

Direktkopplung von Kapillarelektrophorese und ^1H -NMR-Spektroskopie

Klaus Albert*

Als neues Trennverfahren findet die Kapillarelektrophorese^[1, 2] (CE) als Ergänzung zur Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zunehmendes Interesse. Gegenüber den bisherigen konventionellen Elektrophoreseverfahren bietet die Kapillarelektrophorese den Vorteil, daß durch die Verwendung von Kapillaren mit Durchmessern von 25–75 μm die bei der elektrophoretischen Trennung in einer Elektrolytlösung auftretende Joulesche Wärme direkt an die Umgebung abgeführt werden kann. Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf den unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der zu trennenden, geladenen Probenmoleküle in einem elektrischen Feld. Bei Spannungen von 10 000–50 000 V und Stromstärken von 10–50 μA gelingt eine CE-Trennung schon innerhalb von 5–30 Minuten. Dies macht das Trennverfahren für Anwendungen im Bereich der Biopolymere (Peptide, Proteine, Oligonucleotide) und auch in anderen Bereichen der Naturstoffchemie zunehmend interessant. In einer Variante dieser Trennmethode, der micellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie (MECC), werden der Elektrolytlösung geladene Micellenbildner zugefügt, die als pseudostationäre Phase dienen. Auf diese Weise können auch neutrale Moleküle getrennt werden.

In der Praxis erfolgt die Trennung von Substanzgemischen in 30–80 cm langen offenen oder gelgefüllten Fused-silica-Kapillaren bei Fließgeschwindigkeiten im Nanoliter-pro-Sekunden-Bereich. Die beiden Enden einer Kapillare tauchen in mit Puffer gefüllte Vorratsgefäße ein, und das elektrische Feld wird von einem Hochspannungsnetzgerät erzeugt, das über zwei Elektroden mit den Puffergefäßen verbunden ist (Abb. 1). Die Trennung ist abhängig von der Stärke des elektrischen Feldes, der

Temperatur, der Zusammensetzung des Puffers, dem pH-Wert, der Ionenstärke, der Viskosität und den Oberflächeneigenschaften der Kapillare. Die Substanzmengen liegen im pg- bis in den unteren ng-Bereich. Die einfachste Form der Probenaufgabe in die Kapillare erfolgt hydrostatisch durch Anheben des Puffergefäßes auf der Injektionsseite.

Zur Detektion wird bei Verwendung von UV/Vis-Photometern die Kapillare direkt durchstrahlt. Eine der aussagekräftigsten Methoden zur Charakterisierung der mit CE getrennten Verbindungen ist die Direktkopplung mit der Elektrospray-Massenspektrometrie. Diese Technik wurde beispielsweise bei Peptiden und Proteinen im Massenbereich bis zu mehreren Kilodalton^[3], bei modifizierten Oligonucleotiden^[4] und bei der Analyse von Pflanzenpigmenten^[5, 6] eingesetzt. Zur eindeutigen Strukturbestimmung der getrennten Substanzen ist jedoch der Einsatz der NMR-Spektroskopie unerlässlich.

Die NMR-Spektroskopie hat in bezug auf die Anwendung zwei gravierende Nachteile: Die im Vergleich zu anderen Untersuchungsverfahren geringe Empfindlichkeit erfordert große Probenmengen, und es wird eine relativ hohe Substanzreinheit benötigt, da Signalüberlagerungen zu Fehlinterpretationen führen können. Trotz der Unempfindlichkeit der NMR-Untersuchungsmethode wurden erste Arbeiten zur direkten Kopplung zwischen HPLC und NMR-Spektroskopie bereits in den achtziger Jahren durchgeführt^[7–9]. Die HPLC-NMR-Kopplung^[10–12] ebenso wie die Kopplung der Chromatographie mit überkritischen Fluiden (SFC) und der NMR-Spektroskopie^[13] erfährt jedoch erst in den letzten Jahren als arbeits- und zeitsparende Untersuchungsmethode eine breitere Anwendung.

In der Praxis können zwei unterschiedliche Untersuchungstechniken eingesetzt werden. Im On-line-Durchflußverfahren wird mit einer minimalen Zeitauflösung von bis zu acht Sekunden die chromatographische Trennung über die jeweiligen ^1H -NMR-Spektren kontinuierlich verfolgt. Das Detektionslimit liegt bei Verwendung eines 600-MHz-Geräts und einer 120- μL -Meßzelle für eine niedermolekulare Verbindung (300 Dalton) bei 500 ng. Im Stopped-flow-Verfahren ist unter Verwendung inverser $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ -Durchflußmeßköpfe die Durchführung zweidimensionaler Zuordnungsexperimente möglich.

Ein großer Vorteil der Kombination von chromatographischen Trennverfahren wie der HPLC und der SFC mit der ^1H -NMR-Spektroskopie liegt in der Möglichkeit, das Chromatogramm in Konturform darzustellen. Dabei wird die ^1H -NMR-chemische Verschiebung gegen die Retentionszeit der chromatographischen Trennung aufgetragen. Durch die Einführung der zweiten Dimension, der ^1H -NMR-chemischen Verschie-

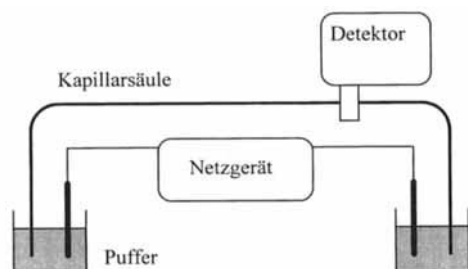


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Gerätes zur Kapillarelektrophorese.

[*] Priv.-Doz. Dr. K. Albert
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. + 7071/29-5246

bung, ist auch bei nicht getrennten Peaks im Gegensatz zur herkömmlichen UV-Registrierung eine sichere und eindeutige Signalzuordnung möglich. Die Nachteile aus chromatographischer Sicht, d. h. die benötigten Substanzmengen sowie die verwendeten großen Detektorvolumina, werden dadurch relativiert.

Zur HPLC-NMR- und SFC-NMR-Kopplung wurden spezielle Durchflußmeßköpfe entwickelt, die sich von konventionellen Meßköpfen hauptsächlich durch die Anordnung der NMR-Meßspule unterscheiden (Abb. 2). Im Gegensatz zu herkömmlichen NMR-Meßköpfen (Abb. 2a) ist die Spule direkt auf das Glasrohr der Durchflußzelle aufgebracht (Abb. 2b). Hierdurch verbessert sich das Verhältnis von Spulenvolumen zum Probenvolumen, der sogenannte Füllfaktor, woraus wiederum eine verbesserte Signalempfindlichkeit resultiert. Der

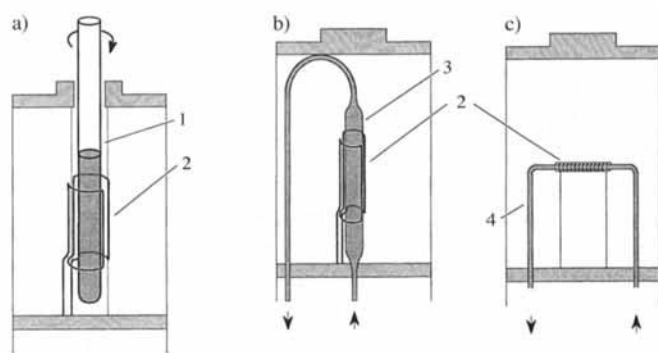


Abb. 2. Meßanordnungen zur Aufnahme von NMR-Spektren. a) Konventioneller Meßkopf mit rotierendem Probenröhrchen. b) Durchflußprobenkopf zur HPLC-NMR- und SFC-NMR-Kopplung. c) Meßzelle zur CE-NMR-Kopplung. Die Pfeile geben die Fließrichtung des Eluenten an. 1 = NMR-Röhrchen mit 5-mm-Durchmesser; 2 = Sende-/Empfangsspule; 3 = Durchflußzelle; 4 = Durchflußkapillare.

Nachteil dieser Konzeption liegt darin, daß die Rotation des Probenröhrchens nicht möglich ist. Eine Alternative zu diesem Durchfluß-Probenkopfdesign zeigt die in Abbildung 2c dargestellte Meßanordnung. Hier liegt die NMR-Meßspule senkrecht zu den Magnetfeldlinien des Kryomagneten; diese Solenoid-Meßspulenanordnung kann im Vergleich zu der in Abbildung 2b gezeigten Doppelsattel-Helmholtz-Anordnung zur weiteren NMR-Signal-Empfindlichkeitssteigerung führen. Nachteilig bei dieser Anordnung ist die Ausmittelung von Magnetfeldinhomogenitäten, da die zur Homogenisierung verwendeten Shimssysteme auf optimale Homogenität entlang der Rotationsachse des NMR-Röhrchens (in z-Richtung parallel zu den Magnetfeldlinien) und nicht senkrecht dazu (xy-Richtung) ausgelegt sind. Das Meßvolumen beläuft sich bei einem konventionellen NMR-Röhrchen (5 mm Durchmesser) auf ca. 250 μ L, die bislang zur HPLC-NMR- und SFC-NMR-Kopplung verwendeten Detektorvolumina liegen im Bereich von 40–120 μ L.

Über den Einsatz von Meßzellen im nL-Bereich zur Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der ^1H -NMR-Spektroskopie wurde nun erstmals von Sweedler et al.^[14, 15] berichtet. Die NMR-Detektionszelle wurde durch das Aufwickeln einer Mikroschule um eine Fused-Silica-Kapillare mit 75 μ m Innendurchmesser hergestellt; das so definierte Detektionsvolumen beläuft sich auf 5 nL. Unter Verwendung einer Kapillare mit 350 μ m Außendurchmesser wurden NMR-Linienbreiten in der Größen-

ordnung von 7–11 Hz erhalten. Das Detektionslimit beläuft sich nach Aussage der Autoren auf 35 ng Arginin bei einer Meßzeit von 1 min. Sie berichten über eine CE-NMR-on-line-Trennung von Arginin, Glycin und Cystein unter Verwendung einer Einspritzmenge von 20 nL und 0.7–0.8 M Substanzkonzentrationen. Die absolut injizierten Mengen liegen im 1–4 μ g-Bereich.

Die Autoren diskutieren ausführlich die unterschiedlichen Parameter, die die NMR-Linienbreite beeinflussen. Neben der Fließgeschwindigkeit und dem durch den elektrophoretischen Strom in der Kapillare induzierten Magnetfeld sind dies vor allem Suszeptibilitätsänderungen, die durch das verwendete Design der NMR-Mikroschule bedingt sind. Interessanterweise verändert sich, in Abhängigkeit von der Stromstärke, die NMR-Signalthalbwertsbreite. In der 5-nL-Meßzelle liegt bei einer vorgegebenen Spannung von 6 kV und einer Stromstärke von 15 μ A die minimale Halbwertsbreite von 12 Hz vor. Den stärksten Einfluß auf die NMR-Linienbreite üben die Suszeptibilitätseinflüsse der Meßspule aus. Durch die Vergrößerung des Spulendurchmessers gelingt die Verringerung der Signalthalbwertsbreite von über 200 auf unter 20 Hz. Eine weitere Verbesserung der NMR-Auflösung auf Werte von wenigen Hz zur Ermittlung von ^1H -Kopplungskonstanten ist jedoch nicht möglich. Die Verbesserung des Spulendesigns soll hier Abhilfe schaffen.

Betrachtet man die von den Autoren beschriebenen NMR-Auflösungs- und Empfindlichkeitswerte, so wird klar, daß ihre wesentliche Entwicklung hauptsächlich darauf beruht, daß die NMR-Detektion im Nanoliter-Bereich durchgeführt wurde. Über den praktischen Nutzen der beschriebenen CE-NMR-Kopplung kann man jedoch geteilter Meinung sein. Durch den Wegfall der stereochemischen Information entfällt einer der wichtigsten Gründe zur Durchführung von On-line-Kopplungsexperimenten mit der NMR-Spektroskopie als Detektionsverfahren. Ein weiteres Argument ist die Anwendungsbreite der beschriebenen Trennung. Die CE wird hauptsächlich zur Trennung von Biomolekülen eingesetzt. Deren NMR-spektroskopische Untersuchung ist jedoch nur im Stopped-flow-Meßverfahren möglich. Eine praktikable CE-NMR-on-line-Technik müßte daher in Analogie zur HPLC-NMR- und SFC-NMR-Kopplung mit einer zu Routineaufnahmebedingungen vergleichbaren NMR-Auflösung im Bereich von 1–2 Hz beide Meßverfahren ermöglichen.

Sweedler et al. haben gezeigt, daß eine CE-NMR-Kopplung unter Verwendung von Nanoliter-NMR-Detektionszellen möglich ist. Der beschrittene Weg der Miniaturisierung muß jedoch weiter dahingehend ausgebaut werden, daß auch unter den beschriebenen Meßbedingungen die NMR-Auflösung annähernd die Werte der konventionellen Aufnahmetechnik erreicht. Sobald dies der Fall ist, werden auch in Hinblick auf die automatisierte Spektrenaufnahme weitere NMR-Geräteentwicklungen folgen.

Stichworte: Analytische Methoden · Kapillarelektrophorese · NMR-Spektroskopie

[1] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1298–1302; *Science* **1983**, 222, 266–272.

[2] J. A. Lux, U. Häusig, G. Schomburg, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1990**, 13, 373–374; H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 659–680; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 629–649; H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese*, Vieweg, Wiesbaden, **1994**.

- [3] H.-J. Gaus, A. Beck-Sickinger, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1399–1405.
 [4] E. Bayer, *Mod. Methods Protein Nucleic Acid Res.* **1990**, *3*, 133–148.
 [5] W. E. Gläßgen, H. U. Seitz, J. W. Metzger, *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, *21*, 271–277.
 [6] S. Heuer, S. Richter, J. W. Metzger, V. Wray, M. Nimtz, D. Strack, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 761–767.
 [7] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller, *J. Chromatogr.* **1979**, *186*, 497–507.
 [8] H. C. Dorn, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 747A–758A.
 [9] D. A. Laude, Jr., C. L. Wilkins, *Trends Anal. Chem.* **1986**, *9*, 230–235.
 [10] K. Albert, E. Bayer in *HPLC Detection Newer Methods* (Hrsg.: G. Patonay), VCH, New York, **1992**, S. 197.
 [11] M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvorsak, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 327–330.
 [12] J. K. Roberts, R. J. Smith, *J. Chromatogr. A* **1994**, *677*, 385–389.
 [13] K. Albert, U. Braumann, L.-H. Tseng, G. Nicholson, E. Bayer, M. Spraul, M. Hofmann, C. Dowle, M. Chippendale, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3042–3046.
 [14] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7929–7930.
 [15] N. Wu, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Magin, J. V. Sweedler, *Anal. Chem.* **1994**, *22*, 3849–3857.

Die räumliche Struktur von Hammerhead-Ribozymen**

Georg Sczakiel*

Seit vor etwa 13 Jahren Ribonucleinsäuren (RNA) entdeckt wurden, die chemische Reaktionen katalysieren können^[1], wurden diese sogenannten Ribozyme intensiv erforscht. Ribozyme – RNA-Moleküle definierter Basensequenz und räumlicher Struktur – erkennen bestimmte RNA-Sequenzen (Substrate) basenspezifisch und spalten eine definierte Phosphodiester-Bindung eines gewissen Basentriplets. Bei natürlich vorkommenden Ribozymen ist dieser Schritt essentiell, wie etwa bei der Reproduktion (Replikation) bestimmter Satelliten-RNAs und Viroide^[2]. In diesen Fällen befinden sich Ribozym- und Substratsequenzen auf einem einzigen RNA-Strang, was zu einer intramolekularen Spaltung (In-cis-Spaltung) führt. Ribozyme können jedoch auch intermolekular wirken (In-trans-Spaltung)^[3], so daß sie maßgeschneidert werden können, um beliebige Substrat-RNAs selektiv zu spalten und damit biologisch zu inaktivieren. Dies erklärt die große Bedeutung, die dieser Substanzklasse heute von Molekularbiologen und Biochemikern beigemessen wird und die langfristig eine therapeutische Anwendung in vivo als denkbar erscheinen läßt^[4].

Eines der am besten untersuchten Ribozyme ist das sogenannte Hammerhead-Ribozym^[5], da zuerst im Avocado-Sunblotch-Viroid (ASBVd)^[6] gefunden wurde. In diesem natürlichen System dient die Ribozym-Aktivität dazu, die bei der Replikation als kovalent verknüpfte Multimere gebildeten Genome in einer intramolekularen Reaktion (In-cis-Spaltung) in die Einheitslänge zu spalten. Die Erkennung der Substrat-RNA mit dem spaltbaren Sequenzmotiv (Basentriplett) erfolgt über spezifische Basenwechselwirkungen zwischen Teilen des Ribozym- und Substratstrangs (Abb. 1). Diese 5'- und 3'-Sequenzen des Ribozyms formen zusammen mit komplementären Sequenzen der Substrat-RNA die Helices I und III des Hammerheads und können daher als Antisense-Sequenzen aufgefaßt werden.

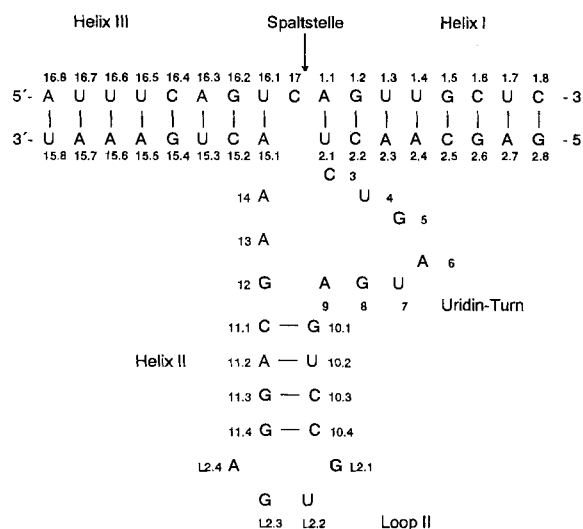


Abb. 1. Schematische Darstellung des Hammerheads mit der von Hertel et al. [21] eingeführten Nomenklatur.

Dazwischen wird die sogenannte katalytische Domäne gebildet, die aus den Strukturkomponenten Helix II, dem benachbarten Uridin-Turn sowie dem spaltbaren Basentriplett besteht. Durch diese strukturelle und funktionelle Domäne wird der katalytisch aktive Hammerhead gebildet, der das Zielmotiv spalten kann, wenn zusätzlich Metall-Ionen wie Mg^{2+} -Ionen vorhanden sind. Mindestens ein Mg^{2+} -Ion ist an der Spaltung der Phosphodiester-Brücke zwischen C17 und A1.1 stromabwärts des spaltbaren Basentriplets (G16.2, U16.1 und C17; Abb. 1) beteiligt, die durch einen nucleophilen Angriff des Sauerstoffatoms der 2'-Hydroxygruppe erfolgt. Die Freisetzung der 5'-Hydroxygruppe verläuft über ein Intermediat mit trigonal-bipyramidal um das zentrale Phosphoratom angeordneten Sauerstoffatomen und führt zu einem cyclischen 2',3'-Phosphodiester sowie zu einer freien 5'-Hydroxygruppe (Abb. 2). Die entscheidende Rolle der 2'-Hydroxygruppe wird dadurch verdeutlicht, daß Desoxyribose an der Schnittstelle die Spaltungsreaktion verhindert^[7].

[*] Priv.-Doz. Dr. G. Sczakiel
 Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie
 Deutsches Krebsforschungszentrum
 Im Neuenheimer Feld 242, D-69120 Heidelberg
 Telefax: Int. + 6221/424932
 e-mail: vir037@atv-fs.inet.dkfz-heidelberg.de

[**] Sigrid Eckardt, Matthias Homann und Volker Patzel danke ich für ihre kritischen Anmerkungen zum Manuskript.