10 kV, in der CZE: 25 kV, Injektion und Probe wie zuvor. Detektion: Laserinduzierte Fluoreszenz bei 488/514 nm (aus Lit. [153]).

#### 4.7. Elektrochromatographie (EC)

Zur Bandenverbreiterung in der HPLC tragen hauptsächlich das parabolische Strömungsprofil und die Diffusion der Probenmoleküle in und aus den Poren der stationären Phase bei. Durch Verkleinerung des Teilchendurchmessers des Packungsmaterials versucht man, diesen Beitrag zur Bandenverbreiterung zu vermindern – dem steht jedoch der benötigte hohe Druckabfall entgegen. Der EOF in gepackten Kapillaren ist im Idealfall unabhängig vom Teilchendurchmesser des Packungsmaterials. Darüber hinaus lässt das ppropfenförmige Strömungsprofil des EOF hohe Trennleistungen erwarten. Man versucht daher, die hohe Selektivität der HPLC mit gepackten Trennsäulen mit der Trennschärfe der CE zu kombinieren<sup>[21, 158]</sup>. Die zugrundeliegenden Trennprinzipien und stationären Phasen sind die der HPLC, jedoch beruht der Transport ionischer Komponenten auf elektrischer Migration. Es werden sehr kleine, unporöse Teilchen ( $1 \mu\text{m}$  Durchmesser) verwendet, um den Beitrag des Sorptionsprozesses zur Bandenverbreiterung niedrig zu halten. Die günstigen theoretischen Voraussagen sind bisher noch nicht experimentell zu verifizieren gewesen. Die erzielten reduzierten Bodenhöhen unterscheiden sich nur geringfügig von den in der HPLC erreichten<sup>[151]</sup>. Mit einer Ursache dafür dürfte das Detektionsproblem sein. Bei der CE detektiert man durch

Tabelle 5. Zusammenstellung der durch ein elektrisches Feld getriebenen Trennsysteme in Kapillaren.

Kapillarzonenelektrophorese	Kapillargel-elektrophorese	micellare elektro-kinetische Chromatographie	Elektro-chromatographie	Isotachophorese in Kapillaren	isoelektrische Fokussierung in Kapillaren
Kapillaren modifiziert/unmodifiziert	Kapillaren modifiziert und gel gefüllt	Kapillaren unmodifiziert	Kapillaren gepackt	Kapillaren unmodifiziert	Kapillaren modifiziert/unmodifiziert
EOF kontrolliert/unkontrolliert	EOF unterdrückt	EOF vorhanden	EOF vorhanden	EOF vorhanden	EOF unterdrückt/gering vorhanden
Trennung durch elektrophoretische Wanderung Einfluß des EOF	Trennung durch elektrophoretische Wanderung mit Siebeffekt kein Einfluß des EOF	Trennung durch elektrophoretische Wanderung und Verteilung der Probe zwischen Micelle und Puffer Einfluß des EOF	Trennung durch Wechselwirkungen mit der stationären Phase (LC-Trenn-system) EOF dient als Pumpe	Trennung durch elektrophoretische Wanderung Einfluß des EOF	Trennung in einem pH-Gradienten gemäß der isoelektrischen Punkte der Probe; wenn geringer EOF vorhanden, Mobilisierung der Probezone zum Detektor nicht nötig
viele Anwendungsmöglichkeiten für kleine und große geladene Moleküle	Trennung nach Molekülgöße bei DNA-Molekülen und mit SDS denaturierten Proteinen	breiter Anwendungsbereich bei kleinen, neutralen und geladenen Molekülen	Anwendungsbereiche wie in der HPLC (kaum praktische Bedeutung)	Anwendungsbereiche beschränkt; Aufkonzentrierung von verdünnten Lösungen vor der CE	Trennung von zwitterionischen Proben gemäß ihrer pI-Werte

die Trennkapillare, was bei den gepackten Säulen nicht mehr möglich ist, so daß die aus der Mikro-HPLC bekannten Probleme mit der Ankopplung des Detektors an die Trennkapillare zusätzlich auftreten.

## 5. Ausblick

In Tabelle 5 sind die besprochenen Trennsysteme, die auf elektrischer Migration beruhen, zusammengestellt. Das am häufigsten verwendete System ist sicher die CE in Quarzkapillaren (offene Röhren) mit unbeschichteter oder oberflächenmodifizierter Kapillarwand. Neutrale Moleküle können nach Zusatz eines Micellenbildners ebenfalls in diesem System getrennt werden.

Gegenüber der klassischen Elektrophorese hat die CE einige Vorteile:

- extrem hohe Trenneffizienz,
- einfache On-line-Detektion und Quantifizierung,
- einfache Handhabung,
- kurze Analysenzeiten,
- einfache Automatisierbarkeit,
- geringer Chemikalienverbrauch.

Gegenüber der HPLC besticht

- die hohe Trenneffizienz,
- die schnelle Gleichgewichtseinstellung bei Änderung der Analysenbedingungen,
- geringer Verbrauch an Lösungsmittel,
- kürzere Analysenzeiten,
- Suspensionen können direkt, ohne weitere Probenvorbereitung injiziert werden.

Die Nachteile der CE liegen bei

- der Detektion mit UV-Detektoren wegen der geringen Konzentrationsempfindlichkeit,
- der schlechten Reproduzierbarkeit und Kontrolle des elektroosmotischen Flusses,
- der Adsorption der Analyten an der Kapillaroberfläche, was stets mit Effizienzverlust verbunden ist.

Zum jetzigen Zeitpunkt stehen käufliche Geräte, teilweise bereits der zweiten Generation, zur Verfügung, womit ein

routinemäßiger Einsatz der CE möglich ist. Dies zeigt sich auch in der Art der Publikationen, wo langsam die Zahl der praxisorientierten Arbeiten die rein methodisch und theoretisch ausgerichteten übersteigt. Waren 1990 im Reviewband von *Analytical Chemistry*<sup>[83]</sup> nur 225 Arbeiten unter dem Stichwort „Capillary Electrophoresis“ aufgeführt, wobei mehr als die Hälfte auf die Jahre 1988 und 1989 entfielen, so enthält die Literaturübersicht für die beiden folgenden Jahre<sup>[84]</sup> bereits 523 Publikationen. Es konnte das Ziel dieses Übersichtsartikels nicht sein, eine vollständige Literaturübersicht zu liefern, vielmehr sollte ein – wenn auch geprägt durch persönliche Vorlieben – möglichst objektiver Überblick über die momentan erkennbaren Möglichkeiten und Grenzen der CE gegeben werden. Die CE ergänzt die etablierten Trennverfahren HPLC und GC, und ihre Vorteile liegen sicher dort, wo diese ihre Grenzen zeigen, nämlich bei der Trennung polarer und ionogener niedermolekularer Verbindungen sowie bei der Analyse von Proteinen und anderen Biopolymeren.

Wie die Geschichte der etablierten Trennverfahren zeigt, folgt nach den methodischen Arbeiten die breite Front der Arbeiten mit Anwendungen auf den verschiedensten Gebieten. Auch hier ist die Neigung der Analytiker zu erkennen, möglichst viele bekannte Trennungen nach dem neuen Analysenverfahren durchzuführen. Selbst polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe lassen sich mit der CE trennen (siehe Abschnitt 4.5); ob dies allerdings ein sinnvoller Ansatz ist, sei dahingestellt. Die weitere Entwicklung geht dann zur Kopplung der CE mit anderen Trennverfahren und mit spektroskopischen Techniken sowie der Massenspektrometrie.

Die ersten Bücher und Sammelwerke sind erschienen oder angekündigt<sup>[149, 159, 160]</sup>.

*Die eigenen Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie sowie durch Landes-Graduierten-Stipendien (J. Kohr, T. Schmitt) des Saarlandes gefördert. Wir danken den befreundeten Kollegen für einen intensiven und fruchtbaren Gedanken-austausch. T. Schmitt dankt Prof. B. L. Karger, Northeastern University, Boston, dafür, in seinem Laboratorium experiment-*

tell arbeiten zu dürfen. Den Firmen Beckman und Millipore danken wir für Geräte.

Eingegangen am 16. September 1992 [A 904]

- [1] P. König, *Actas Trab. Congr. Sud. Am. Chim. III Congr. Rio de Janeiro, 1937*, 2, 334; siehe auch D. von Klobusitzky, P. König, *Arch. Pathol.* **1939**, 192, 271.
- [2] G. Berzaz, *An. Asoc. Quim. Argent.* **1943**, 31, 96.
- [3] T. Wieland, *Angew. Chem.* **1950**, 62, 31.
- [4] E. L. Durrum, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 2943.
- [5] A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.* **1937**, 33, 527.
- [6] S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.* **1967**, 9, 122–219.
- [7] R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand. Chem. Incl. Metall. Ser.* **1974**, 123, 1.
- [8] F. E. P. Mikkens, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* **1979**, 169, 11.
- [9] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.* **1981**, 218, 209.
- [10] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298.
- [11] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *HRC & CC J. High. Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1981**, 4, 230.
- [12] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, (*Winston-Salem, N.C.*) *Clin. Chem.* **1981**, 27, 1551.
- [13] J. A. Lux, U. Häusig, G. Schomburg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 373–374.
- [14] J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, Wiley, New York, **1991**.
- [15] J. H. Knox, I. H. Grant, *Chromatographia* **1991**, 32, 317–328.
- [16] J. Kohr, H. Engelhardt, *J. Microcolumn Sep.* **1991**, 3, 491–495.
- [17] X. Huang, J. A. Luckey, M. J. Gordon, R. N. Zare, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 767.
- [18] W. R. Jones, P. Jandik, *J. Chromatogr.* **1991**, 546, 445.
- [19] J. C. Giddings, *Dynamics of Chromatography, Part I: Principles and Theory*, Dekker, New York, **1965**.
- [20] A. Guttman, A. S. Cohen, D. N. Heiger, B. L. Karger, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 137.
- [21] J. H. Knox, *Chromatographia* **1988**, 26, 329.
- [22] R. J. Nelson, A. Paulus, A. S. Cohen, A. Guttman, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 111–127.
- [23] M. J. Sepaniak, R. O. Cole, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 472.
- [24] M. J. Sepaniak, R. O. Cole, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1470.
- [25] M. J. Sepaniak, R. O. Cole, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 617.
- [26] X. Huang, W. Coleman, R. Zare, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 95.
- [27] T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa, *J. Chromatogr.* **1983**, 264, 385.
- [28] H. F. Yin, S. R. Motsch, J. A. Lux, G. Schomburg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1991**, 14, 282.
- [29] S. Honda, S. Iwasa, S. Fujiwara, *J. Chromatogr.* **1987**, 404, 313.
- [30] D. J. Rose, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 642–648.
- [31] H. Schwarz, M. Melera, R. Brownlee, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 129.
- [32] X. Huang, M. J. Gordon, R. A. Zare, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 375.
- [33] M. E. Schwartz, Waters Division of Millipore, Poster PT-44, 3rd Int. Symp. High Perform. Capillary Electrophoresis, San Diego, CA (USA), **1991**.
- [34] M. Deml, F. Foret, P. Bocek, *J. Chromatogr.* **1985**, 59, 320.
- [35] J. Tehrani, R. Macomber, L. Day, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1991**, 14, 10.
- [36] T. Tsuda, R. N. Zare, *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 103.
- [37] D. Burton, M. Sepaniak, M. Maskavinec, *Chromatographia* **1986**, 21, 583.
- [38] X. Huang, J. A. Luckey, M. J. Gordon, R. N. Zare, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 766.
- [39] K. Bächmann, T. Groh, I. Haumann, K.-H. Steeg, S. Engelmann in *Tagungsband zu den 11. Königsteiner Chromatographietagen 1991*, GIT-Verlag, Darmstadt, **1991**, S. 76.
- [40] D. S. Burgi, R. L. Chien, *J. Microcolumn Sep.* **1991**, 3, 199–202.
- [41] W. Beck, H. Engelhardt in *Tagungsband zu den 11. Königsteiner Chromatographietagen 1991*, GIT-Verlag, Darmstadt, **1991**, S. 40.
- [42] B. L. Karger, vorgetragen auf dem 3rd Int. Symp. High Perform. Capillary Electrophoresis, San Diego, CA, **1991**.
- [43] J. A. Lux, H. Yin, G. Schomburg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 145.
- [44] D. Y. Chen, H. P. Swerdlow, H. R. Harke, J. Z. Zhang, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 237–246.
- [45] H. Engelhardt in *Tagungsband zu den 11. Königsteiner Chromatographietagen 1991*, GIT-Verlag, Darmstadt, **1991**, S. 12.
- [46] G. Bruin, G. Stegeman, A. Van Asten, X. Xu, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 163–181.
- [47] J. Lindevogel, P. Sandra, L. C. Verhagen, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 295.
- [48] S. Kobayashi, T. Ueda, M. Kikumoto, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 179.
- [49] J. Romano, P. Jandik, W. R. Jones, P. E. Jackson, *J. Chromatogr.* **1991**, 546, 411.
- [50] F. Foret, S. Fanali, A. Nardi, P. Bocek, *Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.)* **1990**, 11, 780.
- [51] W. Beck, H. Engelhardt, *Chromatographia* **1992**, 33, 313.
- [52] G. Bondoux, P. Jandik, W. Jones, *J. Chromatogr.* **1992**, 602, 79–88.
- [53] M. Koberda, M. Konkowski, P. Youngberg, W. Jones, A. Weston, *J. Chromatogr.* **1992**, 602, 235–240.
- [54] P. Jandik, W. R. Jones, *J. Chromatogr.* **1991**, 546, 431.
- [55] T. Garner, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1991**, 62, 2198.
- [56] L. Gross, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 427.
- [57] E. S. Yeung, W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 275A.
- [58] C. Haber, I. Silvestri, S. Röösli, W. Simon, *Chimia* **1991**, 45, 117.
- [59] F. E. P. Mikkens, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* **1979**, 169, 11.
- [60] M. Ackermans, F. M. Everaerts, J. L. Beckers, *J. Chromatogr.* **1991**, 549, 335.
- [61] X. Huang, R. Zare, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2193.
- [62] X. Huang, R. Zare, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2193.
- [63] X. Huang, R. Zare, S. Sloss, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 189.
- [64] X. Huang, T. Pang, M. Gordon, R. Zare, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2747.
- [65] R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 258.
- [66] C. Engstrom-Silverman, A. G. Ewing, *J. Microcolumn Sep.* **1991**, 3, 141.
- [67] A. G. Ewing, A. Wallingford, T. Oleksirowicz, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 292A–294A, 296A, 298A, 300A–303A.
- [68] R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 1972–1975.
- [69] J. Loo, H. R. Udseth, R. Smith, *J. Mikrocol. Sep.* **1989**, 1, 5, 225.
- [70] L. Hernandez, J. Escalona, N. Joshi, N. Guzman, *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 183–196.
- [71] R. Smith, H. Udseth, C. Barinaga, C. Edmonds, *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 197–208.
- [72] J. A. Loo, H. K. Jones, H. Udseth, R. Smith, *J. Microcolumn Sep.* **1989**, 1, 5, 223.
- [73] C. Chen, M. Morris, *Appl. Spectrosc.* **1988**, 42, 515–518.
- [74] S. Pentoney Jr., R. Zare, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1643.
- [75] P. Christensen, E. Yeung, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1344–1347.
- [76] C. Chen, T. Demana, S. Huang, M. Morris, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 1593.
- [77] J. Wu, T. Odake, T. Katimori, T. Sawada, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2216.
- [78] S. Honda, S. Iwase, A. Makino, S. Fujiwara, *Anal. Biochem.* **1989**, 176, 73–77.
- [79] S. Wu, N. Dovichi, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 141–156.
- [80] J. Green, J. Jorgenson, *HRC & CC J. High. Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1984**, 7, 529–531.
- [81] B. W. Wright, G. A. Roos, R. D. Smith, *J. Microcolumn Sep.* **1989**, 1, 85–89.
- [82] D. Perrett, G. Ross, Poster M4 auf dem 4th Int. Symp. High Perform. Capillary Electrophoresis, Amsterdam, **1992**.
- [83] W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 403R–414R.
- [84] W. G. Kuhr, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 389R–407R.
- [85] A. E. Vordran, P. J. Oefner, H. Scherz, G. K. Bonn, *Chromatographia* **1992**, 33, 163–168.
- [86] H. H. Lauer, D. McManigill, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 166–170.
- [87] J. S. Green, J. W. Jorgenson, *J. Chromatogr.* **1989**, 478, 63–70.
- [88] M. Bushey, J. Jorgenson, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 301–310.
- [89] J. A. Bullock, L. C. Yuan, *J. Microcolumn Sep.* **1991**, 3, 241–248.
- [90] Waters Application Note 1991, Waters Division of Millipore.
- [91] J. K. Towns, F. E. Regnier, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1126–1132.
- [92] A. Emmer, M. Jansson, J. Roerade, *J. Chromatogr.* **1991**, 547, 544–550.
- [93] E. Kenndler, K. Schmidt-Beiwil, *J. Chromatogr.* **1991**, 545, 397–402.
- [94] J. Jorgensen, K. Lukacs, *Science* **1983**, 222, 266–272.
- [95] A. Balchunas, M. Sepaniak, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1466–1470.
- [96] A. Dougherty, C. Woolley, D. Williams, D. Swaile, R. Cole, M. Sepaniak, *J. Liq. Chromatogr.* **1991**, 14, 907–921.
- [97] M. Sepaniak, D. Swaile, A. Powell, R. Cole, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 679.
- [98] G. Bruin, J. Chang, R. Kuhlman, K. Zegers, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* **1989**, 471, 429–436.
- [99] G. Bruin, R. Huisden, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 339–349.
- [100] R. McCormick, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2322–2328.
- [101] S. Swedberg, *Anal. Biochem.* **1990**, 185, 51–56.
- [102] Y.-F. Maa, K. Hyver, S. Swedberg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1991**, 14, 65.
- [103] S. Hjerten, *J. Chromatogr.* **1985**, 347, 191–197.
- [104] S. Hjerten, K. Ellenbring, F. Kilar, J. Liao, *J. Chromatogr.* **1987**, 403, 47–61.
- [105] K. Cobb, V. Dolnik, M. Novotny, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2478–2483.
- [106] M. Strega, A. Lagu, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 1233–1236.
- [107] C. Bolger, M. Zhu, R. Rodriguez, T. Wehr, *J. Liq. Chromatogr.* **1991**, 14, 895–906.
- [108] F. Regnier, J. Towns, *J. Chromatogr.* **1990**, 516, 69–78.
- [109] D. Bentrop, J. Kohr, H. Engelhardt, *Chromatographia* **1991**, 32, 171–178.
- [110] S. Terabe, H. Utsumi, K. Otsuka, T. Ando, T. Inonata, S. Kuze, Y. Hanaoka, *HRC & CC J. High. Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1986**, 9, 666.
- [111] J. Lux, H. Yin, G. Schomburg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 145.
- [112] S. Mayer, V. Schurig, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1992**, 15, 129–131.
- [113] J. Kohr, Dissertation, Saarbrücken, **1992**.
- [114] P. C. Righetti, *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications*, Elsevier, Amsterdam, **1983**.

- [115] P. G. Righetti, *Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology*, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- [116] P. G. Righetti, *Sep. Purif. Methods* **1975**, *4*, 23.
- [117] B. J. Radola in *Isoelectric Focusing* (Hrsg.: N. Catsimpoolas), Academic Press, New York, **1976**, S. 119 ff.
- [118] A. Chrambach, N. Y. Nguyen in *Electrokinetic Separation Methods* (Hrsg.: P. G. Righetti, C. J. van Oss, J. W. Vanderhoff), Elsevier, Amsterdam, **1979**, S. 337–368.
- [119] S. Hjerten, *J. Chromatogr.* **1985**, *347*, 191.
- [120] S. Hjerten, J. L. Liao, *Protides Biol. Fluids* **1986**, *34*, 727.
- [121] S. Hjerten, K. Ellenbring, F. Kilar, J. L. Jiao, A. J. C. Chen, C. J. Siebert, M. D. Zhu, *J. Chromatogr.* **1987**, *403*, 47.
- [122] F. Kilar, S. Hjerten, *Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.)* **1989**, *10*, 23.
- [123] J. R. Mazzeo, I. S. Krull, *Anal. Chem.* **1992**, *63*, 2852.
- [124] R. Nelson, A. S. Cohen, R. S. Rush, B. L. Karger, Beckman Application Data, Separation of Proteins by IEF Capillary Electrophoresis, **1991**.
- [125] L. M. Smith, *Nature* **1991**, *349*, 812–813.
- [126] A. S. Cohen, D. R. Najarian, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 49.
- [127] A. S. Cohen, D. R. Najarian, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 59–60.
- [128] P. Bocek, A. Chrambach, *Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.)* **1992**, *13*, 18–31.
- [129] M. Stregé, A. Lagu, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1233.
- [130] S. R. Motsch, M. H. Kleemäß, G. Schomburg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1991**, *14*, 628.
- [131] D. N. Heiger, A. S. Cohen, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 33.
- [132] H. F. Yin, J. A. Lux, G. Schomburg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 625.
- [133] H. F. Yin, M. H. Kleemäß, J. A. Lux, G. Schomburg, *J. Microcolumn Sep.* **1991**, *3*, 331.
- [134] J. A. Lux, H. F. Yin, G. Schomburg, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1990**, *13*, 437.
- [135] S. Nathakarnkitkool, P. J. Öfner, G. Bartsch, M. A. Chin, G. K. Bonn, *Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.)* **1992**, *13*, 18–31.
- [136] J. Sudor, F. Foret, P. Bocek, *Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.)* **1991**, *12*, 1056–1058.
- [137] T. Schmitt, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, **1991**.
- [138] S. Wicar, M. Vilenchik, A. Belenkii, A. S. Cohen, B. L. Karger, *J. Microcolumn Sep.* **1992**, *4*, 339.
- [139] M. Stregé, A. Lagu, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1233–1236.
- [140] K. Ganzler, K. S. Greve, A. S. Cohen, B. L. Karger, A. Guttmann, N. C. Cooke, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2665.
- [141] A. S. Cohen, B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **1987**, *397*, 409–417.
- [142] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111–113.
- [143] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 834–841.
- [144] A. G. Ewing, A. Wallingford, *Adv. Chromatogr.* **1989**, *29*, 1.
- [145] S. Terabe, M. Shibata, Y. Miyashita, *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 403.
- [146] K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr.* **1990**, *515*, 221–226.
- [147] A. Dobashi, T. Ono, S. Hard, J. Yamaguchi, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1984.
- [148] S. Terabe, Y. Miyashita, O. Shibata, E. Barnhaut, C. Alexander, B. Patterson, B. L. Karger, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 23–31.
- [149] J. Vindevogel, P. Sandra, *Introduction to MEC in Chromatographic Methods*, Hüthig, Heidelberg, **1992**.
- [150] Tagungsband: 7th Int. Symp. on CE and ITP (*J. Chromatogr.* **1991**, *545*, 2).
- [151] *New Directions in Electrophoresis*, (Hrsg.: J. W. Jorgenson, N. Philips), (ACS Symp. Ser. **1987**, 33).
- [152] *Analytical Isotachophoresis*, (Hrsg.: P. Bocek, M. Deml, P. Gebauer, V. Dolník, B. J. Radola), VCH Publishers, New York, **1988**.
- [153] D. S. Steghehuis, H. Irth, U. R. Tjaden, J. Van der Greef, *J. Chromatogr.* **1991**, *538*, 393–402.
- [154] D. Kaniansky, J. Marak, *J. Chromatogr.* **1990**, *498*, 191.
- [155] V. Dolník, K. A. Cobb, M. Novotny, *J. Microcolumn Sep.* **1990**, *2*, 127.
- [156] L. Krivankova, F. Foret, P. Bocek, *J. Chromatogr.* **1991**, *545*, 307.
- [157] B. L. Karger, vorgetragen auf dem 16th Int. Symp. Column Liq. Chromatogr., Baltimore (USA), **1992**.
- [158] J. H. Knox, I. Grant, *Chromatographia* **1987**, *24*, 135–143.
- [159] N. Guzman, *Capillary Electrophoresis*, Dekker, im Druck.
- [160] S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis* (*J. Chromatogr. Libr.* **1992**, 52).
- [161] **Anmerkung der Redaktion:** Zum Thema dieses Aufsatzes veranstaltet die GDCh einen Fortbildungskurs unter Leitung von Professor Engelhardt. Auskünfte hierüber erteilt die GDCh-Geschäftsstelle (Varrentrappstr. 40–42, W-6000 Frankfurt am Main 90, Telefax: 069/791-7475) oder Professor Engelhardt.