

Trennen, Charakterisieren und Fraktionieren mit Nanolitermengen in der Kapillarelektrophorese*

Aran Paulus*

Die Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis, CE) hat sich in relativ kurzer Zeit fest als eine neue Analysenmethode mit breiten Anwendungsmöglichkeiten etabliert. Mit kommerziellen CE-Geräten (Abb. 1), die erst seit Ende 1988 erhält-

zeugt wird, erhält man in der CE ein pfropfenförmiges Flußprofil, das nicht zur Bandenverbreiterung führt und somit zu höheren Trennleistungen beiträgt. Die Zahl der theoretischen Trennstufen hängt lediglich von den Diffusionskoeffizienten der Analyten ab; es können mehrere Hunderttausend bis zu einigen Millionen sein. Bei einem Gesamtvolumen der Trennkapillare von einigen wenigen Mikrolitern beträgt das Injektionsvolumen einige Nanoliter. Man bezeichnet die CE deshalb auch als Nanotrenntechnik. Mit Feldstärken von 200 bis 500 V cm⁻¹ erreicht man Analysenzeiten zwischen 5 und 30 min.

Dem Massentransport durch den EOF überlagert ist die elektrophoretische Mobilität, die im elektrischen Feld die ionischen Bestandteile der Probe entsprechend ihrer Ladung zusätzlich beschleunigt oder abbremst. In dieser einfachsten Form der CE, der Kapillarzonenlektrophorese (Capillary Zone Electrophoresis, CZE), beruht die Trennung auf unterschiedlichen Ladungs-Massen-Verhältnissen der Probenbestandteile. Elektrophoretische Trennungen nach Molekülgröße, wie sie für DNA-Fragmente und Proteine wichtig sind, sind mit der CE ebenfalls möglich, wenn die Kapillare mit einem Siebmedium wie einem Gel oder einer Polymerlösung gefüllt ist. Die Kapillargelelektrophorese (Capillary Gel Electrophoresis, CGE) wird wegen der hohen Trenneffizienz und der Automatisierbarkeit besonders in der industriellen Biotechnologie für die Analytik von rekombinanten Proteinen und Antisense-Oligonucleotiden von Nutzen sein^[2].

Neutrale Probenbestandteile, die in der CZE mit dem EOF wandern, kann man durch den Zusatz einer micellenbildenden Komponente wie Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) auftrennen. SDS bildet eine quasistationäre Phase, die sich mit dem EOF bewegt^[3]. Die Auftrennung erfolgt anhand der Verteilungskoeffizienten zwischen der Pufferphase und der micellaren Phase. Man kann aber auch stationäre HPLC-Phasen in eine Kapillare füllen und chromatographische Wechselwirkungen im elektrischen Feld für Trennungen nutzen. Dieser Ansatz ist eine interessante Alternative zur Mikrosäulen-HPLC, die zur Zeit sehr aktiv als Elektrochromatographie mit den Vorteilen hoher Trennleistungen und Miniaturisierbarkeit verfolgt wird^[4].

Kommerzielle Geräte machen eine neue analytische Technik einerseits für viele Labors zugänglich, schreiben andererseits aber oft auch einen apparativen Standard fest. In der Folge wird die Mehrzahl der Anwender die Lösung ihrer spezifischen Probleme mit der erhältlichen Instrumentierung versuchen. Den-

Kapillarelektrophorese-System

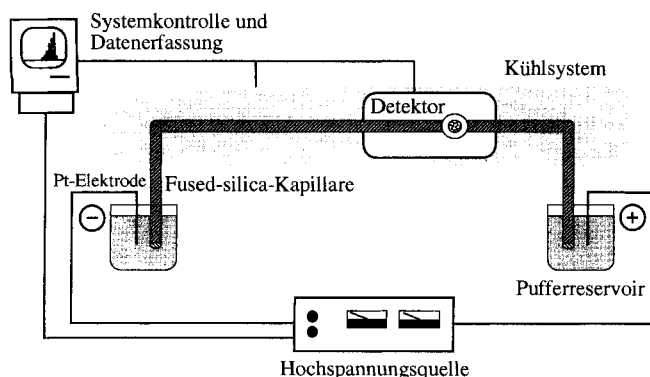


Abb. 1. Schematische Darstellung eines kommerziellen CE-Gerätes: Fused-silica-Kapillare: 50 bis 100 µm Innendurchmesser, 20 bis 50 cm Länge; Hochspannungsquelle: 0 bis ± 30 kV; Detektor: UV- oder Laser-induzierte Fluoreszenz; Temperaturkontrolle: 15–60 °C.

lich sind, kann man in Fused-silica-Kapillaren mit 50 bis 100 µm Durchmesser und 20 bis 50 cm Länge eine Vielzahl von analytischen Problemen lösen. Geladene wie ungeladene Probenbestandteile, von anorganischen Ionen über organische Moleküle bis zu komplexen Biopolymeren wie Peptiden, Proteinen, DNA-Fragmenten und Zuckern, lassen sich unter geeigneten Bedingungen durch CE trennen^[1]. Besonders die mit anderen Trennmethode nicht erreichbaren hohen Trennleistungen haben sehr zur Attraktivität der CE beigetragen. Aber auch die Miniaturisierbarkeit, die Trenngeschwindigkeit, die Automatisierbarkeit und die Flexibilität der Methode gehören zu den geschätzten Vorteilen. Bei der Mehrzahl der CE-Anwendungen werden puffergefüllte Kapillaren verwendet, in denen das elektrische Feld einen elektroosmotischen Fluß (EOF) erzeugt. Anders als in der HPLC, bei der durch Druck ein parabolisches Flußprofil er-

[*] Dr. A. Paulus
Ciba-Analytical Research, K-127.162
CH-4002 Basel (Schweiz)
Telefax: Int. +61/6 96-45 04
E-mail: 100064.242@Compuserve.com

noch ist die stürmische apparative Entwicklung in der CE noch nicht beendet, wie ein Blick in die Literatur des letzten Jahres bestätigt. Vor rund einem Jahr konnte über die Direktkopplung der CE mit der NMR-Spektroskopie berichtet werden^[6]. Mit einer 5-nL-NMR-Meßzelle, einer um eine Fused-silica-Kapillare gewickelten Mikrospule, wurden von CE-Fractionen online NMR-Spektren mit Signalbreiten von etwa 11 Hz erhalten. Der Autor kommentierte prophetisch: „Der beschriebene 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.“ Genau dies ist nun geschehen.

In einer neuen Arbeit berichten Sweedler et al.^[6], daß sie mit der gleichen Meßanordnung durch eine Stabilisierung des magnetischen Feldes um die Probe NMR-Signalbreiten von 0.6 Hz erreichen konnten. Durch Ausfüllen des Raumes zwischen Kapillare und Spalt mit Fluorinert FC-43, einer Substanz mit einer magnetischen Suszeptibilität zwischen denen von Kupfer und schwerem Wasser, konnten Inhomogenitäten des magnetischen Feldes unterdrückt werden. Dadurch erreichten die Autoren eine 130fache Verbesserung der Massensensitivität gegenüber konventionellen 5-mm-Probenröhrchen. Sogar 2D-COSY-Aufnahmen sind mit dieser Mikrozelle möglich. Mit Akquisitionszeiten von nur 1 min konnten noch 19 ng Saccharose, das entspricht 56 pmol, nachgewiesen werden.

Obwohl eine direkte Kopplung der NMR-Spektroskopie mit der CE in dieser Arbeit noch nicht beschrieben ist, scheint, was man vor zwei Jahren noch als Unmöglichkeit hingestellt hätte, nun denkbar: eine hochauflösende, schnelle Trennmethode mit einer informationsreichen Detektionsmethode zu koppeln. Eine CE-Bande, die einigen pg Probensubstanz entspricht, wandert in 10 bis 20 s am Detektionsfenster vorbei. Sicherlich sind sowohl die Akquisitionszeiten der NMR-Spektroskopie als auch die Empfindlichkeit noch eine Größenordnung zu schlecht. Aber eine funktionsfähige CE-NMR-Kopplung, die z.B. bei biologischen Proben Trennung und Strukturaufklärung direkt verbindet, ist nun eine fundierte Vision.

Die CE-Einsatzmöglichkeiten sind mit der Trennung und Charakterisierung eines Substanzgemisches aber noch nicht ausgeschöpft. In einer weiteren Arbeit, ebenfalls aus der Gruppe von Sweedler^[7], wurde gezeigt, wie man die miniaturisierten Dimensionen der CE für kinetische Messungen mit kleinsten Volumina nutzen kann. Anstatt eine Kapillare zu verwenden, wurden zwei Mikroskopdeckplättchen in einem Abstand von 40 µm zu einem rechtwinkligen Trennkanal mit zwei offenen Stirnseiten, die in ein Pufferreservoir eintauchen, zusammengeklebt. Dieser Aufbau ermöglicht eine kontinuierliche Probeninjektion aus einer Kapillare, die mit einem Mikropositionierer quer zur Trennrichtung an einer offenen Kanalseite vorbeigeführt wird. In die Probenkapillare wurden 200 nL einer Mischung aus zwei Aminosäuren und dem Derivatisierungsreagens Naphthalindicarbaldehyd gegeben, die innerhalb einer Minute zu fluoreszierenden Produkten reagieren. Da sich die Reaktionspartner im elektrischen Feld voneinander trennen und dadurch die Reaktion abbricht, kann man den zeitlichen Reaktionsverlauf als Funktion der Bewegung der Probenkapillare räumlich getrennt verfolgen. Auf diese Art können Geschwindigkeitskonstanten, auch wenn gleichzeitig mehrere, konkurrierende Prozesse ablaufen, mit einer Zeitauflösung von

etwa 1 s in nL-Volumina gemessen werden. Man kann sich vorstellen, damit biochemische Prozesse wie etwa die Bildung von Proteinen in zellulärer Umgebung direkt zu verfolgen.

Eine weitere wichtige instrumentelle Entwicklung in der CE zu noch mehr Miniaturisierung und Integration der Probenbehandlung ist die CE auf Mikrochips^[8]. Dabei werden in Glas- oder Quarzplatten durch lithographische Prozesse, wie sie in der Mikroelektronik verwendet werden, Kanäle eingätzt, deren Dimensionen denen von Fused-silica-Kapillaren gleichen. Wesentliche Vorteile der planaren oder integrierten CE sind die geringen Dimensionen mit kurzen Kanälen, die problemlose Verbindung von Kanälen für die Integration von Proben- und -nachbehandlung sowie die Möglichkeit, mehrere Kanäle parallel anzuordnen. Bei nur ca. 5 cm Länge des Trennkanals reichen mit 10 kV relativ niedrige Hochspannungswerte, um starke elektrische Felder von 2000 V cm^{-1} zu erzeugen. Da Trennleistung und Auflösung bei starken elektrischen Feldern bei zugleich kürzerer Analysenzeit besser sind, konnten auf einfache Weise Trennungen an 5000 theoretischen Böden pro Sekunde in weniger als einer (!) Minute durchgeführt werden^[9].

Verbindungen von Fused-silica-Kapillaren zu Probenvorbehandlungseinheiten oder für den Transfer der getrennten Probenbestandteile in nachgeschaltete Reservoirs sind nie frei von Totvolumina, wodurch die erreichte Trennleistung wieder verschlechtert wird. Auf einem Elektrophorese-Chip ist dieses Problem einfach zu umgehen: Das Layout der lithographischen Maske (Abb. 2) ermöglicht beliebige Kreuzungen ohne zusätzli-

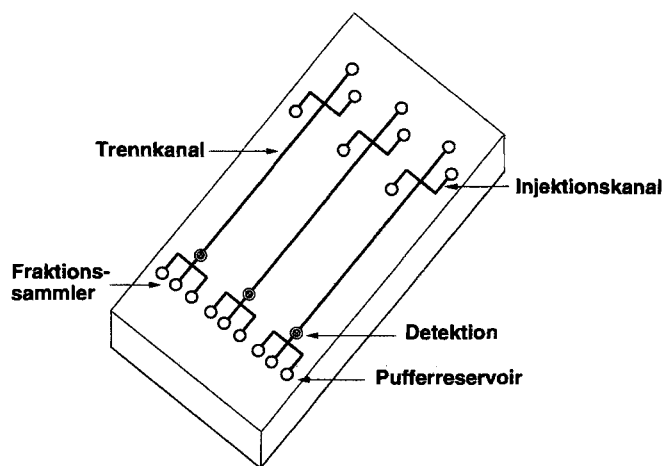


Abb. 2. Schematische Darstellung einer planaren integrierten CE auf Mikrochip. Kanaldimensionen: 10 µm tief, 30 µm weit, 6 cm lang; Chipdimensionen: 10 × 5 × 0.5 cm.

che Totvolumina. So konnte die Gruppe von Ramsey zeigen, daß sich auf einem Mikrochip die Vorsäulenderivatisierung von Aminosäuren mit Phthalaldehyd in einem Reaktionsvolumen von nur 1 nL einfach integrieren läßt^[10].

Das Ziel von Chemikern und Biochemikern ist nicht nur die Auftrennung und Charakterisierung komplexer Gemische, sondern sie wollen auch nach Möglichkeit einen bestimmten Probenbestandteil isolieren, um mit ihm weitere Untersuchungen und Reaktionen durchzuführen. Leider sind jedoch bei vielen Trennmethode gute Trenneigenschaften und präparative Mengen fast immer einander ausschließende Größen. Wie schon

erwähnt, kann man die in der CE üblichen nL-Volumina außerhalb der Kapillare nicht handhaben. Doch auch hier bietet die Mikrochip-CE Perspektiven. C. S. Effenhauser et al. konnten zeigen, wie auf einem Chip ein pL-Fraktionssammler funktionieren kann^[11]. Auf einem Mikrochip mit Verzweigung nach dem Detektionspunkt konnten die Autoren zuerst Antisense-Oligonucleotide in einem mit Polyacrylamidgel gefüllten Kanal trennen und danach durch kurzzeitigen Wechsel des elektrischen Feldes einen Teil der Probe, im Idealfall einen einzelnen Analyten, in ein Auffangreservoir leiten, abgetrennt von der übrigen Probe. Mit Fluoreszenztechniken sind Einzelmolekülnachweise schon heute möglich^[12]. Daraus ergeben sich auch hier faszinierende Perspektiven für einen Chemiker oder Biochemiker. Es ist denkbar, einzelne Moleküle auf einem Chip zu handhaben, sie zu verschieben und vielleicht sogar zur Reaktion zu bringen. Chemie mit einzelnen Molekülen könnte schon bald Realität werden.

Stichworte: Analytische Methoden · Kapillarelektrophorese · Miniaturisierung

- [1] Eine Auswahl von Übersichtsartikeln und Monographien: J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Science* **1983**, 222, 266–272; M. J. Gordon, X. Huang, S. L. Pentoney, Jr., R. N. Zare, *ibid.* **1988**, 242, 224–228; A. G. Ewing, R. A. Wal-

- lingford, T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.* **1989**, 61, 292–303; H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 659–680; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 629–649; S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis (J. Chromatogr. Libr. 52)* Elsevier, Amsterdam, **1992**; *Capillary Electrophoresis Technology (Chromatogr. Sci. Ser. 64)* (Hrsg.: N. A. Guzman) Dekker, New York, **1993**; *Handbook of Capillary Electrophoresis* (Hrsg.: J. P. Landers) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1993**.
- [2] B. L. Karger, A. S. Cohen, A. Guttman, *J. Chromatogr.* **1989**, 492, 585–614; G. J. M. Bruin, A. Paulus, *Anal. Methods Instrum.* **1995**, 2, 3–26.
- [3] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 113–116.
- [4] J. H. Knox, I. H. Grant, *Chromatographia* **1991**, 32, 317–328; N. W. Smith, M. B. Evans, *ibid.* **1994**, 38, 649–657; K. Schmeer, B. Behnke, E. Bayer, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 3656–3658; B. Behnke, E. Grom, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 207–213.
- [5] K. Albert, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 699–701; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 641–642.
- [6] D. L. Olson, T. L. Peck, A. G. Webb, R. L. Mangin, J. V. Sweedler, *Science* **1995**, 270, 1967–1969.
- [7] Y. M. Liu, J. V. Sweedler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8871–8872.
- [8] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz, *Science* **1993**, 261, 895–897; C. S. Effenhauser, A. Manz, H. M. Widmer, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2637–2642.
- [9] C. S. Effenhauser, A. Paulus, A. Manz, H. M. Widmer, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2949–2953.
- [10] S. C. Jacobson, R. Hergenroeder, A. W. Moore, Jr., J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 4127–4132.
- [11] C. S. Effenhauser, A. Manz, H. M. Widmer, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2284–2287.
- [12] M. Eigen, R. Riegler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5740–5746; S. Nie, D. T. Chiu, R. N. Zare, *Science* **1994**, 266, 1018–1020.

Übergitter, dünne Filme und kontrollierte Materialsynthese – ein mechanistischer Ansatz

Robert Schöllhorn*

Die Herstellung dünner Schichten entwickelt sich gegenwärtig schnell zu einer Schlüsseltechnologie; dünne Schichten finden unter anderem Anwendung als elektronische Materialien (Halbleiter, Supraleiter, Optoelektronik) und chemische Sensoren. Eine Vielfalt von Herstellungsverfahren, die von der Molekularstrahlepitaxie bis zur chemischen Gasphasenabscheidung reicht, steht für die Erzeugung von monomolekularen Schichten und Übergittern zur Verfügung. Während sich die physikalischen Interessen stark auf die Untersuchung neuer Quanteneffekte konzentrieren, die mit der speziellen Morphologie im Nanometerbereich verknüpft sind, eröffnen sich für die Festkörperchemie neue Wege zur kontrollierten Synthese komplexer metastabiler Strukturen. Ein besonders interessantes Beispiel stellt in diesem Zusammenhang der intelligente Ansatz in den neueren Arbeiten von D. C. Johnson und Mitarbeitern dar, der sich auf die Herstellung von elementmodulierten Übergangsmetallchalkogenidstrukturen bezieht und durch die Verwendung einer rationalen Synthesestrategie charakterisiert ist,

die auf einem topologischen Modell mit kinetischer Induktion und gerichtetem Grenzflächenwachstum beruht^[1–3].

Der Begriff Übergitter (Superlattice) ist in diesem Zusammenhang definiert als Mehrschichtendünnschichtsystem mit langreichweitiger struktureller Kohärenz senkrecht zu den Basalflächen, das über eine zeitlich sequentielle Abscheidung der Komponenten erhalten wird. Im Bereich der aus Molekülen aufgebauten Festkörper ist die Herstellung von geordneten Mehrschichtsystemen mit strukturell komplexen Untereinheiten inzwischen eine etablierte Technik (z.B. Langmuir-Blodgett- und Polymerfilme^[4,5]). Bei nichtmolekularen Festkörpern ist die Abscheidung von Mehrschichtsystemen gut bekannt für Metalle und Legierungen^[6], kovalente Halbleiter^[7] und Oxometallat-Supraleiter^[8]; hinsichtlich anderer Festkörperklassen steht nur wenig Information zur Verfügung. Das übliche Herstellungsverfahren ist die Abscheidung dieser Phasen unter Bedingungen, die direkt zum gewünschten Endprodukt führen.

Ein neuartiger Ansatz wird von Johnson et al. benutzt für die kontrollierte Synthese komplexer metastabiler Chalkogenidstrukturen mit Hilfe von Übergitter-Precursorphasen (Precursor = Vorläufer). Das Konzept beruht auf einem Zweistufenprozess. Im ersten Schritt wird durch modulierte sequentielle Abscheidung der entsprechenden chemischen Elemente eine Mehrlagenschicht erzeugt. Diese Struktur wird anschließend

[*] Prof. Dr. R. Schöllhorn
Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Sekr. C 2
Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, D-10623 Berlin
Telefax: Int. + 30/314-21106
E-mail: schoe@wap0209.chem.tu-berlin.de