

Schnelle chirale Trennungen in mikrofluidischen Strukturen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Martin Ludwig
geb. am 25.03.1966 in Hagen

eingereicht beim Fachbereich 08
der Universität Siegen

Siegen 2004

urn:nbn:de:hbz:467-944

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Wenclawiak

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. D. Belder

Tag der mündlichen Prüfung: 20.Dezember 2004

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Mai 2001 bis Mai 2004 am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Belder.

Herrn Prof. Dr. M. T. Reetz danke ich für die Aufnahme an das Planck-Institut für Kohlenforschung und für das Gewähren eines Promotionsstipendiums.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv-Doz. Dr. D. Belder für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis und für viele anregende Diskussionen und Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Wenclawiak danke ich für seine Bereitschaft, mich auch außerhalb der Universität-GH-Siegen zu unterstützen.

Meinen Kollegen Natalie Piehl und Philipp Schulze sowie der Abteilung Chromatographie danke ich für ihre stets freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Insbesondere gilt mein Dank Georg Breitenbruch, Frank Kohler und Sebastian Planckert, die durch ihr praktisches Mitwirken zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Der Firma Shimadzu danke ich für die Bereitstellung ihres MCE-2010-Systems und insbesondere Herrn Dr. Akihiro Arai (Kyoto, Japan), Frau Regina Roemling, sowie Herrn Robert Ludwig (Duisburg, Germany) für die freundliche Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich allen jenen Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Kohlenforschung meinen Dank aussprechen, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Für meine Eltern

Abstract

A modular instrument for high-speed microchip electrophoresis (MCE), equipped with a sensitive, variable wavelength fluorescence detection system, was developed and evaluated. The system was applied to achiral separations of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled amines as well as for achiral separation of rhodamines. At optimised conditions baseline separation of four FITC-labeled amines could be obtained in less than 50 s at a detection limit of 460 ppt (1 pM). Three rhodamines could be baseline-separated in less than 6 s at a detection limit of 240 ppt (500 pM). For demanding chiral separations of FITC-labeled amines the low resolution has to be improved. For this the channels of microfluidic glass chips have been coated with poly(vinyl alcohol) (PVA). Baseline separation of the enantiomers could be achieved in coated devices while it was not possible in uncoated chips. The high resolution enabled determination of small enantiomeric impurities with high precision (RSD=1.9 %) and trueness (R=0.9996). Applying a MCE-system with UV-detection chiral separations of numerous unlabeled drugs could be realised in less than a minute. The fastest separation could be performed in 2.5 s. Even the successful separation of a mixture of three chiral drugs could be performed in a single run in less than 11 s utilizing a separation length of only 12 mm.

Zusammenfassung

Zur Durchführung schneller Trennungen mit Hilfe der Mikrochipelektrophorese (MCE), wurde ein modulares MCE-Instrument aufgebaut und evaluiert. Das lampengestützte System ermöglicht eine variable Wellenlängenanregung bei hoher Detektionsempfindlichkeit. Auf diesem System wurden achirale Trennungen von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Aminen sowie von Rhodaminen durchgeführt. Unter optimierten Bedingungen wurde eine Basislinientrennung von vier FITC-markierte Amine in weniger als 50 s bei einer Nachweisgrenze von 460 ppt (500 pM) erzielt. Die Basislinientrennung von drei Rhodaminfarbstoffen konnte in weniger als 6 s bei einer Nachweisgrenze von 240 ppt (500 pM) erreicht werden. Für anspruchsvolle chirale Trennungen von FITC-markierten Aminen musste die geringe Auflösung verbessert werden. Hierzu wurden die Kanäle von mikrofluidischen Glaschips mit Polyvinylalkohol (PVA) beschichtet. Während mit den beschichteten Strukturen eine Basislinientrennung erzielt werden konnte, war dies mit unbeschichteten Chips nicht möglich. Die hohe Auflösung ermöglichte zudem die Enantiomerenverhältnisse mit hoher Präzision (RSD=1,9%) und Genauigkeit ($R=0,9996$) zu bestimmen. Unter Verwendung eines MCE-Systems mit UV-Detektion konnten eine Vielzahl underivatisierter Verbindungen in weniger als 1 min getrennt werden. Die schnellste Trennung erfolgte hierbei in 2,5 s. Die gleichzeitige Trennung einer Mischung aus drei chiralen Verbindungen auf einer Trennstrecke von 12 mm benötigte weniger als 11 s.

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

D. Belder, A. Deege, M. Maass, M. Ludwig: *Design and performance of a microchip electrophoresis instrument with sensitive variable-wavelength fluorescence detection*, *Electrophoresis* **2002**, 23, 2355-2361.

D. Belder, A. Deege, F. Kohler, M. Ludwig: *Poly(vinyl alcohol)-coated microfluidic devices for high-performance microchip electrophoresis*, *Electrophoresis* **2002**, 23, 3567-3573.

M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder: *High-speed chiral separations on a microchip with UV detection*, *Electrophoresis* **2003**, 24, 3233-3238.

M. Ludwig, D. Belder: *Coated microfluidic devices for improved chiral separations in microchip electrophoresis*, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2481-2486.

Poster

M. Ludwig, N. Piehl, F. Kohler, D. Belder: *High-speed chiral separations on a microchip*, 17th International Symposium on Microscale Separations and Analysis, Salzburg **2004**.

Vorträge

M. Ludwig: *Schnelle chirale Trennungen in mikrofluidischen Strukturen*, Doktoranten-Seminar, Kloster Banz **2003**.

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	2
2.	THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER ELEKTROPHORESE	4
2.1	Elektrokinetische Prozesse	4
2.2	Elektrophorese.....	5
2.3	Elektroosmose.....	7
2.3.1	Elektroosmotisches Strömungsprofil	7
2.3.2	Elektrische Doppelschicht.....	8
2.3.3	Beeinflussung des EOF	10
2.4	Die Gesamtmobilität und der Trennvorgang	13
2.5	Parameter zur Beschreibung elektrophoretischer Trennungen.....	14
2.6	Dispersion.....	16
2.6.1	Grundlagen	16
2.6.2	Joulesche Wärme.....	17
2.6.3	Injektionszone	17
2.6.4	Detektionszone	18
2.6.5	Probenadsorption.....	18
2.6.6	Elektrodispersion.....	19
2.7	Trennungsoptimierung	19
2.7.1	Erhöhung der Spannung	20
2.7.2	Wahl des Elektrolyten	21
2.7.3	Veränderung des pH-Wertes	21
2.7.4	Veränderung der Temperatur	23
2.7.5	Kapillarbeschichtungen.....	23
2.7.5.1	Dynamische Beschichtungen	24
2.7.5.2	Permanente Beschichtungen	26

2.8	Chirale Trennungen.....	29
3.	MIKROCHIPELEKTROPHORESE	31
3.1	Einführung.....	31
3.2	Aufbau und Funktionsweise eines Mikrochips.....	33
3.3	Probenaufgabe	36
3.3.1	Simplest injection.....	37
3.3.2	Floating injection.....	37
3.3.3	Pinched injection.....	38
3.3.4	Gated injection	39
3.4	Materialien.....	40
3.5	Detektion	41
4.	AUFBAU UND VALIDIERUNG EINES ROBUSTEN MCE-SYSTEMS.....	43
4.1	Einleitung	43
4.2	MCE-System auf Basis eines inversen Fluoreszenzmikroskops	43
4.2.1	Hochspannungsquelle.....	44
4.2.2	Mechanische Komponenten	45
4.2.3	Optische Komponenten	46
4.2.4	Mikrochip	46
4.3	Durchführung der MCE-Messungen	47
4.3.1	Beobachtung des Injektionsprozess	47
4.3.2	Chipjustage.....	49
4.3.3	Erfassung der Messsignale	50
4.4	Experimentelle Parameter der MCE.....	50
4.4.1	Probenaufgabe.....	51
4.4.2	Trennstrecke	53
4.5	Chirale Trennungen.....	55

4.6	Validierung des MCE-2-Systems	57
4.6.1	Reproduzierbarkeit	57
4.6.2	Empfindlichkeit und Linearität	58
5.	VERBESSERUNG DER AUFLÖSUNG	61
5.1	Einleitung	61
5.2	Beschichtung mikrofluidischer Strukturen	62
5.2.1	Beschichtung eines Mikrochips mit Polyvinylalkohol.....	63
5.2.2	Charakterisierung der PVA-Beschichtung	64
5.2.3	Chirale Trennungen in PVA-beschichteten Mikrochips	69
5.2.4	Bestimmung der Enantiomerenreinheit in PVA-beschichteten Chips	72
5.2.5	Reproduzierbarkeit der PVA-Beschichtung	78
5.3	Verwendung hochselektiver chiraler Selektoren	81
5.3.1	Einleitung	81
5.3.2	Mikrochipelektrophorese-System mit UV-Detektion	81
5.3.3	Ergebnisse	82
6.	EXPERIMENTELLER TEIL.....	91
6.1	Berechnung der Feldstärke	91
6.2	Datenerfassung	93
6.3	GC-Bestimmung der Enantiomerenreinheit	93
6.4	CE-Instrument und Kapillaren.....	93
6.5	Chip-Beschichtung	93
6.6	Konditionierung und Lagerung der Chips	94
6.7	Durchführung der MCE-Messungen Fluoreszenzsystem	95
6.8	MCE-System mit UV-Detektor	95
6.9	Durchführung der MCE-Messungen UV-System	96

6.10	Herstellung der Elektrolytlösungen.....	96
6.10.1	CHES-Puffer	96
6.10.2	Hochsulfatierte Cyclodextrin-Puffer.....	97
6.11	Derivatisierung von Aminen mit Fluoresceinisothiocyanat	97
6.12	Derivatisierung von Aminen mit Alexafluor®350	98
6.13	Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien	98
7.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	101
8.	VERZEICHNIS WICHTIGER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	104
9.	LITERATURVERZEICHNIS	107

1. Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

Die Miniaturisierung chemischer Analysensysteme wird bereits seit langem verfolgt. So hat die Verkleinerung chromatographischer Systeme zu leistungsfähigen Trennverfahren wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und der Kapillargaschromatographie (GC) geführt. Die Miniaturisierung elektrophoretischer Methoden führte 1981 durch Jorgenson und Lukacs zur Entwicklung der Kapillarelektrophorese (CE) [1] und eine Fortführung 1992 schließlich zur Mikrochipelektrophorese (MCE) durch Widmer und Manz [2]. Ziel ist die Integration sämtlicher chemischer Arbeitsschritte eines Chemielabors wie Probenvorbereitung, Derivatisierung, Auftrennung und Detektion auf einen wenige Zentimeter großen mikrofluidischen Chip. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von *lab-on-a-chip* oder *Mikrototalanalyse-System* (μ -TAS). Diese Integration steht in Analogie zur Mikroelektronik. Statt Leiterbahnen, auf denen sich Elektronen bewegen, befinden sich auf dem μ -TAS wenige Mikrometer große Kanäle zum Transport von Flüssigkeiten und Gasen. Im Gegensatz zu chromatographischen Methoden ist die Realisierung eines μ -TAS auf Basis eines elektrophoretischen Systems leichter realisierbar, da auf bewegliche Teile wie Pumpen und Ventile verzichtet werden kann. Der Flüssigkeitstransport erfolgt lediglich durch Veränderung elektrischer Felder mittels Elektrophorese und Elektroosmose. Das Prinzip der elektrophoretischen Trennung in der MCE entspricht dem der CE. Der Unterschied besteht ausschließlich in der Probenaufgabe. So erfolgt die Probenaufgabe in der MCE mit Hilfe zweier sich kreuzender Kanäle, wobei die geometrischen Dimensionen des Kreuzungsbereichs die Breite der Probenzone mitbestimmen. Hierdurch gelingt es, besonders schmale Zonen zu injizieren. Schmale Probenzonen und die Möglichkeit hohe Feldstärken zu generieren, erlauben in der MCE sogar Trennungen in Millisekunden [3]. Ein weiterer Vorteil mikrofluidischer Systeme ist die Möglichkeit der leichten Parallelisierung (Multiplexing) der Trennkanäle [4-6]. Durch massive Parallelisierung kann so ein hoher Probendurchsatz ermöglicht werden. Auf Mikrochips ist bereits eine Vielzahl unterschiedlichster elektrophoretischer Trennungen durchgeführt worden. Das Hauptanwendungsgebiet liegt jedoch in der

Analyse von Biomolekülen wie Oligonukleotide, Proteine und Peptide [7-9]. Die MCE-Analyse von DNA-Fragmenten hat sich hierbei sogar zu einer ausgereiften Methode entwickelt, welche in Konkurrenz zur klassischen CE und Gel-Elektrophorese treten kann [10]. Demgegenüber wurden chirale Trennungen mit der Hilfe der MCE nur in wenigen Fällen beschrieben. Erst kürzlich ist hierzu ein erster Übersichtsartikel erschienen [11].

1.2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Der Bedarf nach enantiomerenreinen Verbindungen in der Pharmazie, Agro- und Naturstoffchemie wächst stetig [12,13]. In vielen Bereichen der pharmazeutischen und chemischen Forschung werden zunehmend kombinatorische Methoden bei der Entwicklung asymmetrischer Katalysatoren eingesetzt [14,15]. Die mit Hilfe kombinatorischer Methoden synthetisierten Katalysatoren müssen hinsichtlich ihrer Enantioselektivität bewertet werden. Hierzu werden Hochdurchsatz-Screeningsysteme mit einem Probendurchsatz von mehreren Tausend Proben pro Tag benötigt. Mit sequentiell betriebenen Trennverfahren wie der GC und der HPLC lassen sich nur wenige Dutzend Bestimmungen pro Tag durchführen. Eine Erhöhung des Probendurchsatzes durch Parallelisierung ist bei diesen chromatographischen Methoden schwierig zu realisieren. Als Alternative bietet sich die zur HPLC komplementäre Kapillarelektrophorese an. Eine Erhöhung des Analysendurchsatzes erfolgt hierbei durch gleichzeitigen Betrieb einer Vielzahl von Kapillaren ohne Integration aufwendiger Pumpensysteme. Mit diesen Kapillar-Array-Elektrophorese-(CAE) Systemen wurde die Sequenzierung des menschlichen Genoms in kürzester Zeit überhaupt erst ermöglicht [16]. Aber auch beim chiralen Hochdurchsatzscreening konnte die CAE erfolgreich eingesetzt werden [17]. Eine alternative Möglichkeit der Erhöhung des Probendurchsatzes in der CE besteht in der Anwendung der Mikrochipelektrophorese (MCE). Diese hoch miniaturisierten Systeme zeichnen sich durch die Schnelligkeit der Trennung und der Möglichkeit zur Integration vieler paralleler Systeme auf kleinstem Raum aus. So gelang mit einem Eigenbau-MCE-System der ersten Generation (MCE-1-System) die chirale Trennung von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiertem 1-Cyclohexylethylamin in weniger als

zwei Minuten [17]. Diesem auf einem laserinduziertem Fluoreszenz-Detektionssystem (LIF) basierenden Aufbau mangelte es jedoch an einer ausreichenden Robustheit und an einer geringen Reproduzierbarkeit der Messungen. Aufgrund fehlender optischer Vorrichtungen war es mit diesem System unmöglich eine systematische Optimierung der Trennparameter vorzunehmen.

An dieser Stelle setzt diese Arbeit an. Ziel ist der Aufbau eines leistungsfähigeren, flexibleren Instrumentes mit der Möglichkeit der Fluoreszenzanregung bei variabler Wellenlänge. Durch Verwendung diverser optischer Komponenten soll zudem eine Möglichkeit zur Beobachtung des Injektionsprozesses und der exakten Ausrichtung des Trennkanals oberhalb des Strahlengangs geschaffen werden. Hierdurch soll eine systematische Optimierung der Trennparameter ermöglicht und durchgeführt werden. Nach erfolgter Validierung des Systems bezüglich Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit soll die Entwicklung von Methoden zum Hochdurchsatzscreening chiraler Verbindungen erfolgen. Hierzu werden vor allem Methoden der gezielten Veränderung der Oberflächeneigenschaften von mikrofluidischen Kanälen durch Beschichtung eingesetzt.

2. Theoretische Grundlagen der Elektrophorese

2.1 Elektrokinetische Prozesse

In der Natur sind insgesamt vier elektrokinetische Prozesse bekannt, die in der Tabelle 2.1 aufgeführt sind. Allen Phänomenen gemeinsam ist eine Ladungstrennung an der Grenzfläche eines elektrochemischen Zweiphasensystems.

Phänomen	Ursache	Wirkung
Strömungspotential Sedimentationspotential	translatorische Bewegung	elektrisches Potential
Elektrophorese Elektroosmose	elektrisches Potential	translatorische Bewegung

Tabelle 2.1: Einordnung elektrokinetischer Erscheinungen nach Ursache und Wirkung

Die nach Ursache und Wirkung erfolgte Einstufung teilt die Prozesse in zwei Gruppen auf. Zur ersten Gruppe gehören das *Strömungs-* und das *Sedimentationspotential*. Bei diesen Phänomenen induziert eine translatorische Bewegung von Teilchen entlang einer Festphase bzw. in einer Flüssigkeit ein elektrisches Potential. Beide Prozesse besitzen in der Elektrophorese keine Bedeutung und werden hier nur der Vollständigkeit halber kurz erwähnt:

- Bewegte Flüssigkeiten erzeugen ein *Strömungspotential*. Dieses von *Quinke* [18] entdecktes Phänomen ist ein Sonderfall der elektrostatischen Aufladung. Es tritt auch beim Umfüllen brennbarer Flüssigkeiten auf und kann durch Erdung der Gefäße vermieden werden.
- Suspendierte oder kolloidal gelöste Teilchen, die durch Schwerkraft niedersinken, erzeugen ein *Sedimentationspotential*. Dies wurde erstmalig von *Dorn* [19] beschrieben.

In der zweiten Gruppe findet man die *Elektrophorese* und die *Elektroosmose*. Bei diesen Prozessen induziert ein elektrisches Potential eine translatorische Bewegung. Beide Phänomene nehmen in der Kapillarelektrophorese eine zentrale Rolle ein, da sowohl die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten als auch ihre Bewegungsrichtung in einem elektrischen Feld durch die elektrophoretische und elektroosmotische Bewegung in der Kapillare beeinflusst werden. Diese Transportphänomene werden in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben.

2.2 Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Migration (Bewegung) eines geladenen Teilchens in einem elektrischen Feld (Abbildung 2.1). Wird ein Ion einem elektrischen Feld der Feldstärke E ausgesetzt, so erfährt es entsprechend seiner Ladung eine Beschleunigungskraft F_{el} zur Anode bzw. Kathode. Betrag und Richtung der Migration sind von der Ladung und der Größe der Teilchen abhängig.

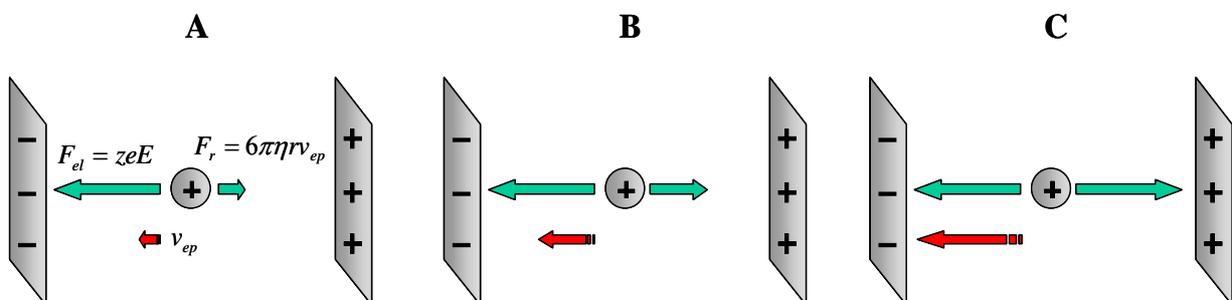


Abbildung 2.1 Ein geladenes Teilchen erfährt in einem elektrischen Feld eine beschleunigende Kraft F_{el} (A). Die entgegengesetzte Reibungskraft F_r wächst mit zunehmender Geschwindigkeit v_{ep} (B). Im Kräftegleichgewicht ist die Geschwindigkeit konstant (C).

Dieser Beschleunigungskraft ist eine Reibungskraft F_r entgegengerichtet, die für kugelförmige Moleküle durch das STOKESche Gesetz beschrieben werden kann. Im Kräftegleichgewicht von Beschleunigungs- und Reibungskraft erhält man Gleichung (2.1).

$$zeE = -6\pi\eta r v_{ep} \quad (2.1)$$

z:	Ladung des Teilchens
η :	dynamische Viskosität [Pa·s]
e:	Elementarladung Elektron [C]
r:	Teilchenradius [m]
E:	elektrische Feldstärke [V/m]
v_{ep} :	elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

Im Gleichgewicht ist die vektorielle Summe dieser Kräfte Null und es resultiert eine konstante, ionenspezifische elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} . Durch Umstellen der Gleichung (2.1) erhält man schließlich:

$$v_{ep} = -\frac{ze}{6\pi\eta r} E \quad (2.2)$$

Da für ein gegebenes Ion und Medium die elektrophoretische Geschwindigkeit nur vom elektrischen Feld abhängig ist, können die konstanten Faktoren zu einer neuen, stoffspezifischen Proportionalitätskonstante, der elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} , zusammengefaßt werden:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (2.3)$$

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]

Die Gleichung (2.3) beschreibt nur die grundlegenden Zusammenhänge zwischen der elektrophoretischen Mobilität und dem elektrischen Feld. Eine umfassendere Theorie berücksichtigt, daß geladene Teilchen in Lösung nicht als isoliert betrachtet werden können. Nach der Debye-Hückel-Theorie ist jedes Zentral-Ion von einer Ionenwolke (Solvathülle) entgegengesetzter Ladung umgeben, die eine starre Sternsche Doppelschicht bildet und damit den Ladungszustand des Zentral-Ions verändert. Diese Ionenatmosphäre verringert die Mobilität des Zentral-Ions durch zwei Effekte:

- den *elektrophoretischen Effekt*: Die Ausbildung einer Solvathülle aus Gegenionen schirmt das Zentral-Ion ab, was zu einer Verringerung der effektiven Ladung führt. Das Zentral-Ion migriert langsamer als es seiner Ladung entspricht.

- den *Relaxationseffekt*: Bei einem nicht vorhandenen elektrischen Feld liegt ein Gleichgewichtszustand zwischen Zentral-Ion und Solvathülle mit kugelsymmetrischer Ladungsverteilung vor. Ein externes elektrisches Feld führt zu einem Nichtgleichgewichtszustand mit getrennten Ladungszentren von Ion und Solvathülle. Daraus resultiert eine elektrostatische Bremswirkung. Durch Relaxation versucht das System dem entgegenzuwirken und eine neue Gleichgewichtszustand einzunehmen.

Eine theoretische Beschreibung des Ladungszustandes des solvatisierten Ions erfolgt durch das Zetapotential der Sternchen Doppelschicht. Die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (2.4) beschreibt die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} eines Ions vom Zetapotential (elektrokinetisches Potential) ζ_{ep} .

$$\mu_{ep} = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{\eta} \zeta_{ep} \quad (2.4)$$

ε_0 : elektrische Feldkonstante Vakuum [$A^2 \cdot s^2 \cdot J^{-1} \cdot m^{-1}$]
 ε_r : Dielektrizitätskonstante Elektrolyt [$A^2 \cdot s^2 \cdot J^{-1} \cdot m^{-1}$]
 ζ_{ep} : Zetapotential [V]

Durch den Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittel und der damit verbundener Veränderung von Dielektrizitätskonstante ε_r und Viskosität η kann die elektrophoretische Mobilität gezielt verändert werden. Dies macht man sich in der nichtwässrigen Kapillarelektrophorese (NACE) zunutze. Eine ausführlichere Beschreibung des Zetapotentials und der Sternchen Doppelschicht findet man im folgenden Kapitel.

2.3 Elektroosmose

2.3.1 Elektroosmotisches Strömungsprofil

Dem Massentransport durch die elektrophoretische Mobilität überlagert ist der elektroosmotische Fluß (EOF), der zum Transport der Probenzone, nicht aber zu ihrer Trennung beiträgt. Er ist eine Besonderheit der Kapillarelektrophorese und wird bei der konventionellen Plattenelektrophorese wegen konvektionsverhindernder

Zusätze nicht beobachtet. Das aus dem EOF resultierende Strömungsprofil der Elektrolytlösung in der Kapillare zeigt eine spezielle Charakteristik. Kurz nach Anlegen des elektrischen Feldes kommt es zur Bildung eines inversen parabolischen Strömungsprofils (Abbildung 2.2 A), welches rasch in ein flaches, stempelförmiges Profil übergeht (B). Mit Ausnahme des kleinen Bereichs der diffusen Doppelschicht ist die Geschwindigkeit über den gesamten Querschnitt konstant, womit lediglich die axiale Diffusion der Probenzone zu Bandenverbreiterung beiträgt. Es resultieren sehr schmale Signale mit hohen Trennstufenzahlen. Im Gegensatz hierzu kommt es bei der druckbetriebenen HPLC zur Ausbildung eines parabolischen Hagen-Poiseuilleschen-Strömungsprofils, welches während des gesamten Trennvorgangs erhalten bleibt (C). Dieses weist eine wesentlich höhere Dispersion (Verbreiterung) der Probenzone auf, was zu breiteren Signalen mit geringerer Effizienz führt.

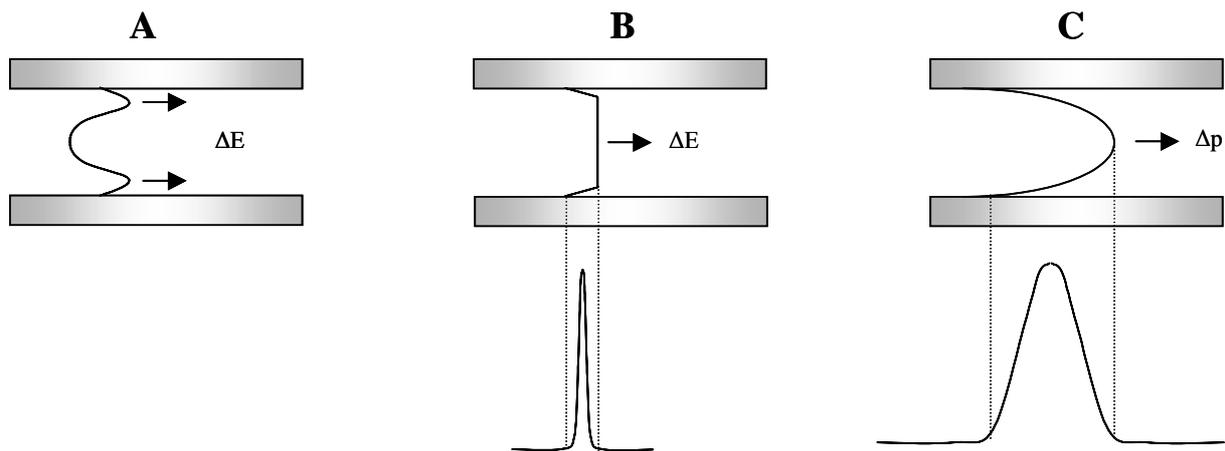


Abbildung 2.2 Vergleich der Strömungsprofile in der CE (A bzw. B) und der HPLC (C) und die daraus resultierenden Peakprofile.

2.3.2 Elektrische Doppelschicht

Die Ursache des EOF liegt in der Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht an der Phasengrenze zwischen einer festen Phase und dem Elektrolyten. In wässrigen Lösungen bilden die meisten Oberflächen wie Glas, fused Silica (FS: amorphes Quarz), Teflon und Papier einen Überschuss an negativer Ladung. Dieser entsteht

entweder durch Adsorption ionischer Teilchen, wie beim Teflon [20] und/oder durch Dissoziation saurer oder basischer Gruppen an der Festkörperoberfläche. Letzterer Effekt dominiert beim FS. Die Oberflächenladungen verursachen ein elektrisches Feld, welches positive Gegenionen anzieht. Die Schicht aus negativer Oberflächenladungen und Kationen formen eine elektrische Doppelschicht.

Die Beschreibung dieser Doppelschicht kann nach verschiedenen Modellen erfolgen. Beim Helmholtz-Modell bilden die adsorbierten Gegenionen auf der Oberfläche eine starre Schicht, deren Ladung die der Kapillaroberfläche gerade kompensiert. Diese Doppelschicht ist mit einem Plattenkondensator vergleichbar. Bei *Gouy* und *Chapman* sind die Gegenionen frei bewegliche, punktförmige Ladungen, die sich der Oberfläche beliebig nähern können. Mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche nimmt ihre Konzentration ab. Es entsteht eine diffuse Doppelschicht mit exponentiellem Potentialverlauf. Geht man von einer endlichen Größe der Ionen aus, so kommt man zum Modell von *Stern*, das in der Abbildung 2.3 dargestellt ist.

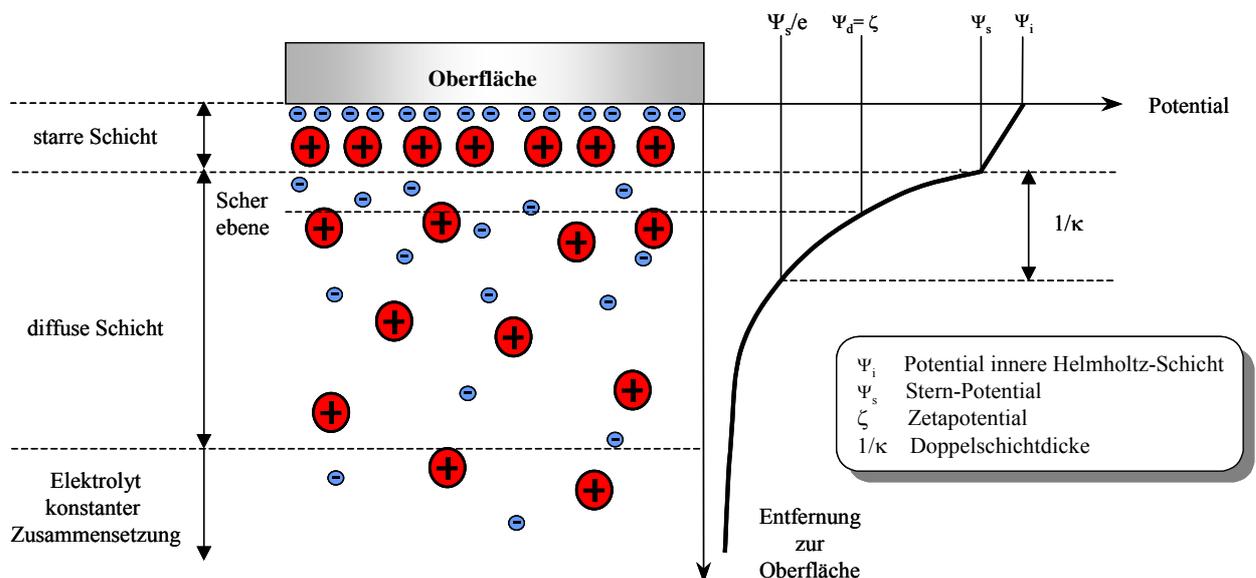


Abbildung 2.3 Beschreibung des Potentialverlaufs an der Feststoff-Elektrolyt-Phasengrenze durch das Stern-Modell.

Das Stern-Modell kombiniert die Modelle von Helmholtz und Gouy-Chapman. Direkt an der Phasengrenze zwischen Elektrolyt und Oberfläche bildet sich eine starre Schicht (Stern-Schicht). Das Potential in dieser starren Schicht nimmt linear mit

zunehmender Entfernung zur Kapillarwand ab. Es grenzt eine diffuse Gouy-Chapman-Schicht an. Innerhalb dieser Schicht nimmt das Potential exponentiell ab. Diese endet beim völligen Ladungsausgleich, bei dem sie in die Elektrolytphase übergeht. Das Potential an der Scherebene wird als elektrokinetisches ζ -Potential bezeichnet und ist eine aus Strömungspotentialmessungen experimentell zugängliche Größe. Legt man an eine mit einem Elektrolyten gefüllte Kapillare ein elektrisches Feld an, so werden die Kationen der diffusen Schicht zur Kathode beschleunigt. Aufgrund von Reibungskräften wird dabei die gesamte Lösung im Inneren der Kapillare mitbewegt. Es bildet sich ein der angelegten Feldstärke E proportionaler elektroosmotischer Fluß. Die daraus resultierende Geschwindigkeit beträgt gemäß Gleichung (2.5):

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E = -\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta_{EOF}}{\eta} E \quad (2.5)$$

2.3.3 Beeinflussung des EOF

Um zu zeigen, wie der EOF eines kapillarelektrophoretischen Systems beeinflusst werden kann, ist es notwendig das ζ -Potential mathematisch zu beschreiben. Auf die Ableitungen der Gleichungen wird hier verzichtet. Diese werden u.a. bei Grossman [21] ausführlich behandelt. Der exponentielle Potentialverlauf innerhalb der Gouy-Chapman-Schicht wird durch die Gleichung (2.6) beschrieben.

$$\Psi(x) = \Psi_s \cdot \exp\left(-\frac{x}{\kappa^{-1}}\right) \quad (2.6)$$

Ψ :	elektrisches Potential [V]
Ψ_s :	Stern-Potential [V]
x :	Abstand von der starren Schicht [m]
κ^{-1} :	Doppelschichtdicke [m]

Für praktische Vergleiche ist die Dicke der elektrischen Doppelschicht von Bedeutung. Sie ist per Definition die Strecke, auf der das an der Scherfläche vorhandene ursprüngliche Stern-Potential auf $1/e$ seines Anfangwertes gefallen ist.

Diese Strecke entspricht gemäß Gleichung (2.6) gerade κ^{-1} . Dieser Parameter wird als Doppelschichtdicke oder Debye-Länge bezeichnet und ist u.a. von der Ionenstärke I der Elektrolytlösung abhängig. Einen Zusammenhang zwischen der Doppelschichtdicke und der elektrophoretischen Mobilität beschreibt die Gleichung (2.7).

$$\mu_{EOF} = \frac{\sigma \kappa^{-1}(\varepsilon_r, I)}{\eta} \quad (2.7)$$

μ_{EOF} : elektroosmotische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$]
 σ : Oberflächenladungsdichte [$\text{C} \cdot \text{m}^{-2}$]
 I : Ionenstärke [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]

Analog zur Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (2.4) beschreibt die Gleichung (2.8) die Abhängigkeit der elektroosmotischen Mobilität vom Zetapotential.

$$\mu_{EOF} = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{\eta} \zeta_{EOF} \quad (2.8)$$

Die elektrophoretische Mobilität wird somit über dieselben Parameter beeinflusst wie die elektroosmotische Mobilität. Lediglich der Bezugspunkt des Zetapotentials ist unterschiedlich. Im Falle der Elektrophorese entspricht das ζ -Potential dem Potential an der Teilchenoberfläche, im Falle der Elektroosmose dem an der Kapillarwand.

Maßnahme	Einfluß auf			
	κ^{-1}	σ	η	ε
Variation des pH-Wertes	+	+	-	-
Ätzen der Kapillaroberfläche	+	+	-	-
Variation der Ionenstärke	+	-	-	-
Modifizierung der Kapillaroberfläche durch grenzflächenaktive Verbindungen Beschichtung	+	+	+	-
Anlegen zusätzlicher elektrischer Felder senkrecht zur Kapillaroberfläche	+	-	-	-
Variation des Lösungsmittels	+	+	+	+
Veränderung der Temperatur	+	-	+	-

Tabelle 2.2 Möglichkeiten der Beeinflussung des EOF: κ^{-1} : Doppelschichtdicke, σ : Oberflächenladungsdichte, η : Viskosität, ε : Dielektrizitätskonstante, +: vorhanden, -: nicht vorhanden

Zur Methodenentwicklung und Optimierung der Trennung ist es wünschenswert, den EOF gezielt zu verändern. Eine Veränderung des EOF durch Variation der Doppelschichtdicke, Oberflächenladungsdichte, Viskosität und Dielektrizitätskonstante kann über eine Vielzahl von Maßnahmen erfolgen, welche in der Tabelle 2.2 zusammengefasst sind. Die Möglichkeiten der Einflussnahme über den pH-Wert und die Ionenstärke werden in Abbildung 2.4 beschrieben. Während der pH-Wert Einfluß auf die Höhe des ζ -Potential über die Anzahl dissoziierter Silanolgruppen nimmt (A), bestimmt die Ionenstärke das Ausmaß des Potentialabfalls und damit die Breite der diffusen Doppelschicht (B). Man erhält einen hohen EOF bei hohem pH-Wert (großes ζ -Potential) und kleiner Ionenstärke (breite Schicht).

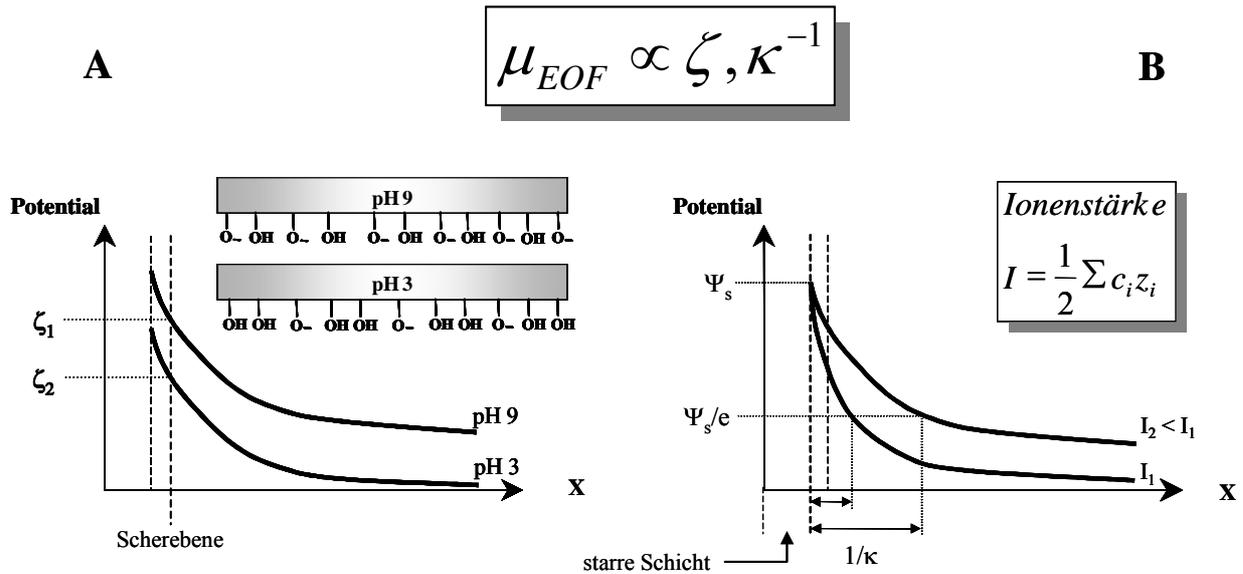


Abbildung 2.4 Beeinflussung der elektroosmotischen Mobilität μ_{EOF} durch Variation des ζ -Potentials bzw. der Doppelschichtdicke $1/\kappa$ durch Veränderung des pH-Wertes und der Ionenstärke I der Elektrolytlösung. Die Definition der Scherebene bzw. der starren Ebene ist der Abbildung 2.3 zu entnehmen.

2.4 Die Gesamtmobilität und der Trennvorgang

Die Beiträge von elektrophoretischer Mobilität und EOF addieren sich gemäß der Gleichung (2.9) zur effektiven Mobilität μ_{ges} .

$$\mu_{ges} = \mu_{ep} \pm \mu_{EOF} \quad (2.9)$$

Von Vorzeichen und Größe der beiden Beiträge ist es abhängig, inwieweit eine Detektion und Trennung erfolgen kann. In unmodifizierten FS-Kapillaren ist der EOF zur Kathode gerichtet und weist ein positives Vorzeichen auf. Kationen (K) (Abbildung 2.5) wandern in die gleiche Richtung und erreichen damit den Detektor zu erst. Neutralteilchen (N) werden nicht getrennt, da sie aufgrund fehlender inhärenter elektrophoretischer Mobilität ausnahmslos die gleiche Gesamtmobilität aufweisen. Da die elektrophoretische Mobilität von Anionen (A) dem EOF entgegengerichtet ist, wirkt sich der Fluß auf langsame und schnelle Anionen unterschiedlich aus. Bei langsamen Anionen (A1) dominiert der EOF, so daß sie zur Kathode wandern. Bei schnellen Anionen (A2) ist der Betrag der elektrophoretischen Mobilität jedoch größer

als der des elektroosmotischen Flusses. Sie gelangen nicht zur Kathode. Ihre Erfassung erfordert entweder eine Umkehrung der Polarität des Instrumentes oder eine Beeinflussung des EOF und der elektrophoretischen Mobilität über den pH-Wert und/oder Kapillarbeschichtungen.

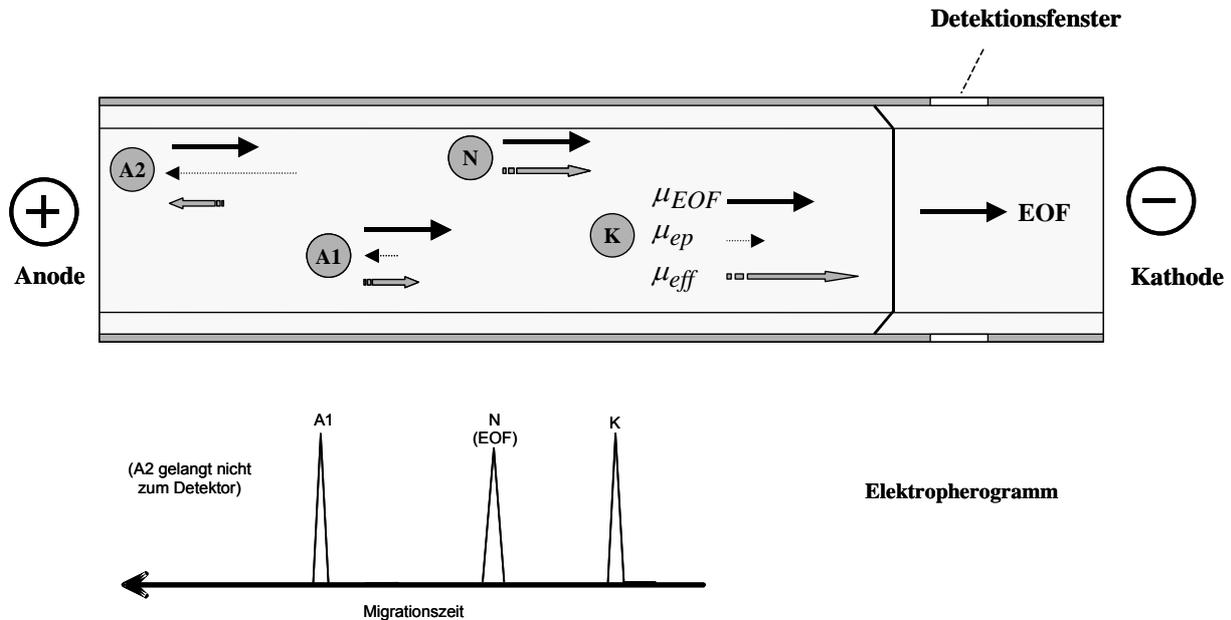


Abbildung 2.5 Migration kationischer K, neutraler N und anionischer Teilchen A bei kathodischem EOF.

2.5 Parameter zur Beschreibung elektrophoretischer Trennungen

Als Resultat einer kapillarelektrophoretischen Trennung erhält man ein Elektropherogramm, welches ein Detektorsignal in Abhängigkeit von der Zeit darstellt, wie es auch in der Chromatographie üblich ist. Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen von Elektrophorese und Chromatographie verschieden sind, haben *Jorgenson* und *Lukacs* chromatographische Größen wie z.B. die Bodenzahl zur Beschreibung einer kapillarelektrophoretischen Trennung benutzt. Während die in der Chromatographie erhaltenen Signale im Idealfall durch eine Gaußsche Glockenkurve beschrieben werden können, besitzen elektrophoretische Signale eine Dreiecksform. Die Übertragung chromatographischer Parameter auf die Elektrophorese stellt somit nur eine mathematische Näherung dar.

Die Leistungsfähigkeit einer kapillarelektrophoretischen Trennung wird durch Trenneffizienz, Selektivität und Auflösung bestimmt.

Gemäß der Gleichung (2.10) wird die Trenneffizienz N aus dem Verhältnis der Verweildauer im System und der Varianz berechnet:

$$N = \left(\frac{t}{\sigma} \right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t}{w} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t}{w_h} \right)^2 \quad \begin{array}{l} w = 4\sigma \\ w_h = 2,354\sigma \end{array} \quad (2.10)$$

N: Trenneffizienz [dimensionslos]
 t: Migrationszeit [s]
 σ : Standardabweichung [s]
 w: Basisbreite [s]
 w_h : Halbwertsbreite [s]

Die Selektivität α ist entsprechend der Gleichung (2.11) gleich dem Verhältnis der elektrophoretischen Mobilitäten $\mu_{ep,i}$:

$$\alpha = \frac{\mu_{ep,1}}{\mu_{ep,2}} \quad \mu_{ep,1} > \mu_{ep,2} \quad (2.11)$$

Um eine vollständige Trennung zu erzielen, ist eine Selektivität $\geq 1,02$ in der Regel ausreichend [22].

Entsprechend der Gleichung (2.12) wird die Auflösung R zweier Substanzen aus dem Abstand und den Signalbreiten der beiden Signale berechnet:

$$R = 2 \cdot \frac{t_2 - t_1}{w_2 + w_1} = 1,18 \cdot \frac{t_2 - t_1}{w_{h,2} + w_{h,1}} \quad \begin{array}{l} w = 4\sigma \\ w_h = 2,354\sigma \end{array} \quad (2.12)$$

t: Migrationszeit [s]
 σ : Standardabweichung [s]
 w: Basisbreite [s]
 w_h : Halbwertsbreite [s]

Nach Giddings [23] ist die Auflösung mit einem Effizienzterm (\sqrt{N}) und einem Selektivitätsterm ($\Delta\mu_{eff} / \overline{\mu_{eff}}$) entsprechend der Gleichung (2.13) verknüpft:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \frac{\Delta\mu_{eff}}{\bar{\mu}_{eff}} = \frac{1}{2} \sqrt{N} \cdot \frac{(1-\alpha)}{(1+\alpha)} \quad (2.13)$$

α : Selektivität
 $\Delta\mu_{eff}$: Differenz der effektiven Mobilitäten [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]
 $\bar{\mu}_{eff}$: mittlere effektive Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]

Das Erzielen einer ausreichenden Auflösung ist das eigentliche Ziel jeder Trennung. Hierbei gelten zwei Signale, bei idealer Gaußsymmetrie und gleicher Fläche, ab einem Wert von $R \geq 1,5$ als basisliniengetrennt. Die Optimierung gelingt gemäß Gleichung (2.13) durch Verbesserung der Effizienz und/oder der Selektivität.

2.6 Dispersion

2.6.1 Grundlagen

Um eine maximale Auflösung zu erzielen, ist es wichtig, die Breite der aufgetragenen Probenzone möglichst schmal zu halten und ihre Dispersion (Verbreiterung), während der Trennung möglichst zu verhindern. Je schmaler die Probenzone ist, desto geringer ist die erforderliche Mobilitätsdifferenz der Komponenten für eine Trennung. Ursache der Dispersion ist die unterschiedliche Mobilität der Moleküle einer Komponente des Analysengemisches innerhalb der Probenzone. Die quantitative Beschreibung erfolgt anhand der Varianz σ^2 .

Unter idealen Bedingungen trägt nur die Diffusion in Längsrichtung (longitudinale Diffusion) zur Peakverbreiterung bei. Radiale Diffusion und die Konvektion sind aufgrund des flachen Fließprofils bzw. der antikonvektiven Eigenschaften der Kapillare vernachlässigbar. In diesem Fall beträgt die Varianz:

$$\sigma^2 = \sigma_{Dif}^2 = 2Dt \quad (2.14)$$

σ_{Dif}^2 : Varianz verursacht durch Diffusion [m^2]
 D : Diffusionskoeffizient [m^2/s]
 t : Zeit [s]

Die maximal erreichbare Trennstufenzahl N beträgt somit:

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{\mu_{\text{eff}} U}{2D} \quad (2.15)$$

L:	effektive Trennstrecke [m]
N:	Trenneffizienz [dimensionslos]
μ_{eff} :	effektive Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]
U:	Trennungsspannung [V]
D:	Diffusionskoeffizient [m^2/s]

In der Praxis müssen jedoch zusätzliche dispersive Effekte berücksichtigt werden, die unterschiedliche Beiträge zur Gesamtvarianz liefern [24]. Unter der Annahme, daß die dispersiven Prozesse voneinander unabhängig sind gilt [25]:

$$\sigma_{\text{ges}}^2 = \sum_i \sigma_i^2 \quad (2.16)$$

σ_{ges}^2 : Gesamtvarianz [m^2]

2.6.2 Joulesche Wärme

Durch den Stromfluß wird in der Kapillare Joulesche Wärme freigesetzt. Da die Wärmeabfuhr nur über die Kapillarwand erfolgt, resultiert ein radialer Temperatur- und Viskositätsgradient. Dieser führt zu einer laminaren Strömung und somit zur Zonenverbreiterung [26]. Zur Erzielung hoher Effizienzen bzw. Auflösungen, entsprechend der theoretischen Gleichungen (2.15) und (2.19), sind hohe Spannungen nur so lange angebracht, wie die freigesetzte Wärme vernachlässigbar ist.

2.6.3 Injektionszone

Aufgrund der endlichen Breite der Injektionszone trägt auch diese zur Bandenverbreiterung bei. Im einfachsten Fall geht man dabei von einem

rechteckförmigen Injektionsprofil aus. Die Varianz durch Injektion σ_{inj}^2 ist in diesem Fall nur von der Länge l des Injektionsprofils abhängig [27].

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{l^2}{12} \quad (2.17)$$

σ_{inj}^2 : durch die endliche Breite der Injektionszone verursachte Varianz [m²]
 l : Breite Injektionszone [m]

2.6.4 Detektionszone

Aufgrund der endlichen Ausmaße einer Detektorzelle oder eines Lichtstrahls, erfasst der Detektor lediglich einen über das endliche Detektionsvolumen gemittelten Wert [27]. Die Bandenverbreiterung durch das Detektionssystem σ_{Det}^2 beträgt hierbei:

$$\sigma_{Det}^2 = \frac{l_d}{12} \quad (2.18)$$

σ_{Det}^2 : durch die Detektion verursachte Varianz [m²]
 l_d : Breite der Detektionszone [m]

2.6.5 Probenadsorption

Analyt-Wand-Wechselwirkungen können stark zur Dispersion beitragen. Aufgrund vielfältiger Wechselwirkungsmöglichkeiten und geringer Diffusionskoeffizienten trifft dies besonders auf große Moleküle wie Peptide und Proteine zu. Je nach Stärke der Wechselwirkung kann dies zu einem Peaktailing oder im Extremfall zur totalen Adsorption der Probe führen.

2.6.6 Elektrodispersion

Elektrische Leitfähigkeitsunterschiede von Puffer und Probe führen zu Zonen unterschiedlicher Feldstärke. Infolge dieser inhomogenen Felder besitzt ein Analytmolekül während seiner Migration durch die Kapillare zeitlich variable elektrophoretische Mobilitäten. Hierdurch können die Signalbreite und Form verändert werden [28]. Eine größere Leitfähigkeit der Probenzone im Vergleich zum Trennpuffer führt zu einem kleineren elektrischen Widerstand in der Probenzone und somit zu einer Zonenverbreiterung. Im umgekehrten Fall, die Probenlösung besitzt eine geringere Leitfähigkeit als der Trennpuffer, besteht die Möglichkeit der Aufkonzentration (*STACKING*) des Analyten. Dieser Effekt ermöglicht die Analyse stark verdünnte Proben [29]. Ein Mobilitätsunterschied zwischen Analyt- und Elektrolyt-Ionen führt hingegen zu unsymmetrischen Signalen. So erhält man im Falle einer Probenzone mit geringerer Mobilität als der Trennpuffer ein Signal, das ein Tailing aufweist. Bei höherer Mobilität der Probenzone weist das Signal hingegen ein Leading bzw. Fronting auf.

2.7 Trennungsoptimierung

Zur Optimierung von Auflösung und Analysenzeit können eine Vielzahl von Parametern variiert werden, die mehr oder weniger stark eine Trennung beeinflussen. Hierzu zählen:

- Erhöhung der Spannung
- Variation des Elektrolyten
- Veränderung des pH-Wertes
- Veränderung der Temperatur
- Kapillarbeschichtungen

Über die Möglichkeiten der Einflußnahme wird im folgenden eingegangen.

2.7.1 Erhöhung der Spannung

Die Möglichkeit der Trennungsoptimierung durch Veränderung der Spannung wird durch die Gleichungen (2.15) und (2.19) aufgezeigt.

$$N = \frac{\mu_{eff} U}{2D} \quad (2.15)$$

N: Trenneffizienz [m^{-1}]
 μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität [$cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$]
 U: Spannung [V]
 D: Diffusionskoeffizient [m^2/s]

$$R = 0,18 \frac{\Delta\mu_{eff}}{\sqrt{\bar{\mu}_{eff}}} \cdot \sqrt{\frac{U}{D}} \quad (2.19)$$

R: Auflösung
 U: Spannung [V]
 D: Diffusionskoeffizient [m^2/s]
 $\Delta\mu_{eff}$ Differenz der effektiven Mobilitäten [$cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$]
 $\bar{\mu}_{eff}$ mittlere effektive Mobilität [$cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$]

Aus den Gleichungen (2.15) und (2.19) geht hervor, daß bei hoher Feldstärke und kleinen Diffusionskoeffizient der Analyten hohe Effizienzen und Auflösungen erzielt werden können. Dies ist auch verständlich, da mit abnehmender Verweildauer der Analyten im System weniger Zeit für die Diffusion zur Verfügung steht. Eine mit zunehmender Spannung ansteigende Wärmeentwicklung stellt jedoch für die erzielbaren Effizienzen bzw. Auflösungen einen begrenzenden Faktor dar.

Gleichung (2.19) zeigt ferner, daß eine Erhöhung der Auflösung durch Veränderung der Spannung nur im begrenzten Rahmen möglich ist. So ist zur Verdoppelung der Auflösung eine Vervierfachung der Spannung notwendig. Eine Veränderung der Selektivität ($\Delta\mu_{eff}$, $\bar{\mu}_{eff}$) stellt die effektivere Möglichkeit der Optimierung dar.

2.7.2 Wahl des Elektrolyten

Der Wahl des Elektrolyten kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie die effektivste Möglichkeit ist, die Selektivität einer Trennung zu verändern. Das Elektrolytsystem besteht aus einem organischen oder wässrigen Lösungsmittel, einem Puffer und gegebenenfalls Additiven.

- *Das Lösungsmittel:* Durch Wahl des Lösungsmittels kann Einfluss auf die Pufferlöslichkeit und die der Analyten genommen werden. Durch die Veränderung der Viskosität und der Dielektrizitätskonstante wird ferner die Mobilität der Analyten und des EOF beeinflusst.
- *Der Puffer:* Die Pufferkonzentration sollte so gewählt werden, daß der pH-Wert trotz einsetzender Elektrolyse konstant bleibt. Zudem soll die durch thermische Effekte auftretende Dispersion minimiert wird. Letzteres kann besonders durch Verwendung von organischen Puffern mit geringer Leitfähigkeit wie CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure) gewährleistet werden.
- *Additive:* Es gibt eine Vielzahl von Additiven, die auf unterschiedliche Weise die Selektivität einer Messung beeinflussen können. So können z. B. Polymere entweder die Kapillaroberfläche dynamisch belegen und somit die Anlagerung von Analyten reduzieren (Kap. 2.7.5.1) oder als Siebmedium dienen. Organische Lösungsmittel wirken durch Veränderung des EOF, der pK-Werte, der Analytmobilitäten und der Analytlöslichkeiten. Komplexierungsreagenzien verändern wiederum die Selektivität durch Ausnutzung sekundärer Gleichgewichte. Chirale Selektoren wie Cyclodextrine ermöglichen eine sehr selektive Komplexierung und werden häufig zur Trennung von chiralen Verbindungen eingesetzt (s. Kapitel 2.8).

2.7.3 Veränderung des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Selektivität hat folgende Gründe:

1.) Durch Veränderung des pH-Wertes können Ladungsunterschiede zwischen einzelnen Analyten eingestellt werden. Dies ist besonders bei schwachen Elektrolyten der Fall, da ihre effektiven elektrophoretische Mobilitäten stark vom Dissoziationsgrad und damit vom pH-Wert abhängen (Abbildung 2.6). Die größten Mobilitätsunterschiede erhält man bei einem pH-Wert des Puffers, der zwischen den pKa-Werten der Analyten liegt

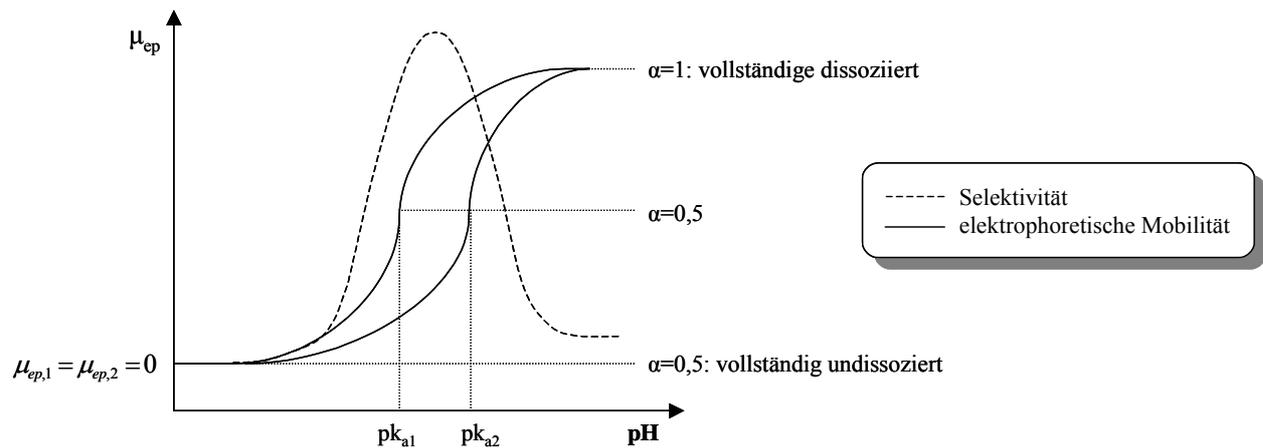


Abbildung 2.6 Die pH-Wert abhängige elektrophoretische Mobilität μ_{ep} schwacher Elektrolyte beeinflusst die Selektivität einer Trennung

2.) Es wird die elektroosmotische Mobilität verändert, deren Größe vom Ausmaß der Dissoziation der Oberflächensilanolgruppen abhängt. So nimmt der EOF mit steigendem pH-Wert zu. Ein höherer kathodischer EOF führt bei kathodenseitiger Detektion (Normalfall) zu kürzeren Analysenzeiten.

3.) Es besteht die Möglichkeit Analyt-Wand-Wechselwirkungen zu reduzieren. Dies ist durch Arbeiten in extremen pH-Bereichen möglich. So sind die Silanolgruppen von Glasoberflächen bei einem pH-Wert < 2 nahezu vollständig protoniert. Es resultiert eine verringerte Wechselwirkung mit positiv geladenen Analyten. Bei einem pH-Wert > 10 sind sowohl Wand als auch basische Verbindungen deprotoniert, was die Analyt-Wand-Wechselwirkungen ebenfalls stark minimiert.

2.7.4 Veränderung der Temperatur

Hierbei muß man zwischen der Temperatur des Elektrolyten und dem Temperaturgradienten unterscheiden. Während ein hoher Temperaturgradient zu einem Verlust an Trenneffizienz führt und grundsätzlich zu vermeiden ist (s. Kapitel 2.6.2), können höhere Temperaturen von Vorteil sein. So führen sie aufgrund der niedrigeren Viskosität der Lösung zu höheren Mobilitäten und damit kürzeren Analysenzeiten. Gleichgewichtseinstellungen werden beschleunigt, was zu höherer Effizienz führen kann, zudem wird die Löslichkeit oft verbessert. Eine Absenkung der Temperatur ermöglicht hingegen das Einfrieren von Gleichgewichten. Dadurch lassen sich z.B. Trennungen von Enantiomeren erzielen, die bei Raumtemperatur nicht möglich sind.

Ein weiteres Kriterium ist die Temperaturkonstanz. Aufgrund der hohen Temperaturabhängigkeit der Mobilitäten und der Komplexbildungskonstanten zwischen Analyt und chiralen Selektor von ca. 2% je °C Temperaturdifferenz ist eine gute Temperaturkontrolle wesentlich für eine hohe Reproduzierbarkeit [30].

2.7.5 Kapillarbeschichtungen

Die Leistungsfähigkeit einer CE-Analyse wird maßgeblich durch die Oberflächeneigenschaften der FS-Kapillaren bestimmt. Zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse müssen konstante Oberflächenverhältnisse gewährleistet sein. FS-Kapillaren besitzen an der Oberfläche Silanolgruppen (Si-OH), welche in Abhängigkeit vom pH-Wert dissoziieren. Die so entstandenen negativ geladenen Kapillaroberflächen verhalten sich adsorptiv gegenüber vielen Verbindungen. Insbesondere basische Proteine und oberflächenaktive Verbindungen wie Tenside stellen ein Problem dar, da sie irreversibel adsorbiert werden können mit der Folge permanent veränderter Oberflächeneigenschaften. Zur Entfernung der adsorbierten Komponenten werden unbeschichtete Kapillaren mit NaOH gespült. Hierbei kann es beim anschließenden Wechsel auf den Trennpuffer zu einer pH-Hysterese der Wandladung kommen. Diese wird durch eine sehr langsame Gleichgewichtseinstellung zwischen Kapillarwand und Puffer verursacht, was zu einer kontinuierlichen Änderung des elektroosmotischen Flusses führt [31]. Um

Hysterese-Erscheinungen zu minimieren, sind für ein reproduzierbares Arbeiten in unbehandelten Kapillaren standardisierte, zeitaufwendige Spülschritte (Konditionierung) von entscheidender Bedeutung. Als Alternative hierzu bieten sich oberflächenmodifizierte Kapillaren an. Bei ihnen wird die FS-Oberfläche durch eine geeignete Beschichtungen (Coating) gezielt chemisch verändert:

- So kann durch eine Beschichtung der Oberfläche sowohl der Betrag, als auch die Richtung des EOF verändert werden [32-35]. Eine Unterdrückung des EOF kann hierbei zu einer erhöhten Effizienz und Selektivität der Trennung führen, da der elektroosmotische Fluß nicht zur Trennung der Analyten beiträgt. Kapillaren mit geeigneten Beschichtungen zeigen eine zumeist größere Konstanz des EOF mit der Folge verbesserter Reproduzierbarkeit und Präzision von CE-Analysen.
- Zur Unterdrückung der Analyt-Wand-Wechselwirkung werden Beschichtungen eingesetzt, die gegenüber den zu untersuchenden Verbindungen eine geringere Adsorptivität aufweisen [36-39]. Hierdurch kann die Auflösung der adsorptiven Verbindung verbessert werden.

Für die Belegung von Kapillaren stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Man unterscheidet zwischen einer *dynamischen* und einer *permanenten Beschichtung*

2.7.5.1 Dynamische Beschichtungen

Die *dynamische Beschichtung* ist die am einfachsten durchzuführende Form der Modifikation. Dem Elektrolyten wird ein grenzflächenaktives Polymer oder Tensid zugesetzt, welches von der Oberfläche adsorbiert wird. Neutrale Polymere, wie Polyvinylalkohol (PVA) [40, 41], Hydroxyethylcellulose (HEC) [42] oder Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) [43] führen durch Abschirmung der negativen Oberflächenladungen von FS-Kapillaren vom Elektrolyten zu einem reduzierten kathodischen EOF. Bei kationischen Tensiden wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CATB) [44] oder Polymeren wie Polyvinylamin [45] hängt es hingegen von der Konzentration ab, in welchem Maße der EOF beeinflusst wird (Abbildung 2.7). Bei sehr kleinen Konzentrationen bildet sich eine monomolekulare Schicht (Fall B). Der

EOF wird vollständig unterdrückt. Mit zunehmender Konzentration orientiert sich eine zweite Tensidschicht in umgekehrter Lage zur ersten Schicht (Fall C). Die sich bildende Doppelschicht kehrt die Ladung der Wand von negativ zu positiv um. Die auf der Doppelschicht haftenden Pufferionen erzeugen nach Anlegen einer Spannung einen anodischen EOF. Wird schließlich die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) überschritten bilden die Tensidmoleküle Mizellen (Fall D). Diese Mizellen werden in der MEKC als pseudostationäre Phasen eingesetzt.

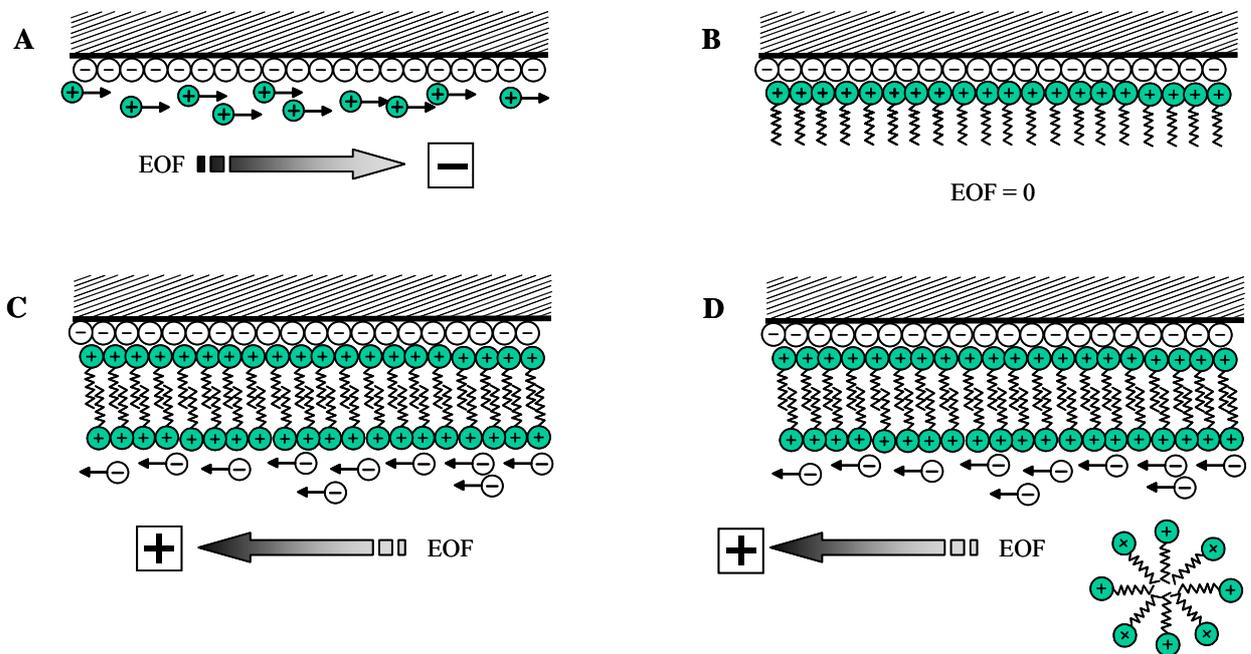


Abbildung 2.7 Dynamische Beschichtung einer FS-Oberfläche (A) mit einem kationischen Tensid. Mit zunehmender Tensidkonzentration wird der zunächst der EOF unterdrückt (B) hiernach umgepolt (C) und oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration werden schließlich Mizellen gebildet. (D).

Anionische Verbindungen werden wegen der fehlenden Coulomb-Anziehung nur schwach an FS-Kapillaren adsorbiert. Aus diesem Grund findet man in der Literatur nur wenige Hinweise auf die Verwendung von anionischen Polymeren. Ausnahmen sind Dextransulfat, Polygalacturonsäure und Polyvinylsulfonsäure, die zur Kontrolle des EOF bzw. bei Proteintrennungen eingesetzt wurden [46, 47].

Eine besondere Form der dynamischen Beschichtung stellt das sogenannte *successive multiple ionic polymer layers (SMIL)*-Verfahren dar [48, 49]. Hierbei wird

die Kapillare abwechselnd mit einer Lösung eines kationischen Polymers und eines anionischen Polymers gespült, was zu einem mehrschichtigen Coating führt.

Dynamische Beschichtungen sind sehr einfach durchzuführen, erfordern jedoch bzgl. einer guten Reproduzierbarkeit standardisierte Spülschritte.

2.7.5.2 Permanente Beschichtungen

Bei der *permanenten Beschichtung* erfolgt die Fixierung der Beschichtungskomponenten an die FS-Oberfläche auf chemischen Wege durch Bildung einer kovalenten Bindung oder durch thermische Immobilisierung von Polymeren. Kovalente Bindungen können durch Silylierung der an der Kapillaroberfläche befindlichen reaktiven Silanolgruppen (Si-OH) erhalten werden. Hierbei kommen u.a. die aus der Gaschromatographie entwickelten Derivatisierungsreaktionen zum Einsatz. Bei der Silylierung werden Silane (z.B. R₃-Si-Cl) mit der Silanolgruppe unter Ausbildung einer Siloxanbindung (Si-O-Si) umgesetzt. Auf diese Weise ist man in der Lage Funktionalitäten wie Trimethylsilyl- [32], Saccharide [50], RP-C8/C18 [51]- oder Pentafluoroarylgruppen [52] einzuführen (Abbildung 2.8). Enthält das Silan noch weitere reaktive Gruppen, so können diese dann gegebenenfalls im folgenden Reaktionsschritt(en) zur endgültigen Struktur umgesetzt werden (Abbildung 2.9A). Dieses Verfahren besitzt eine Reihe von Nachteilen. So können Silylierungsreaktionen keine ausreichende Desaktivierung der Oberfläche gewährleisten, da eine quantitative Umsetzung der vorhandenen Silanolgruppen nicht möglich ist und nicht umgesetzte Gruppen durch die relativ kleinen Strukturen der gebundenen Phase nicht effektiv genug abgeschirmt werden. Hocheffiziente

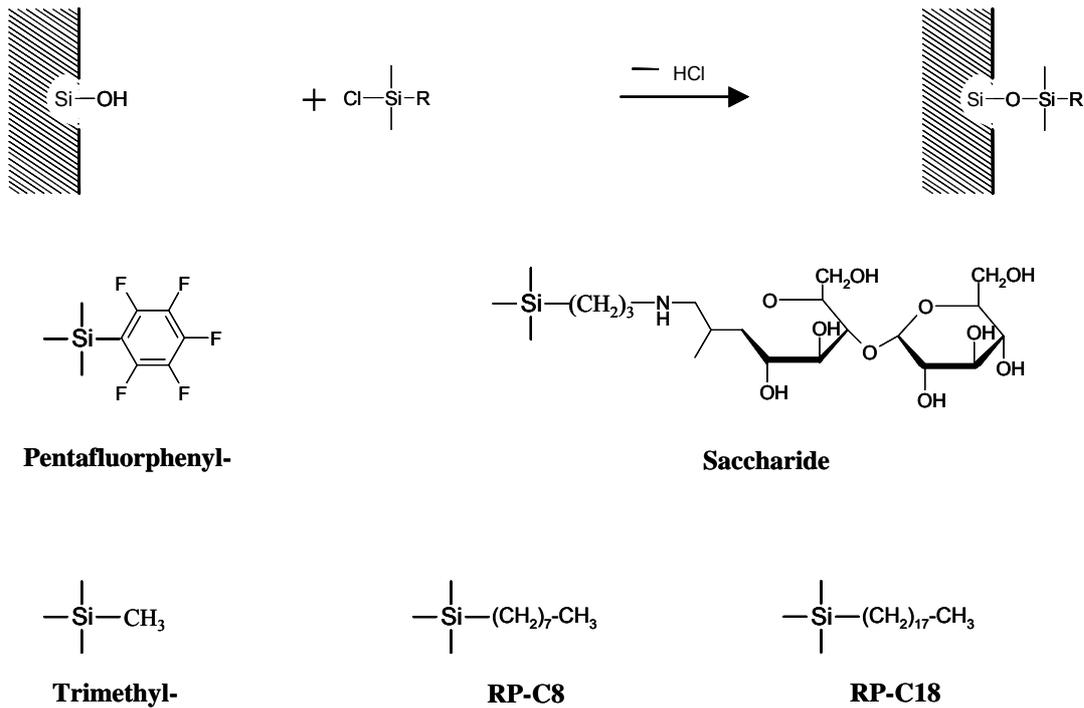


Abbildung 2.8 Erzeugung kovalent gebundener Beschichtungen durch Silylierung der reaktiven Silanolgruppen einer FS-Oberfläche

Trennungen sind somit nicht möglich. Ein weitere Nachteil ist die begrenzte Hydrolyse-Stabilität der Siloxanbindung unter alkalischen Bedingungen, wodurch eine begrenzte Langzeitstabilität gegeben ist. Bei polymeren Wandbeschichtungen (Abbildung 2.9) fallen diese Nachteile weniger ins Gewicht. Zur ihrer Herstellung erfolgt im ersten Schritt die Anbindung einer Komponente an die Kapillarwand entweder über eine kovalente Bindung (A) oder durch Adsorption (B). Im nachfolgenden zweiten Schritt wird dann entweder eine zweite die Oberflächeneigenschaften bestimmende Komponente copolymerisiert oder es erfolgt eine thermische Immobilisierung der ersten Schicht. Gegenüber den durch einfache Silylierung gebundenen Beschichtungen weisen polymere Wandbeschichtungen eine bessere Desaktivierung der FS-Oberfläche auf.

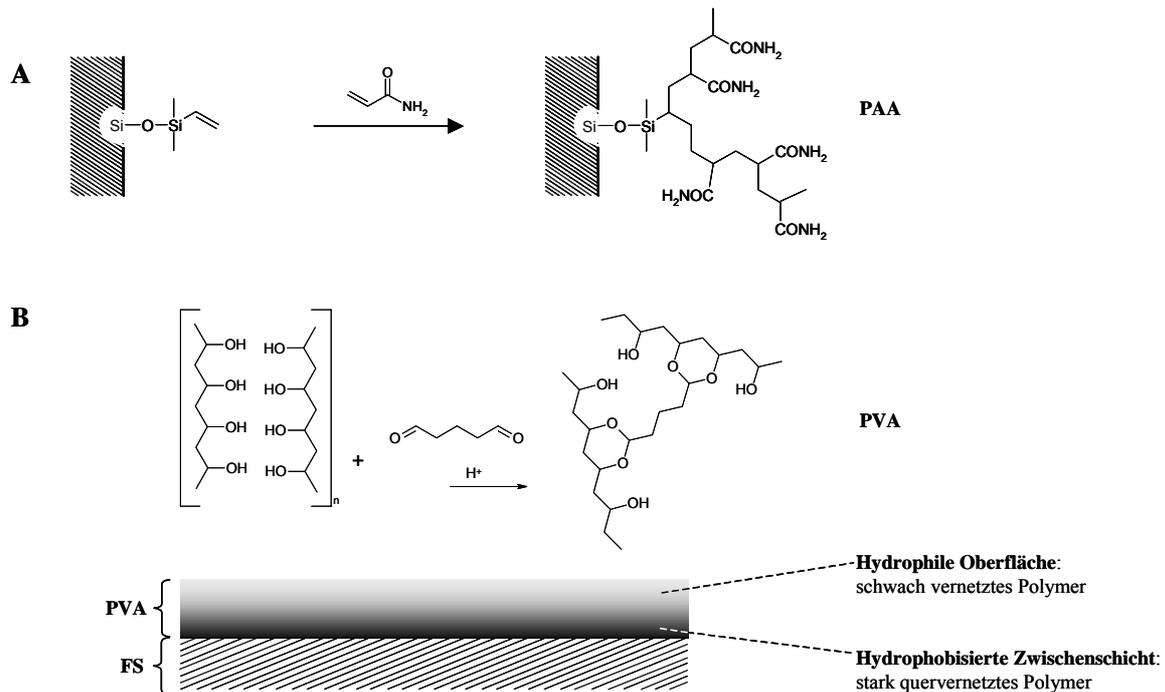


Abbildung 2.9 Erzeugung polymerer Wandbeschichtungen durch: (A) Polymerisation an einer kovalent gebundenen Ankergruppe [53] und (B) Quervernetzung einer adsorptiv gebundenen Verbindung.

Beschichtete Oberflächen finden bereits seit langen Anwendung in der Gaschromatographie und der Flüssigkeitschromatographie [54, 55]. Von den in der GC bzw. HPLC eingesetzten stationären Phasen eignet sich vor allem Polyethylenglycol (PEG) zur Beschichtungsmaterial in der CE.

PEG gehört zur Gruppe der hydrophilen nicht-ionischen Polymeren, die sich als besonders geeignet herausgestellt haben. Es besitzt in wässrigen Lösungen einen reduzierten kathodischen EOF und einen anodischen EOF in nichtwässrigen Elektrolyten [56]. Die Beschichtung wird meist durch chemische Bindung an die Kapillaroberfläche aufgebracht [35, 57]. Die Möglichkeit einer thermischen Immobilisierung konnte ebenfalls gezeigt werden [58].

Ein weiteres hydrophiles, nicht-ionisches Polymer ist Polyacrylamid (PAA) [59]. In der Flachbett-Elektrophorese werden Polyacrylamidgele schon lange als Trägermaterial zur Proteintrennung verwendet. Durch ihren hydrophilen Charakter gehen diese Gele nur geringe Wechselwirkungen mit Biomolekülen ein. Die Beschichtung von

Kapillaroberflächen erfolgt über kovalent gebundene Ankergruppen (Abbildung 2.9 A). PAA-Beschichtungen weisen einen stark unterdrückten EOF auf.

Permanente Beschichtungen mit Polyvinylalkohol (PVA) sind von Gilges et al. eingeführt worden [60]. PVA ist das hydrophilste, nicht-ionische Polymer. Es zeigt über einen weiten pH-Bereich einen sehr stabilen, stark reduzierten EOF und ermöglicht hocheffiziente Trennungen basischer Proteine. Als besonders praktikabel hat sich das von Belder und Husmann entwickelte Verfahren herausgestellt [61]. Hierbei erfolgt die Immobilisierung der PVA-Schicht durch Quervernetzung mit Glutardialdehyd (Abbildung 2.9 B). Die mit dieser Methode erzeugten PVA-Beschichtungen zeigten ein besonders hohe Langzeitstabilität [62].

2.8 Chirale Trennungen

Enantiomere besitzen eine identische elektrophoretische Mobilität. Um sie zu trennen, muß dem elektrophoretischen System eine chirale Information zugefügt werden. Dies geschieht durch Zugabe eines chiralen Selektors zum Elektrolyten [63]. Als chirale Selektoren werden bevorzugt Cyclodextrine (CD) eingesetzt. Neben den natürlichen CDs sind eine Vielzahl von CD-Derivaten kommerziell erhältlich. So können mit Hilfe derivatisierter ionischer Cyclodextrine auch ungeladene Verbindungen chiral getrennt werden.

Cyclodextrine besitzen einen chiralen Hohlraum (Kavität), in dem sich die Enantiomere (R-, S-) unter Bildung eines Gast-Wirt-Komplexes (CDR bzw. CDS) einlagern können. Hierbei wirkt das CD in dem Verteilungsgleichgewicht als pseudostationäre Phase. Aufgrund unterschiedlicher Komplexbildungskonstanten und Mobilitäten von freien und gebundenen Enantiomeren erfolgt nun die chirale Trennung in die beiden Antipoden. In der Abbildung 2.10 ist der Mechanismus der chiralen Trennung eines Anions mit Hilfe eines ungeladenen CD zu sehen. Da der EOF keinen Beitrag zur Trennung liefert, wird hier zur Vereinfachung von einem unterdrücktem EOF ausgegangen. Die Detektion erfolgt dabei an der Anode.

Beide Enantiomere (R-, S-) und die entsprechenden Gast-Wirt-Komplexe (CDR, CDS) liegen als Anionen vor. Aufgrund des größeren Ladung zu Masse

Verhältnisses sind die elektrophoretischen bzw. effektiven Mobilitäten der freien Enantiomere größer als die der komplexierten. Demzufolge wird das Enantiomer mit der höheren Affinität (Komplexbildungskonstante) zum CD später detektiert (Darstellung C).

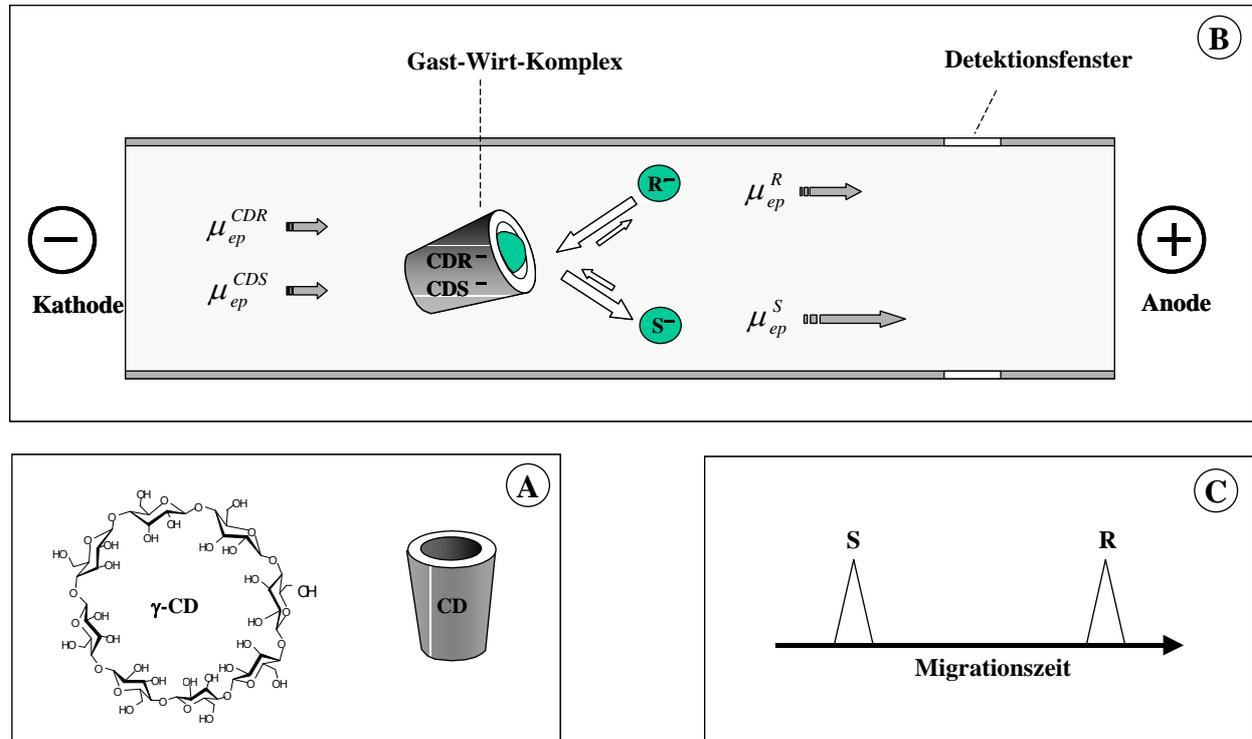


Abbildung 2.10 Verwendung eines ungeladenen Cyclodextrins (A) zur chiralen Trennung eines Anions bei unterdrücktem EOF (B) und das hieraus resultierende Elektropherogramm (C).

Die hier gemachte Annahme stellt eine starke Vereinfachung der Realität dar. Zur exakten Beschreibung müssten noch weitere, vom pH-Wert abhängige Gleichgewichtskonstanten berücksichtigt werden. Eine quantitative Beschreibung zwischen Gleichgewichtskonstanten und der Selektivität findet sich bei *Rawjee et al.* [64]. Eine Optimierung der Auflösung kann durch Erhöhung der Trenneffizienz, durch Unterdrückung des EOF, durch Oberflächenbeschichtungen und/oder Steigerung der Selektivität des Elektrolytsystems erfolgen. Letzteres gelingt durch Variation des pH-Wertes und der CD-Konzentration und/oder durch den Einsatz unterschiedlicher Selektoren.

3. Mikrochipelektrophorese

3.1 Einführung

Die analytische Chemie wird im zunehmenden Maße durch den Trend zur Miniaturisierung geprägt. So hat die Miniaturisierung der klassischen Flachbett-Elektrophorese zu Beginn der achtziger Jahre zur Entwicklung der Kapillarelektrophorese (CE) geführt. Eine noch weitergehende Miniaturisierung führte Anfang der neunziger Jahre zur Entwicklung der Mikrochip-Elektrophorese (MCE) [65-67]. Entscheidende Vorteile der Miniaturisierung von analytischen Trennverfahren sind die hohe Trenneffizienz, ein geringer Bedarf an Lösungsmittel und Probe, sowie die geringe Analysenzeit. Einen umfassenden Überblick über den Entwicklungsstand und den Anwendungsbereich der MCE findet man in kürzlich erschienenen Reviews [68-70].

Die grundsätzliche Idee eines miniaturisierten Trennsystems geht auf Steve Terry et al. zurück, der bereits in den späten 70er Jahren einen Gaschromatographen auf einen nur wenige Zentimeter großen Silicium-Wafer unterbrachte [71]. Die Apparatur bestand aus einer 1,5 m langen Kolonne und einem Injektorventil sowie einem thermischen Leitfähigkeitsdetektor. Mit Hilfe dieser Anordnung war man in der Lage ein organisch-chemisches Gemisch innerhalb von 10 Sekunden zu trennen. Obwohl die Auflösung nur relativ klein war, war das mögliche Entwicklungspotential erkennbar. Die Resonanz in der Wissenschaft blieb jedoch aus. So verging erst noch ein Jahrzehnt bis Manz et al. sein Konzept eines *miniaturisierten-Total-Analyse-Systems* (μ -TAS) als Alternative zu chemischen Sensoren in der Prozeßanalytik vorstellte [72]. Hierbei geht es um die Integration möglichst vieler Teiloperationen des analytischen Gesamtprozesses und die Miniaturisierung der Systemkomponenten auf Chipgröße. Die Durchführbarkeit wurde anhand einer elektrophoretischen Trennung zweier Farbstoffe auf einem Glas-Chip demonstriert. Auf diesem MCE-System konnte die Trennung im Vergleich zur CE in wesentlich kürzerer Zeit durchgeführt werden. Wenig später gelang dann die hochaufgelöste Trennung von Aminosäuren innerhalb von 15 Sekunden [73]. Die Anwendung der Elektrophorese in einem μ -TAS ist besonders einfach, da im Gegensatz zu chromatographischen Techniken keine beweglichen Teile wie Pumpen oder Ventile integriert werden müssen. Flußrate und Flußrichtung können leicht durch Veränderung elektrischer

Felder mittels Elektroosmose und Elektrophorese kontrolliert werden. Die Mikrochipelektrophorese bietet im Vergleich zur klassischen Kapillarelektrophorese folgende Vorteile:

- Die Verwendung sehr kurzer Kapillaren zur Erzielung hoher Feldstärken ist in der CE gerätetechnisch bedingt nur schwer realisierbar. Demgegenüber ist man in der MCE in der Lage Trennungen auf nur wenige cm große Mikrochips durchzuführen. Die geringen Dimensionen erlauben dabei die Anwendung hoher Feldstärken. Zudem ist es möglich, aufgrund der geringen Dimensionen der Kanäle, eine sehr schmale Probenzone zu injizieren, was die Bandendispersion weiter reduziert. Hohe Feldstärken bei gleichzeitig geringer Dispersion der Probezone ermöglichen Trennungen in kürzerer Zeit.
- Das Layout ermöglicht beliebige Kreuzungen von Kanälen ohne zusätzliche Totvolumina, so dass es z.B. möglich ist, eine Vorsäulenderivatisierung ohne Effizienzverlust auf dem Chip zu integrieren.
- Es besteht die Möglichkeit viele identische Kanäle auf einem einzigen Chip parallel anzuordnen, um einen hohen Probendurchsatz zu erzielen. Mit Hilfe eines solchen Mikrochip-Array-Systems konnten beispielsweise Mathies et. al. PCR-Fragmente von 384 Proben simultan in lediglich 325 s trennen [74].
- Der Proben- und besonders der Lösungsmittelbedarf ist sehr gering. Dadurch werden sowohl die Analysenkosten als auch die Umweltbelastung minimiert.
- Die Entwicklung kleiner, tragbarer, hochintegrierter Analysensysteme wird ermöglicht.

3.2 Aufbau und Funktionsweise eines Mikrochips

Der prinzipielle Aufbau eines Mikrochips ist in der Abbildung 3.1 zu sehen. Er besteht aus zwei Platten: einer Grund- und einer Deckplatte. Auf der Grundplatte befinden sich mikrofluidische Kanäle. Die Deckplatte dient zum Verschließen der Kanäle und besitzt zusätzliche Zugangsöffnungen, die als Elektrolytgefäße dienen. Über diese erfolgt die Befüllung des Chips mit dem Elektrolyten. Die Dimensionen der Kanäle werden durch den Herstellungsprozess bestimmt, welcher wiederum vom verwendeten Material abhängig ist. So führt das derzeit bevorzugte Verfahren zur Strukturierung von Glas mittels Photolithographie und anschließendem Ätzen mit Flusssäure aufgrund des isotropen Ätzzvorgangs zu Kanälen mit einem geringen Aspektverhältnisses, wobei die entstehenden Kanäle breiter als tief sind.

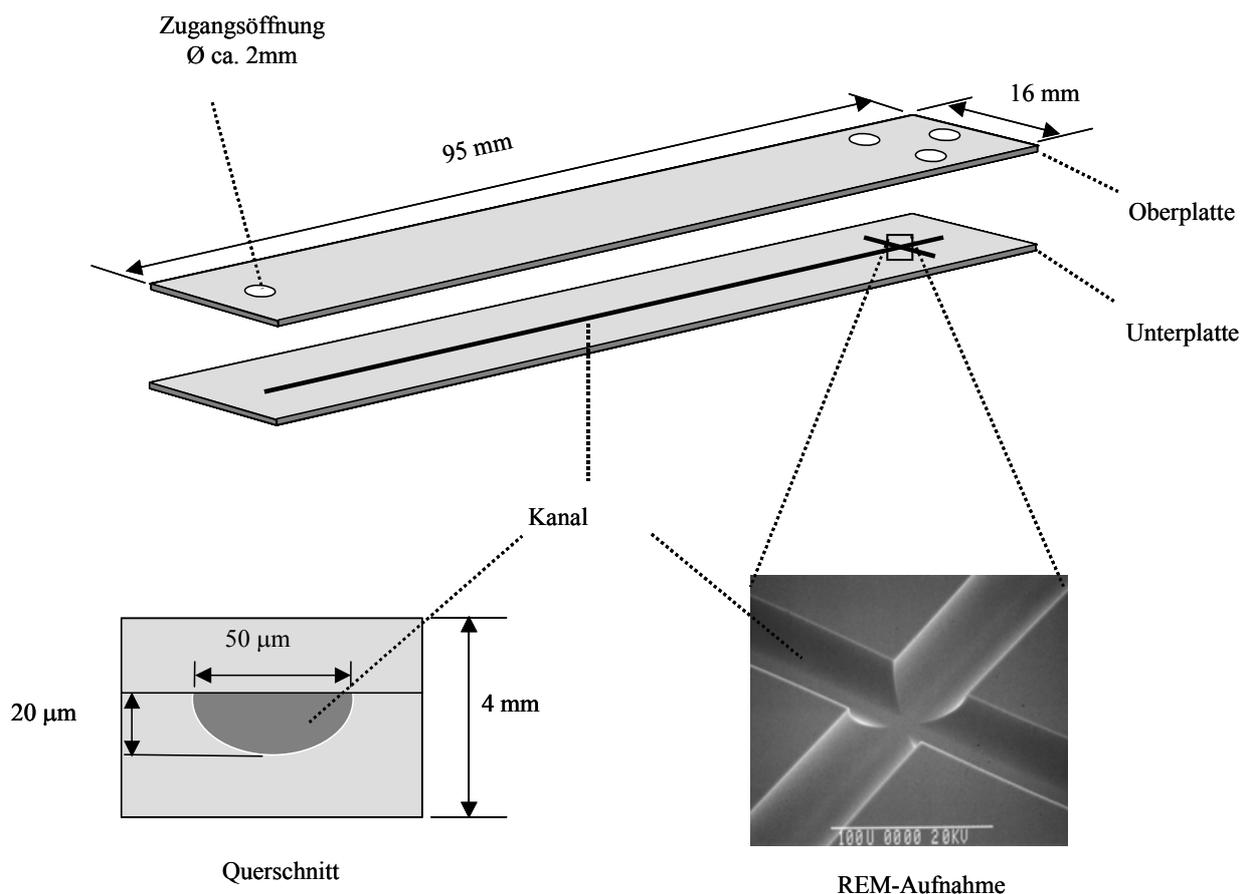


Abbildung 3.1 Prinzipieller Aufbau eines mikrofluidischen Chips

Die Anordnung der Kanäle auf dem Chip bestimmt das Mikrochip-Layout. Im einfachsten Fall besteht ein Chip aus zwei miteinander verbundenen Kanäle, die eine T-Struktur bilden (Abbildung 3.2A). Das am häufigsten verwendete Layout beruht auf zwei sich kreuzende Kanäle, einem langen Trennkanal und einem kürzeren Injektionskanal (Abbildung 3.2B). An den Enden eines jeden Kanals befindet sich jeweils ein Flüssigkeitsreservoir. Auf solchen Mikrochips wurden bereits verschiedene elektrophoretische Trennmethode einschließlich der CE [75], MEKC [76] und Gel-Elektrophorese [77] durchgeführt. Während die dabei erreichten Trennstufenhöhen, denen in der konventionellen CE entsprechen oder sogar übertreffen, sind die absoluten Effizienzen aufgrund der kleineren Trennstrecke in der Mikrochipelektrophorese meist geringer. Eine Verbesserung der Effizienz durch Spannungserhöhung ist nicht mehr möglich, da die vorhandenen Feldstärken bereits Werte erreicht haben, bei denen die Joulesche Wärme nicht mehr zu vernachlässigen ist. Eine alternative Methode ist die Erhöhung der Trennstrecke. Um die kompakten Dimensionen des Chips nicht zu vergrößern, müssen dann jedoch Trennkanäle mit Biegungen integriert werden mit dem Nachteil einer erhöhten Dispersion. Culbertson et al. konnten zeigen, dass durch ein bestimmtes Layout dieser zusätzliche Dispersionseffekt minimiert und in Grenzen gehalten werden kann [78]. Dabei war die Verkleinerung des Kapillardurchmessers am effektivsten (s. Abbildung 3.2D) [79]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Kanalkrümmung klein zu halten. Um hierbei die Chip-Dimensionen nur geringfügig zu vergrößern, muss ein Trennkanal in Form einer Spirale verwendet werden, wie es in der Abbildung 3.2E gezeigt wird. Diese Anordnungen ermöglichen zwar eine effizientere Trennung, jedoch ist eine Entwicklung von Array-Systemen nur schwer und im begrenzten Rahmen durchführbar. Neben der reinen Trennung von Analyten können auch Reaktionen auf einem Chip durchgeführt werden. Hierzu müssen zusätzliche Kanäle und Reservoirs auf dem Chip integriert werden. Abbildung 3.2F zeigt ein mögliches Layout eines solchen Chips, der für ein Immunoassay des Acetylcholinesterase-Inhibitors entwickelt wurde [80]. Substrat, Inhibitor, Enzym und Derivatisierungsreagenz werden auf dem Chip zur Reaktion gebracht und anschließend aufgetrennt und detektiert.

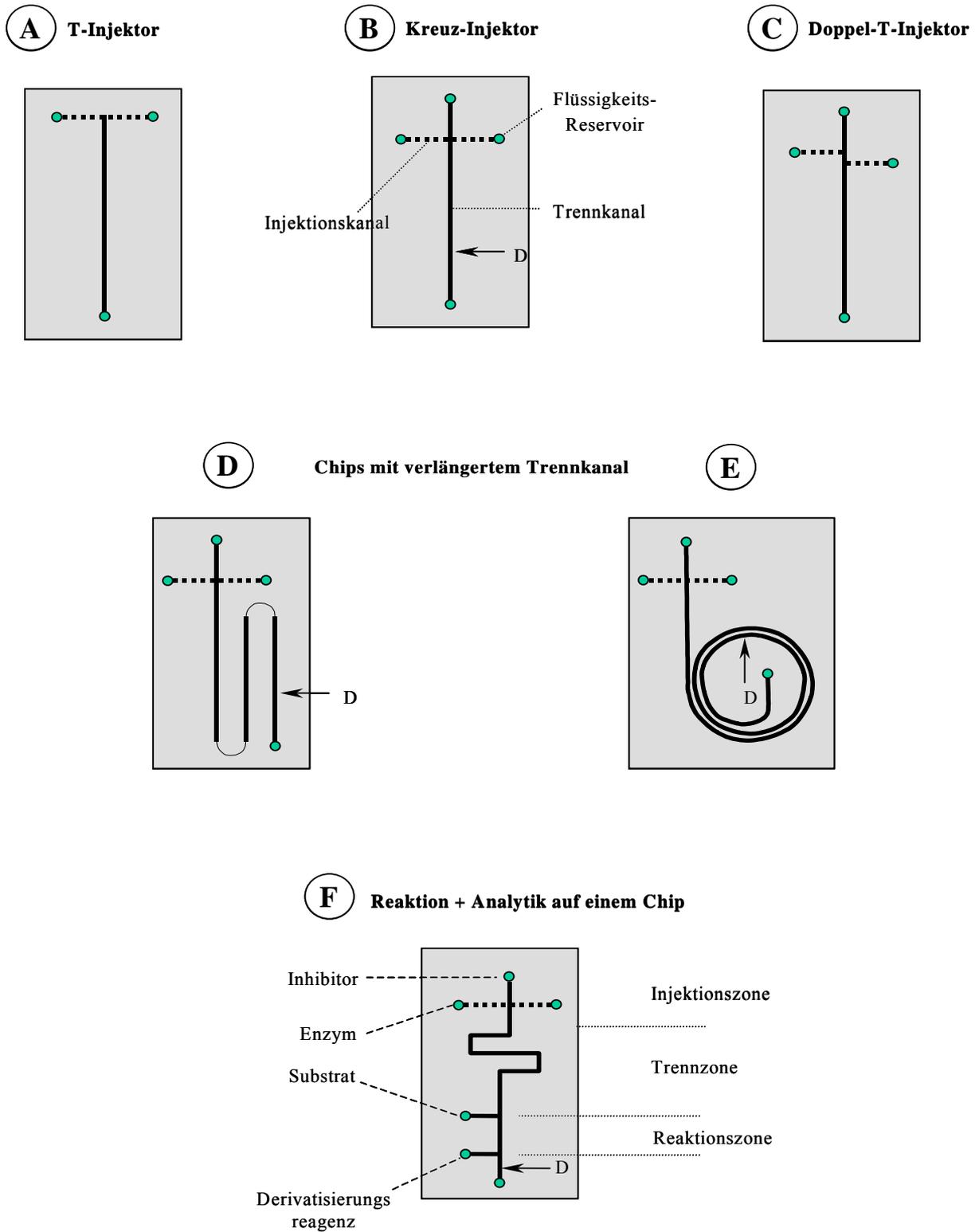


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung unterschiedlicher Mikrochip-Layouts

Der Transport von Elektrolyt und Probe in den Kanälen erfolgt mit Hilfe der Elektroosmose und Elektrophorese. Diese Prozesse werden durch elektrische Felder generiert, welche durch in die Reservoirs eintauchender Elektroden und einer Spannungsquelle erzeugt werden. Richtung und Geschwindigkeit des Stofftransports werden durch das Verhältnis der Feldstärken in den einzelnen Kanälen bestimmt und können über die anliegenden Spannungen gesteuert werden. Diese elektrokinetisch gesteuerten Systeme machen die Integration von mechanischen Bauteilen wie Pumpen und Spritzen überflüssig.

3.3 Probenaufgabe

Während das Trennprinzip in der Mikrochipelektrophorese dem der Kapillarelektrophorese entspricht, unterscheiden sich die Injektionsmethoden grundsätzlich. Im Gegensatz zur klassischen CE, bei der die Probe durch Austausch des Elektrolytgefäßes in die Kapillare überführt wird, erfolgt die Injektion in der MCE über zwei miteinander verbundene Kanäle. Ursprünglich wurde hierzu ein T-Injektor verwendet [66,72]. Aufgrund der Schwierigkeiten eine definierte Probenzone zu injizieren, wurde diese Anordnung nur selten eingesetzt [81] und im folgenden durch einen Kreuz- [67] oder Doppel-T-Injektor [82] ersetzt (Abbildung 3.2B-C). Die Steuerung des Injektionsprozesses in der Mikrochipelektrophorese erfolgt im Gegensatz zur Kapillarelektrophorese fast ausschließlich elektrokinetisch. An den Flüssigkeitsreservoirs werden dazu Potentiale entsprechender Stärke angelegt. Entlang der sich bildenden Feldstärkegradienten erfolgt dann der Puffer- bzw. Probenfluß. In lediglich einer Literaturstelle wird über die Verwendung des hydrodynamischen Injektionsmodus berichtet [83]. Je nach Arbeitsweise der elektrokinetischen Injektion unterscheidet man zwischen vier verschiedenen Methoden, die jeweils aus zwei Schritten bestehen. Im ersten Schritt wird der Injektionskanal komplett mit der Probe gefüllt, um dann im unmittelbar folgenden zweiten Schritt, den im Kreuzungsbereich befindlichen Teil zu injizieren und aufzutrennen.

3.3.1 Simplest injection

Diese Methode wurde bei den allerersten Mikrochip CE-Systemen eingesetzt [67,82]. In der Abbildung 3.3 wird das Funktionsprinzip der *simplest injection* graphisch dargestellt. Im 1. Schritt wird ein elektrisches Feld zwischen den Reservoirs 2 und 4 angelegt, während die Reservoirs 1 und 3 potentialfrei bleiben. Hierdurch wird der Injektionskanal komplett mit der Probe gefüllt. Zur Injektion wird nun im 2. Schritt ein Feld zwischen den Reservoirs 1 und 4 angelegt, während die Reservoirs 1 und 3 potentialfrei bleiben. Bei dieser Methode findet weder eine Fokussierung der Probe im Kreuzungsbereich statt, noch wird ein Nachströmen von Probe aus dem Injektionskanal in den Trennkanal im 2. Schritt verhindert.

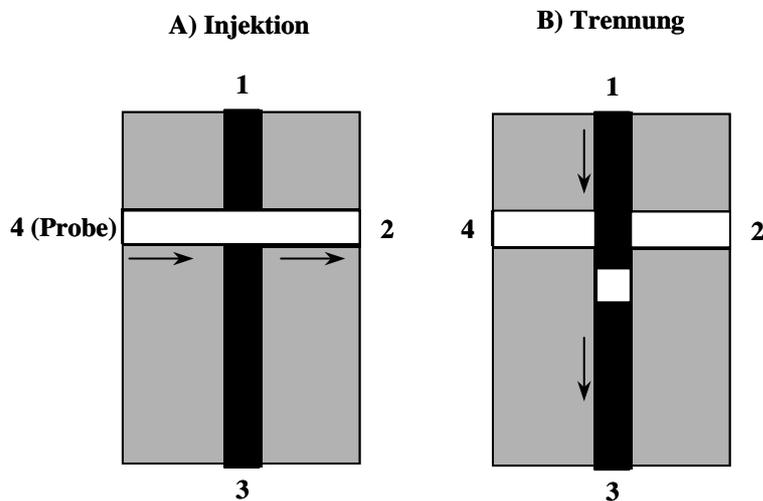


Abbildung 3.3 Funktionsprinzip der simplest injection

3.3.2 Floating injection

Im Gegensatz zur *simplest injection* wird bei dieser Injektionsmethode ein Nachlaufen von Probe aus dem Injektionskanal in den Trennkanal durch entsprechende Elektrolytströme aus dem Reservoir 1 nach 2 und 4 verhindert. Auf eine Fokussierung der Probe im 1. Schritt wird jedoch ebenfalls verzichtet (Abbildung 3.4). Diese Methode ist deshalb lediglich für Analyten mit kleinen Diffusionskoeffizienten wie z.B. DNA geeignet bei gleichzeitiger Verwendung eines

gelartigen Mediums [84, 85]. Verbindungen mit hohen Diffusionskoeffizienten können mit dieser Methode nicht reproduzierbar injiziert werden. Hierzu benötigt man Methoden, die eine Diffusion der Probe während beider Schritten verhindern. Dies hat zur Entwicklung der *pinched-* und *gated injection-*Methoden geführt.

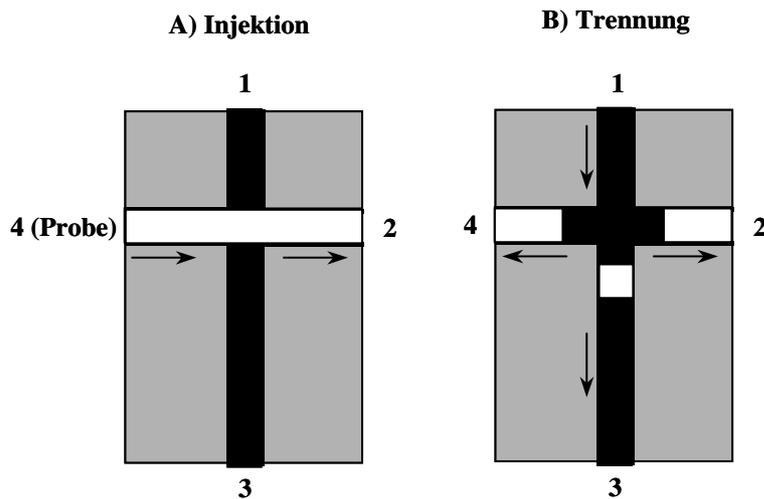


Abbildung 3.4 Funktionsprinzip der Floating injection

3.3.3 *Pinched injection.*

Die *pinched injection* ist die am häufigsten verwendete Injektionsmethode [86, 87]. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 3.5 dargestellt. Im 1. Schritt wird der Injektionskanal vollständig mit der Probe gefüllt. Mit Hilfe elektrischer Potentiale in den Kanälen 1 und 3 wird ein gegenläufiger Elektrolytstrom erzeugt. Dieser verhindert die Migration der Probe in den Trennkanal und schließt die Probe im Kreuzungsbereich ein (Bild A). Man kann die Wirkungsweise mit der einer Pinzette vergleichen (*pinch*: engl. Pinzette). Durch Umschalten der elektrischen Felder im nun folgenden 2. Schritt erfolgt die Injektion einer Probenzone und die Auftrennung in ihre Komponenten (Bild B). Aus dem Kanal 1 strömt hierbei Elektrolyt in die restlichen Kanäle. Ein Nachlaufen der Probe aus dem Injektionskanal in den Trennkanal 3 wird durch ausreichend hohe Ströme in den Kanälen 2 und 4 verhindert. Durch die Fokussierung der Probe im Kreuzungsbereich ist man in der Lage, eine sehr

schmale Probenzone zu injizieren und somit hocheffiziente Trennungen durchzuführen. Nachteilig wirkt sich jedoch die lange Injektionszeit aus, die typischerweise zwischen 10 s und 150 s liegt. Sie liegt damit im Bereich der für die Trennung der Analyten benötigten Zeitspanne und kann diese gegebenenfalls sogar übertreffen.

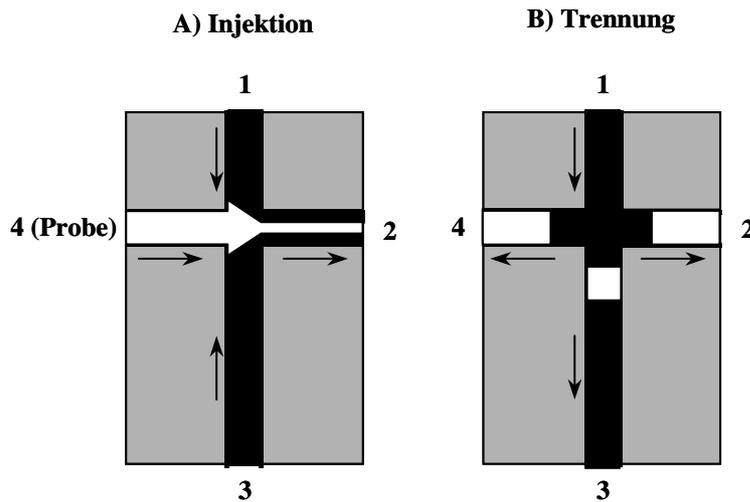


Abbildung 3.5 Funktionsprinzip der pinched injection

3.3.4 Gated injection

Schnellere Injektionen können mit Hilfe der *gated injection* erzielt werden [80, 85, 88, 89]. Im 1. Schritt strömt die Probe aus dem Reservoir 1 in Richtung des Reservoirs 2, während gleichzeitig Elektrolyt aus dem Kanal 4 in die Kanäle 2 und 3 fließt, um einen Probenfluss in den Trennkanal 3 zu verhindern (Abbildung 3.6A). Zur Injektion wird das Potential im Kanal 4 für eine kurze Zeitspanne von typischerweise 0,1 s - 0,5 s reduziert, wodurch die Probe in den Trennkanal 3 gelangen kann (B). Im anschließenden 2. Schritt werden die elektrischen Potentiale auf die ursprünglichen Werte zurückgesetzt. Die nun wieder einsetzende Strömung aus dem Kanal 4 trennt die im Trennkanal befindliche Probenzone vom Rest ab (C). Dieser Modus kann mit einem sich öffnenden und wieder schließenden Tor verglichen werden (*gate*: engl. Gatter, Tor). Im Vergleich zur *pinched injection* fließt bei der *gated injection* ein

kontinuierlicher Analytstrom über den Kreuzungsbereich. Dieser ermöglicht schnelle aufeinanderfolgende Injektionen ohne Zeitverlust wie sie beispielweise bei der Verfolgung der Kinetik schneller Reaktionen erforderlich sind.

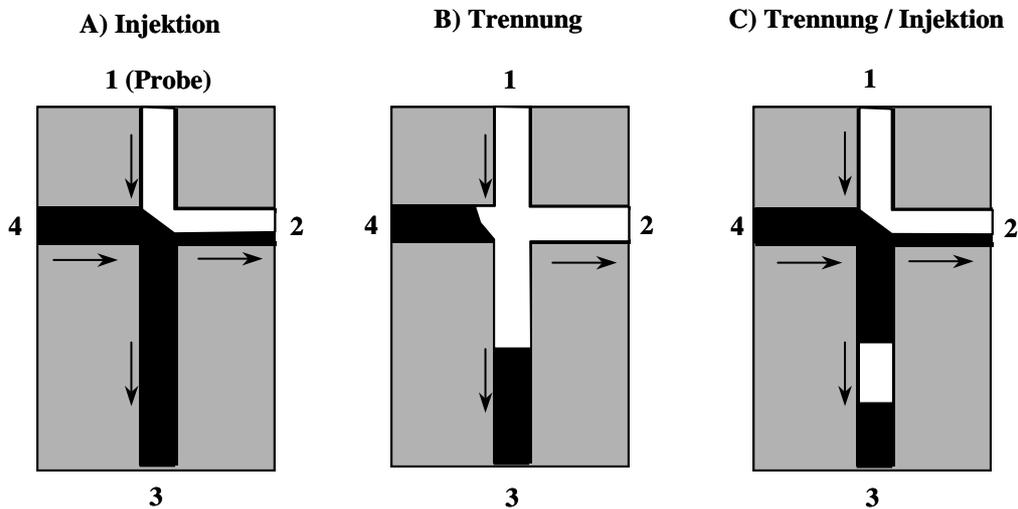


Abbildung 3.6 Funktionsprinzip der gated injection

3.4 Materialien

Zur Herstellung mikrofluidischer Strukturen stehen eine Reihe von Materialien und Methoden zur Verfügung. Glas und Quarz sind die zur Zeit verbreitetsten Materialien. Zur ihrer Strukturierung kann auf bereits etablierte photolithographische Techniken aus der Mikroelektronik zurückgegriffen werden. Mit diesen Techniken ist man in der Lage nur wenige μm große Kanäle herzustellen. Glas bzw. Quarz sind chemisch sehr inerte Materialien und zeigen ein gutes Transmissions- und Fluoreszenzverhalten. So ist Borosilikatglas ab etwa 300 nm durchlässig und zeigt bis etwa 320 nm eine nennenswerte Fluoreszenz. Quarz hingegen kann bereits ab 180 nm für UV-Messungen eingesetzt werden, zudem ermöglicht es Fluoreszenzmessungen ab etwa 200 nm (tiefes UV). Da die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) aufgrund ihrer Empfindlichkeit und einfachen Durchführung nach wie vor die Detektionsmethode der Wahl ist, bietet sich ein breites Anwendungsspektrum für diese Materialien. Zudem gibt es eine Vielzahl potentieller Methoden zur gezielten Oberflächenmodifikation (Kap. 5.2).

Eine interessante Alternative sind thermoplastische Polymere. Sie sind leichter zu bearbeiten als Glas bzw. Quarz und es wurden bereits eine Reihe von Bearbeitungsmethoden wie z.B. Prägetechniken beschrieben, die auf eine Vielzahl von thermoplastischen Polymeren wie Polydimethylsiloxan (PDMS) [90] oder Polymethylmethacrylat (PMMA) [91] anwendbar sind. Auf diese Weise können sehr kostengünstige Mikrochips in großer Stückzahl hergestellt werden [92]. Ein großer Nachteil von Polymeren wie PMMA ist ihre native Fluoreszenz im UV-Bereich sowie die nicht ausreichende chemische Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln.

Detektion

3.5 Detektion

Aufgrund der geringen Probenmenge ist die Verwendung sensitiver Detektionsmethoden von grundlegender Bedeutung. Die Anwendung der in der CE weit verbreiteten UV-Detektion ist in der MCE ebenfalls beschrieben worden [81, 93]. Die UV-Detektion ist jedoch nicht nur wegen der geringen optischen Weglänge problematisch. Auch die üblicherweise verwendeten Chip-Materialien weisen im UV-Bereich eine starke Absorption auf. Trotz dieser Nachteile ist seit kurzem ein kommerzielles System der Firma Shimadzu auf dem Markt erhältlich, welches Quarz als Chipmaterial einsetzt [94].

Ein wesentlich besseres Nachweisvermögen weisen Fluoreszenzmessungen auf. Hierbei werden, aufgrund einer um mehrere Größenordnung höheren spektralen Dichte (Intensität pro Wellenlängenintervall), hauptsächlich Laser als Anregungsquellen eingesetzt [95-99]. Mit Hilfe der laser-induzierten Fluoreszenzdetektion (LIF) war man so beispielsweise in der Lage, Fluorescein in einer 300 femtomolaren Lösung nachzuweisen [100]. Wesentlich kompaktere Dimensionen weisen Laser-Dioden auf, was sie hinsichtlich der Miniaturisierung des Gesamtsystems besonders attraktiv macht. Unter Verwendung einer roten (635 nm) Laser-Diode wurde eine Nachweisgrenze für Cy-5 von 9 pM erreicht [101]. Dies entspricht der Detektion von 900 Molekülen in einem Probevolumen von 1,6 pL. Die auf Halbleitertechnologie basierenden Diodenlaser sind jedoch nur für den infraroten und roten Bereich des elektromagnetischen Spektrums leicht verfügbar. Eine

mittlerweile auf dem Markt erhältlich violette Laserdiode (405 nm) erweitert zwar diesen Frequenzbereich, ihre begrenzte Lebensdauer und ihr hoher Anschaffungspreis machen sie jedoch für Routineanwendungen ungeeignet. Als Alternative zu Laserquellen werden vereinzelt auch Quecksilber-Hochdrucklampen eingesetzt, die erzielbare Empfindlichkeit ist jedoch geringer [102]. Nachteilig bei Fluoreszenzmessungen ist die häufig fehlende native Fluoreszenz, welche aufwendige Derivatisierungen mit einem Fluoreszenzmarker erforderlich machen.

Als Alternative zu den optischen Detektionsmethoden bieten sich elektrochemische Methoden an. Neben potentiometrischen und konduktometrischen wurden auch amperometrische Detektoren eingesetzt, die sich durch eine besonders hohe Empfindlichkeit auszeichnen. Die Erfassung einer Vielzahl von unterschiedlichen Substanzklassen ohne Derivatisierung gelingt durch Ausnutzung unterschiedlicher elektrochemischer Prozesse. Die Signalerfassung erfolgt bei elektrochemischen Methoden direkt über die Elektroden. Da diese leicht in den Analysenchip integriert werden können, ist eine Miniaturisierung des Gesamtsystems leicht durchführbar [103, 104].

Die Mikrochip-Elektrophorese wurde auch erfolgreich mit Massenspektrometern verbunden [105, 106]. Die Kopplung entspricht der der klassischen CE/MS, unter Verwendung einer Elektrosprayquelle.

4. Aufbau und Validierung eines robusten MCE-Systems

4.1 Einleitung

Da kommerzielle Mikrochipelektrophorese-Systeme für den wissenschaftlichen Gebrauch nicht verfügbar waren, wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit im Eigenbau ein System aufgebaut, das aus zwei Hochspannungsgeräten, einer Hochspannungsumschaltbox und einem LIF-Detektor mit Argon-Ionen-Laser bestand (MCE-1-System) [17]. Mit diesem System wurden die ersten erfolgreichen elektrophoretischen Trennungen auf einem Mikrochip durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß mit der MCE sehr schnelle chirale Trennungen von Aminen möglich sind, was diese Methode hinsichtlich des Hochdurchsatzscreenings von Produkten enantioselektiver Enzyme interessant macht. Im Falle des FITC-markierten 1-Cyclo-hexylethylamins wurde nahezu eine Basislinientrennung in weniger als zwei Minuten erreicht. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war jedoch sehr unbefriedigend. Dadurch wurde eine systematische Optimierung elektrophoretischer Trennungen erschwert. Als besonders problematisch erwies sich die exakte Positionierung des Trennkanals im Strahlengang und die fehlende Möglichkeit der visuellen Kontrolle des Injektionsprozesses. Ein weiterer Nachteil war die nicht vorhandene Möglichkeit, die Anregungswellenlänge frei zu wählen. Hierdurch konnten lediglich Fluoreszenzmarker mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm eingesetzt werden.

4.2 MCE-System auf Basis eines inversen Fluoreszenzmikroskops

Aufgrund der Erfahrungen mit dem MCE-1-System sollte im Rahmen dieser Arbeit ein neues, leistungsfähigeres System entwickelt und in Betrieb genommen werden (MCE-2-System), das die folgenden Anforderungen erfüllt:

- Möglichkeit der visuellen Beobachtung des Injektionsprozesses
- flexible Wellenlängenanregung zur Fluoreszenzdetektion
- hohe Nachweisempfindlichkeit
- variable Apertur für die Detektion

Ein System, das die oben genannten Anforderungen erfüllt, wurde auf Basis eines inversen Fluoreszenzmikroskops aufgebaut. Als Anregungsquelle zur Fluoreszenzanregung wurde eine Quecksilberdampfampe eingesetzt. Ein Photo dieses neuen Systems ist in der Abbildung 4.1 zu sehen. Die Systemkomponenten werden im folgenden beschrieben.

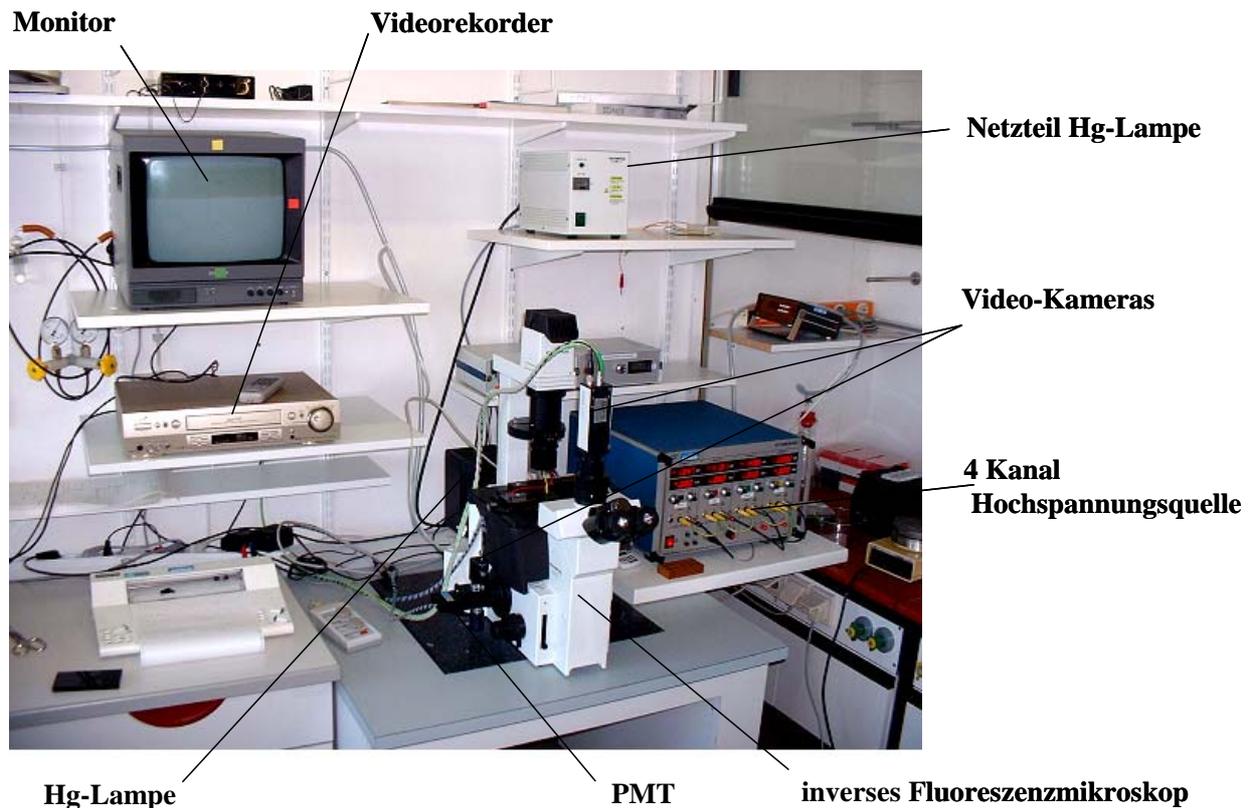


Abbildung 4.1 Photo des MCE-2-Systems auf Basis eines inversen Fluoreszenzmikroskops

4.2.1 Hochspannungsquelle

Als Hochspannungsquellen im MCE-1-System dienten zwei kommerziell erhältliche Instrumente von F.u.G.-Elektronik sowie eine Umschaltbox ausgestattet mit Reed-Relais zur Umschaltung der Spannungszustände. Diese Hochspannungseinheit wurde im neuen System durch ein bipolares Vier-Kanal-Hochspannungsgerät (HCV 40M-10000) ersetzt, das nach unseren Vorgaben von F.u.G.-Elektronik (Rosenheim,

Deutschland) gebaut wurde. Die elektrischen Potentiale können mit diesem Gerät in einem Spannungsbereich von -10 bis $+10$ kV voneinander unabhängig eingestellt werden. Der schnelle Wechsel zwischen 2 Spannungszuständen (< 1 ms für eine Potentialänderung von 100 % auf 10 %) kann sowohl manuell als auch über eine externe Software erfolgen.

4.2.2 Mechanische Komponenten

Alle mechanischen Komponenten wurden in den feinmechanischen Werkstätten des MPI für Kohlenforschung gefertigt. Zur Befestigung des Mikrochips auf dem Fluoreszenzmikroskop diente eine Chiphalterung aus Vitronit (Vitron, Jena, Deutschland), welche auf einem optischen Verschiebetisch platziert wurde (Abbildung 4.2A). Vitronit ist eine Glaskeramik mit geringer elektrischer Leitfähigkeit, einer hohen mechanischen Stabilität und geringer Fluoreszenz ab ca. 400 nm. Es ist wesentlich besser feinmechanisch verarbeitbar als das im MCE-1-System verwendete Plexiglas, wodurch eine exaktere Führung des Mikrochips über der Detektionseinheit ermöglicht wird. Ein zur Chiphalterung und Mikrochip passende Elektrodenplatte wurde aus geschwärztem Plexiglas angefertigt (Abbildung 4.2B). Auf ihr befinden sich vier Pt-Elektroden sowie ein IR-Langpassfilter.

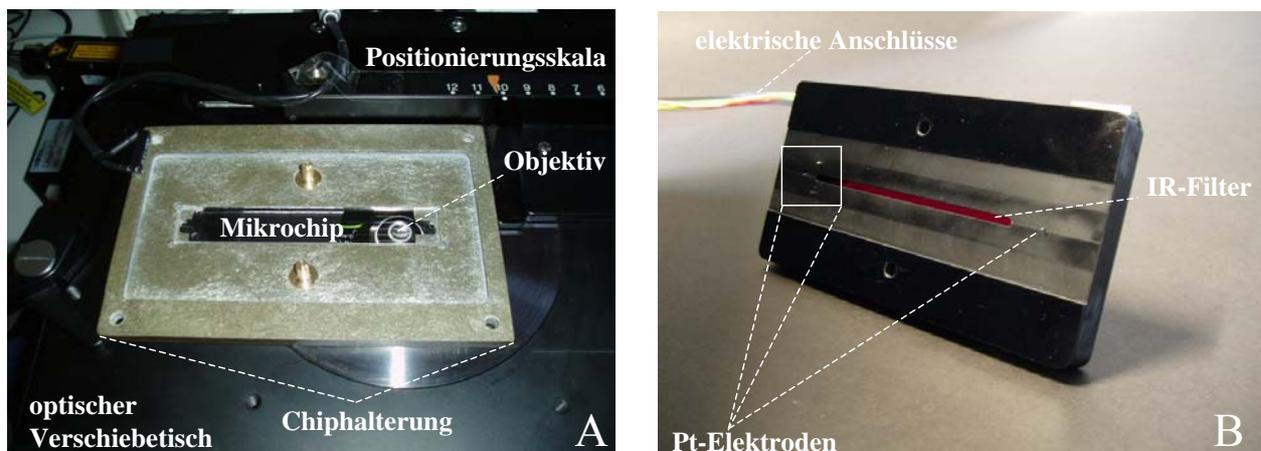


Abbildung 4.2 Chiphalterung aus Vitronit platziert auf einem Fluoreszenzmikroskop (A) und Elektrodenplatte aus geschwärztem Plexiglas mit Elektroden und IR-Langpassfilter (B).

4.2.3 Optische Komponenten

Der optische Teil besteht aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (IX 50) von Olympus (Hamburg, Deutschland). Als Anregungsquelle wird eine 100 W Quecksilberdampf-Hochdrucklampe verwendet. Zur Erzielung einer hohen Detektionsempfindlichkeit ist eine möglichst vollständige Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht von entscheidender Bedeutung. Für gebräuchliche Fluoreszenzfarbstoffe sind Filtersätze mit einer geeigneten Kombinationen aus Filtern und dichroitischen Spiegeln käuflich erwerblich. Für die Epi-Fluoreszenzdetektion der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe kommen zwei unterschiedliche Filterblöcke zum Einsatz. Jeder Filterblock enthält einen Bandpassfilter (450-480 bzw. 531-560 nm), einen Barrierefilter (>515 bzw. 574-648 nm) sowie einen dichroitischen Spiegel (500 bzw. 565 nm). Das Fluoreszenzlicht wird mit einem Photomultiplier (PMT) von Hamamatsu (Typ 7711-03) erfasst, welcher am seitlichen Ausgang des Mikroskops befestigt ist. Vor dem PMT befindet sich eine verstellbare optische Apertur, der sogenannte *viewfinder* (Till Photonics, Gräfeling, Deutschland). Mit Hilfe der Apertur wird ein rechtwinkliger Detektionsbereich definiert (Kap. 4.3.3). Eine am *viewfinder* befindliche IR-Kamera ermöglicht zudem die Ausrichtung des Trennkanals im Strahlengang (Kap. 4.3.2).

4.2.4 Mikrochip

Die bei Micralyne (Edmonton, Kanada) käuflich erworbenen Mikrochips bestehen aus Borofloat®, einem wenig fluoreszierenden Borosilikatglas von Schott (Schott Optische Gläser, Deutschland). Die miteinander verbundene Grund- und Deckplatte haben eine Dicke von jeweils 1,1 mm. Auf der Grundplatte befinden sich im Querschnitt 20 µm tiefe und 50 µm breite annähernd halbkreisförmige Kanäle. Die Gesamtlänge des Trennkanals beträgt 85 mm, wovon 80 mm für die Trennung zur Verfügung stehen. Der Injektionskanal ist 9 mm lang. Am Ende jedes Kanals befinden sich konische Pufferreservoirs mit einem Durchmesser von 2 mm und einem Fassungsvermögen von etwa 3 µl. Die Reservoirs werden im folgenden mit Buffer-Inlet (BI), Buffer-outlet (BO), Sample-Inlet (SI) bzw. Sample-outlet (SO) (Abbildung 4.3) bezeichnet.

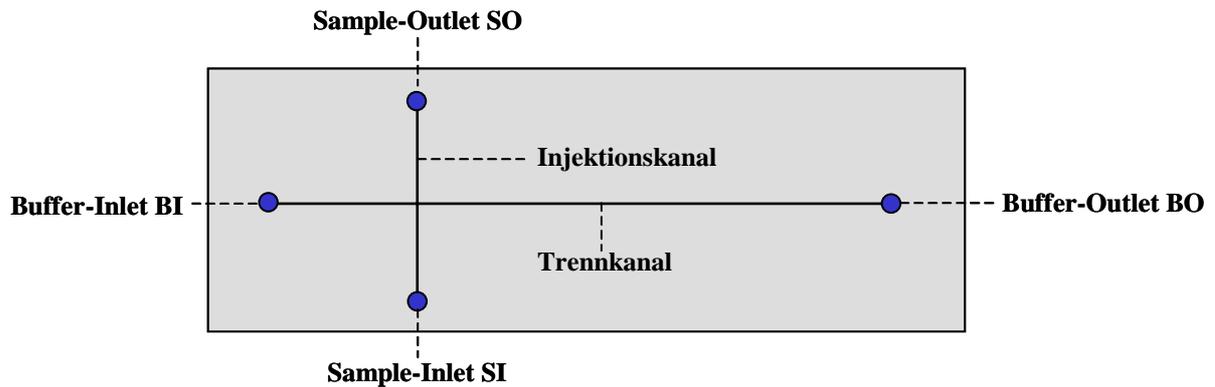


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung der verwendeten Mikrochips

4.3 Durchführung der MCE-Messungen

Zur Durchführung einer MCE-Messung wurden die Chip-Kanäle komplett mit Puffer gefüllt und die Reservoirs mit 2 μL Puffer bzw. Probe aufgefüllt. Einzelheiten sind dem Kapitel 6.7 zu entnehmen. Hiernach erfolgte eine Beobachtung des Injektionsprozesses (optional), eine Ausrichtung des Trennkanals im Strahlengang und schließlich die Injektion der Probe und die Erfassung der Messsignale. Die einzelnen Arbeitsabläufe werden im folgenden näher beschrieben.

4.3.1 Beobachtung des Injektionsprozess

Durch Beobachtung der Probenaufnahme können die Spannungsparameter hinsichtlich der Fokussierung der Probe im Injektionskanal und der anschließenden Injektion ermittelt und optimiert werden. Dieser Arbeitsschritt ist optional, d.h. er erfolgt bei der Entwicklung neuer Applikationen bzw. zur Kontrolle bei fehlerhaften Messungen. Zur Beobachtung des Injektionsprozesses wird das Injektionskreuz mit dem Licht einer Hg-Hochdrucklampe beleuchtet. Hierzu wird zunächst mit Hilfe eines Anregungsfilters (Bandpassfilter) aus dem Emissionsspektrum der Hg-Lampe ein für die Anregung des Fluorochroms geeigneter Wellenlängenbereich (450-480 bzw. 531-

560 nm) herausgefiltert. Im Innern des Filterblockes wird dieses Licht von einem dichroitischen Spiegel (500 bzw. 565 nm) umgelenkt und mit Hilfe eines Objektivs auf den Chip fokussiert, um dort die Probe zur Fluoreszenz anzuregen (Abbildung 4.4). Ein Teil des vom Chip zurückgeworfenen Lichtes wird vom Objektiv aufgefangen und in Richtung des dichroitischen Spiegels gelenkt. Das im Vergleich zum Anregungslicht langwelligere Fluoreszenz- und Streulicht kann den Spiegel passieren und gelangt schließlich zum Emissionsfilter (Barrierefilter: >515 bzw. 574-648 nm). Hier wird das Streulicht herausgefiltert und das Fluoreszenzlicht über einen Teilerspiegel schließlich zum Okular am Beobachtungstubus des Mikroskops geführt. Mit Hilfe einer Videokamera kann dann die Injektion verfolgt und dokumentiert werden.

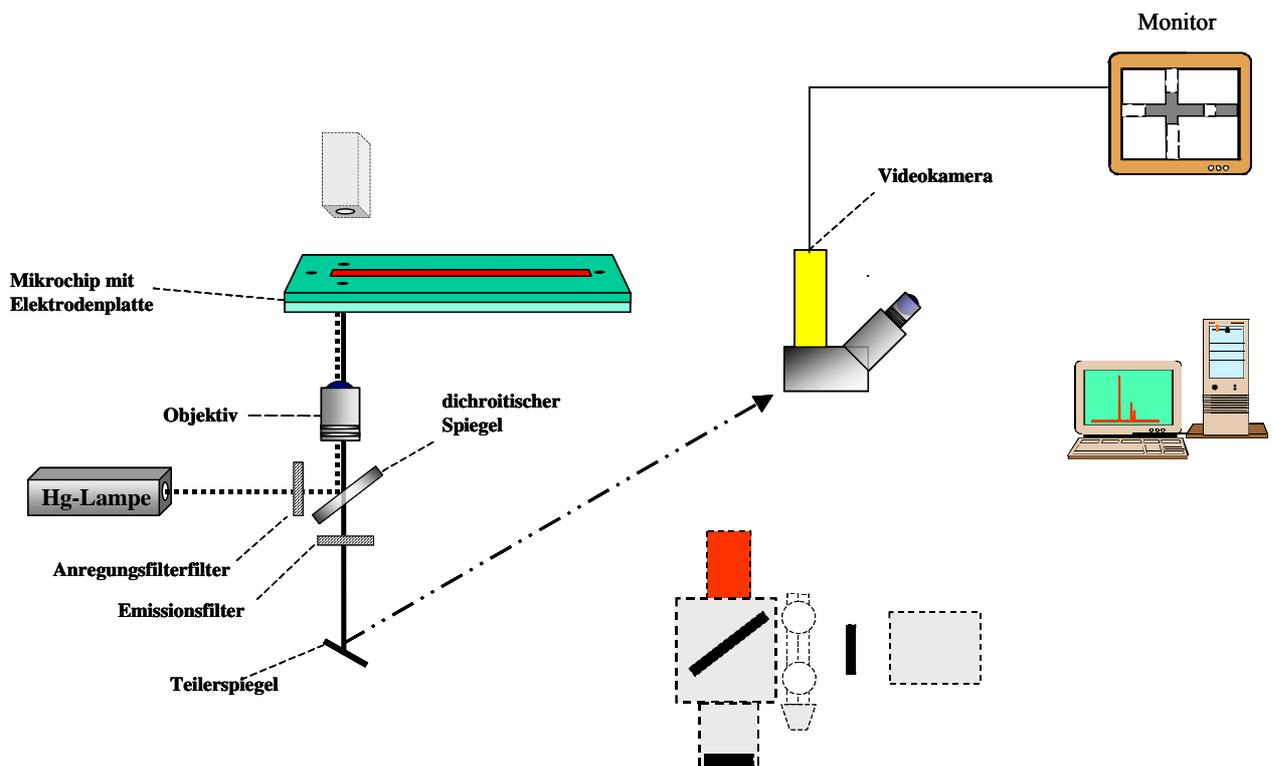


Abbildung 4.4 Funktionsschema zur Verfolgung der Probenaufgabe

4.3.2 Chipjustage

Die Ausrichtung des Trennkanals im Strahlengang erfolgt mit Hilfe des *view-finders*. Hierbei handelt es sich um eine variable Apertur, die nur das Fluoreszenzlicht des gewünschten Detektionsortes auf den Photomultiplier bringt und das restliche Licht ausblendet. Hierzu ist der *view-finder* mit einer IR-Kamera und einem komplexen Spiegelsystem ausgestattet, was eine exakte Abbildung des Spalts auf den Trennkanal ermöglicht. Das für die Justage notwendige Licht wird von einer Halogen-Auflichtlampe geliefert (Abbildung 4.5). Der auf der Elektrodenplatte befindliche IR-Langpassfilter lässt nur das notwendige Licht ab einer Wellenlänge von 600 nm durch. Mit Hilfe des Objektivs und des Teilerspiegels wird das so transmittierte Licht in den *view-finder* gelenkt und mit Hilfe einer IR-Kamera erfasst.

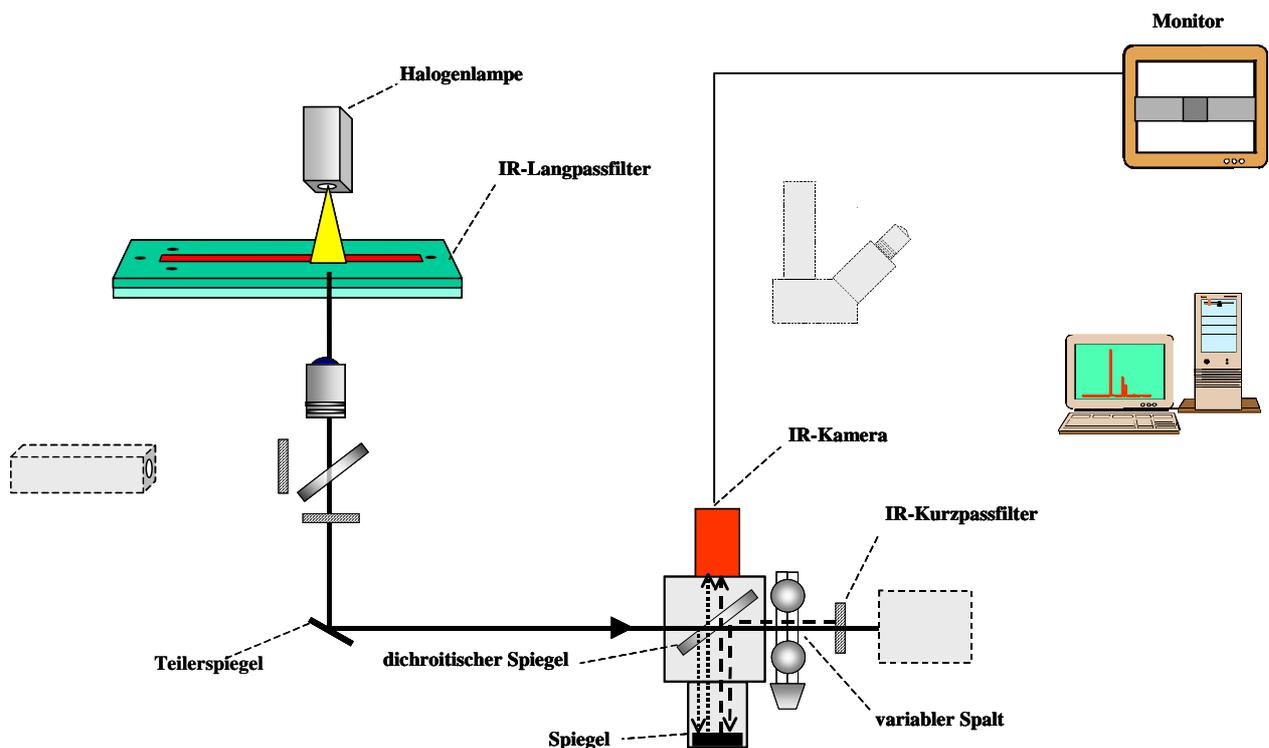


Abbildung 4.5 Funktionsschema zur Einstellung der Apertur und Ausrichtung des Trennkanals im Strahlengang.

4.3.3 Erfassung der Messsignale

Die Erfassung des Fluoreszenzlichtes des zuvor ausgewählten Bereiches erfolgt mit Hilfe des hinter dem *view-finder* angebrachten PMT (Abbildung 4.6). Um den Untergrund zu minimieren, wird hierzu das Halogenlicht ausgeblendet. Zur Datenaufnahme wurde der im Photomultiplier integrierte Verstärker mit einem Schreiber sowie mit der hausinternen Datenerfassungsanlage verbunden. Die Signale wurden mit der maximal möglichen Datenrate von 25 Hz aufgezeichnet. Zur Auswertung diente die hausinterne *Colachrom*-Software [107].

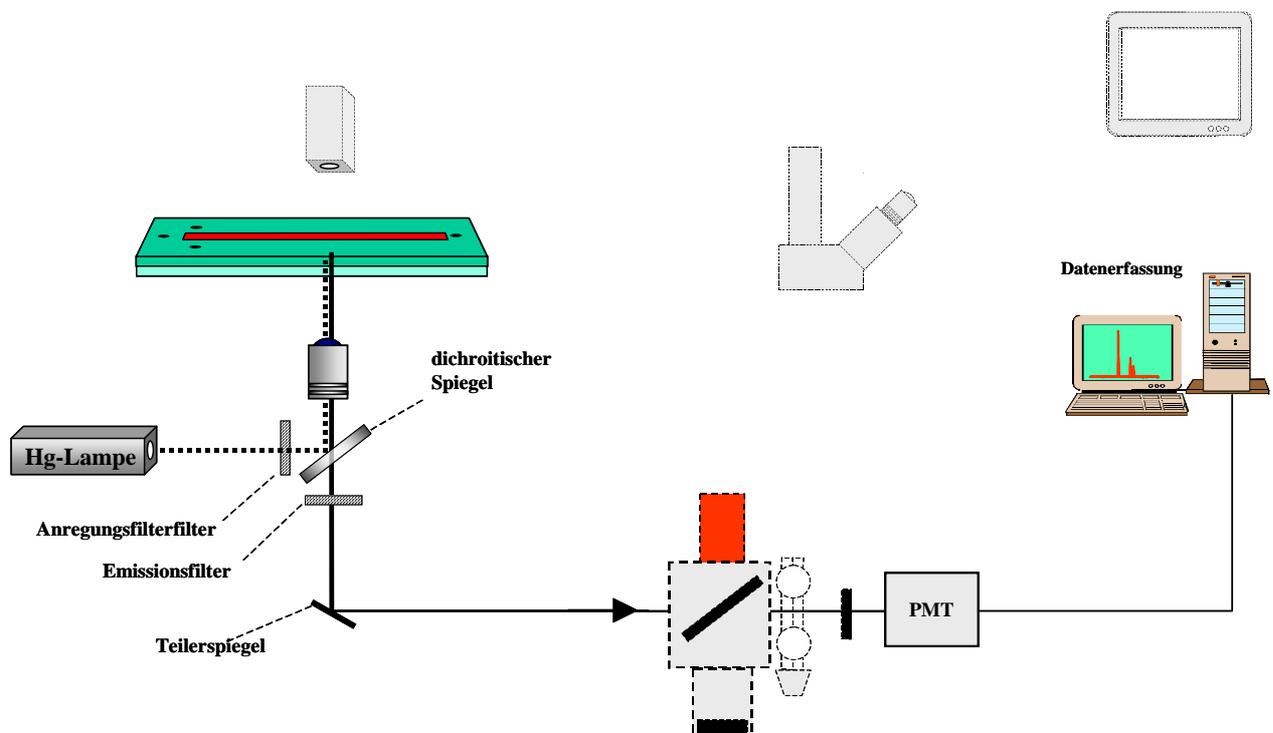


Abbildung 4.6 Funktionsschema zur Erfassung der Messsignale

4.4 Experimentelle Parameter der MCE

Mit der Entwicklung des MCE-2-Systems war es möglich, die experimentellen Parameter, welche die Leistungsfähigkeit in der Mikrochip-Elektrophorese bestimmen, gezielt zu untersuchen. Dabei sollten auch mögliche Fehlerquellen

identifiziert werden, um die zuvor unbefriedigende Reproduzierbarkeit des MCE-1-Systems zu verstehen und verbessern zu können.

4.4.1 Probenaufgabe

Der Probenaufgabe kommt in der MCE eine wichtige Rolle zu. So bestimmen die Verhältnisse der an den vier Reservoirs anliegenden Spannungen nicht nur die Breite der in den Trennkanal gelangenden Analytzone, sondern auch die im Trennkanal vorliegende Feldstärke. Von den vier in Kapitel 3.3 beschriebenen Methoden wurde in dieser Arbeit lediglich die *pinched-injection* eingesetzt. In Abbildung 4.7 sind drei Bilder einer Videosequenz einer erfolgreichen *pinched-injection* zu sehen. Die Verfolgung und Dokumentation dieses Injektionsprozesses gelang durch die in Abbildung 4.4 gezeigte Versuchsanordnung.

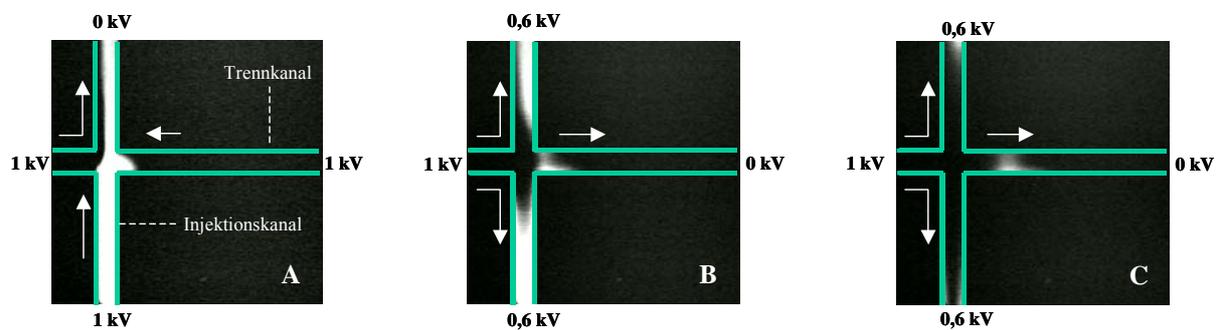


Abbildung 4.7 Drei Bilder aus einer Videoaufzeichnung einer erfolgreichen *pinched-injection*: Füllen des Trennkanals (A); Probenaufgabe (B); Beginn der Trennung (C). Die durch die Potentialeinstellungen resultierenden Flüssigkeitsströme werden durch die Pfeile angezeigt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit war es damit möglich, einen Zusammenhang zwischen der Probenaufgabe und dem resultierenden Elektropherogramm herzustellen. So zeigte sich, dass eine erfolgreiche Probenaufgabe stets zu einem entsprechenden Signal führte. Es kann somit gefolgert werden, dass die geringe Reproduzierbarkeit beim MCE-1-System hauptsächlich durch einen fehlerhaften Injektionsprozess verursacht wird. Bei den systematischen Untersuchungen des

Injektionsprozesses wurden verschiedene Faktoren erkannt, die den Injektionsprozess stören. Hierzu gehören:

- Partikel und Luftblasen in den Kanälen
- ein Feuchtfilm auf dem Chip, der zu Kurzschlüssen führt
- ein unterschiedlich starker EOF in den einzelnen Kanälen

Während die beiden ersten Punkte durch ein sorgfältiges und sauberes Arbeiten leicht zu vermeiden sind, ist die Kontrolle des EOF schwerer zu realisieren und nicht in allen Fällen möglich. Ein unterschiedlich starker elektroosmotischer Fluss in den vier Kanälen führt zu unterschiedlich starken Flüssigkeitsströmen und damit zu einer Störung des Injektionsprozesses. Dies kann auf folgende Faktoren zurückgeführt werden:

- Adsorption der Analyten an die Kanalwände
- Beim Spülen mittels Druck oder Vakuum werden in den Kanälen unterschiedliche Flüssigkeitsströme erzeugt. Diese führen zu einer unterschiedlich starken Konditionierung der Oberflächen.

Um einen konstanten elektroosmotischen Fluss zu gewährleisten, sind für ein reproduzierbares Arbeiten in unbehandelten Kapillaren standardisierte, zeitaufwendige Spülschritte zur Konditionierung der Kanaloberfläche von entscheidender Bedeutung. Eine Alternative ist die Verwendung oberflächenbeschichteter Kanäle. Das Problem einer irreversiblen Veränderung der Kanaloberflächen durch Adsorption von Analyten trat besonders bei längerem Gebrauch der Mikrochips auf. Bei diesen Mikrochips war es nicht mehr möglich eine Probenzone im Injektionskanal zu fokussieren bzw. eine definierte Probenmenge zu injizieren. Zwei Photos einer Videoaufzeichnung einer misslungenen Injektion und ein entsprechendes Elektropherogramm sind in der Abbildung 4.8 zu sehen. Aufgrund eines zu geringen EOF im oberen Arm des Injektionskanals wird die Probe während der Probenaufgabe (B) nur unzureichend zurückgespült. Dies führt zu einer sehr breiten Probenzone und zu einer Überladung des Trennsystems. Im Elektropherogramm führt dies zu einer unzureichend aufgelösten Signalgruppe mit starkem Tailing. Zur Vermeidung einer fehlerhaften Injektion bei unterschiedlichen

EOF in den Kanälen, müssen entweder die Kanaloberflächen neu konditioniert oder die einzelnen Potentiale neu eingestellt werden. Letzteres ist bei sich ständig ändernden EOF nicht praktikabel.

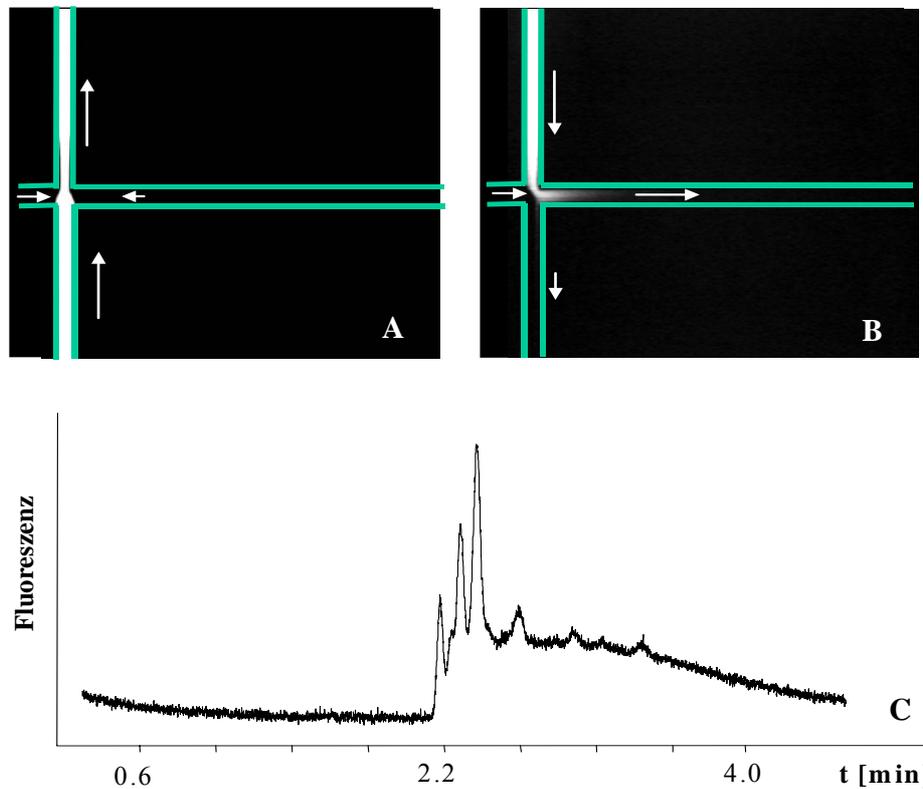


Abbildung 4.8 Zwei Bilder (A) und (B) aus einer Videosequenz einer fehlerhaften *pinched-injection* und ein hieraus resultierendes Elektropherogramm (C). Die durch die Potentialeinstellungen resultierenden Flüssigkeitsströme werden durch die Pfeile angezeigt. Die Potentialwerte entsprechen denen der Abbildung 4.7.

4.4.2 Trennstrecke

Mit dem MCE-2-System kann die für die Trennung nutzbare effektive Trennstrecke leicht verändert werden. Hierzu wird die Chiphalterung samt Mikrochip mit Hilfe des Verschiebetisches auf eine entsprechende Position gefahren (vgl. Abbildung 4.2). Die maximal mögliche effektive Trennstrecke beträgt 7 cm.

Der Einfluss der Trennstrecke auf Auflösung und Effizienz einer MCE-Trennung ist am Beispiel eines Fluoresceinisothiocyanat (FITC) derivatisierten Amin-Gemisches untersucht worden (s. Abbildung 4.9).

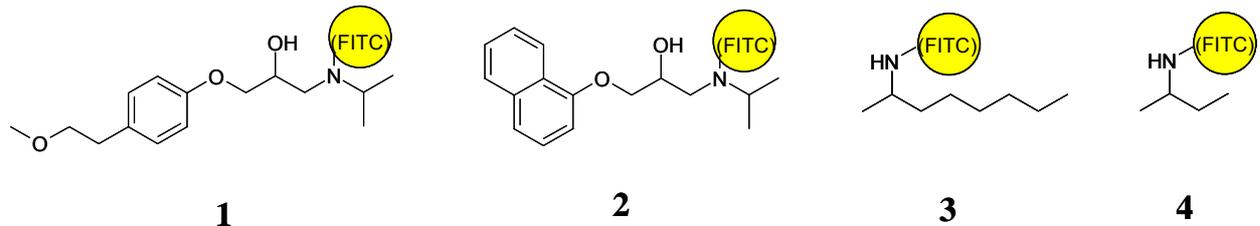


Abbildung 4.9 Strukturen der für die achirale Trennung verwendeten FITC-Amine. Die bei ca. 490 nm anregbaren fluoreszierenden Verbindungen liegen bei pH 9,2 als elektrophoretisch trennbare Anionen vor.

Hierzu wurde an drei verschiedenen Orten detektiert. Die effektive Trennstrecke betrug 3,9 cm, 5,2 cm und 7,0 cm. Die erhaltenen Elektropherogramme sind in der Abbildung 4.10 gezeigt. Für die folgende Diskussion der Ergebnisse werden die Signale von FITC-2-Oktylamin (3) und FITC-2-Butylamin (4) herangezogen. Wie in der Abbildung 4.10 zu sehen ist, stiegen die Auflösung R und die Trenneffizienz N mit zunehmender Wegstrecke. Während bei verkürzten Wegstrecken die Signale 3 und 4 lediglich angetrennt werden konnten, wurde bei einer Wegstrecke von 7 cm eine Basislinientrennung erzielt. In Zahlen ausgedrückt führte eine Vergrößerung der effektiven Trennstrecke von 3,9 cm auf 7 cm (+80%) zu einer Verbesserung der Auflösung R_{34} von 0,93 auf 1,5 (+60%) und einer Steigerung der Trenneffizienz N_4 von 23000 auf 70000 (+200%). Diese Verbesserung der Trennleistung wurde bei gleichzeitiger Zunahme der Migrationszeit erzielt.

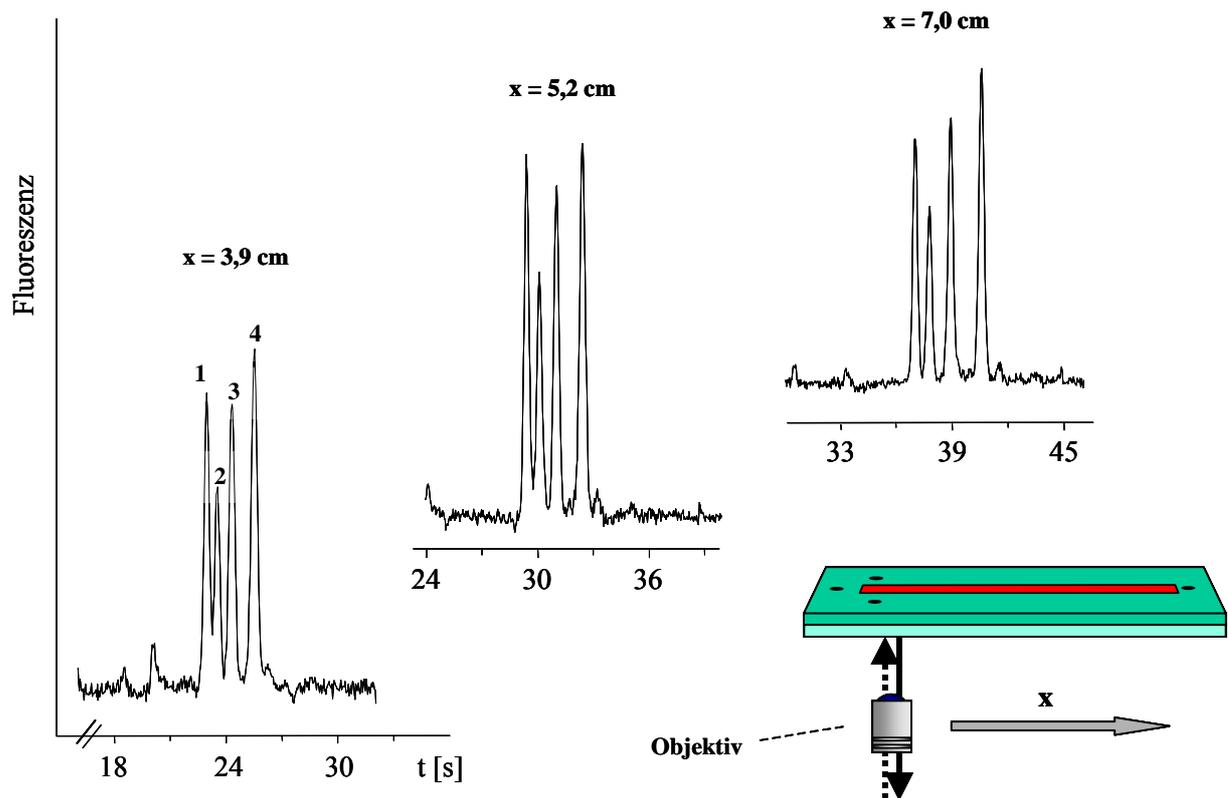


Abbildung 4.10 Einfluß der effektiven Trennstrecke x auf die Trenneffizienz einer achiralen Trennung. Probe: Mischung aus FITC-markierten Aminen. Die Nummerierung der Signale entspricht denen der Abbildung 4.9. Probenkonzentration: $0,2 \mu\text{M}$. Puffer: 40 mM CHES , $\text{pH } 9,2$. Injektionspotentiale: BI, BO und SI $4,0$; SO 0 [kV]. Trennpotentiale: BI $4,0$; BO 0 ; SI und SO $3,2$ [kV].

4.5 Chirale Trennungen

Während die Trennung von Enantiomeren mittels klassischer Kapillarelektrophorese (CE) mittlerweile zu einer etablierten Technik geworden ist, wurden anspruchsvolle chirale Trennungen auf mikrostrukturierten Chips bislang kaum beschrieben. Ein Grund hierfür ist die geringe zur Verfügung stehende Trennstrecke, welche eine besonders hohe Selektivität des Trennsystems erfordert. Einen guten Überblick hierzu findet man in einem kürzlich erschienenen Review [108]. Trotz der limitierten Trennstrecke gelang es Belder et. al [17] mit dem lasergestützten MCE-1-System unter nicht optimierten Bedingungen erste vielversprechende Ergebnisse bei der chiralen Trennung eines FITC-derivatisiertem Amins zu erzielen. Das fluoreszenzmarkierte Amin besitzt bei etwa 490 nm ein Adsorptionsmaximum und liegt im alkalischen als elektrophoretisch trennbares Carboxylat-Ion vor. Das

Vorhandensein einer inherenten elektrophoretischen Mobilität erleichterte die chirale Methodenentwicklung. In diesem Fall konnte eine chirale Trennung mit ungeladenen Cyclodextrinen (CD) bzw. CD-Derivaten erfolgen, die in einer großen Vielzahl kommerziell verfügbar sind. Während in der CE mit einer 54 cm langen FS-Kapillare (effektive Trennstrecke 40 cm) in etwa 3,5 min eine Basislinientrennung der beiden Enantiomeren erzielt werden konnte, war es mit der MCE lediglich möglich, eine Antrennung zu erzielen (Abbildung 4.11 A, B).

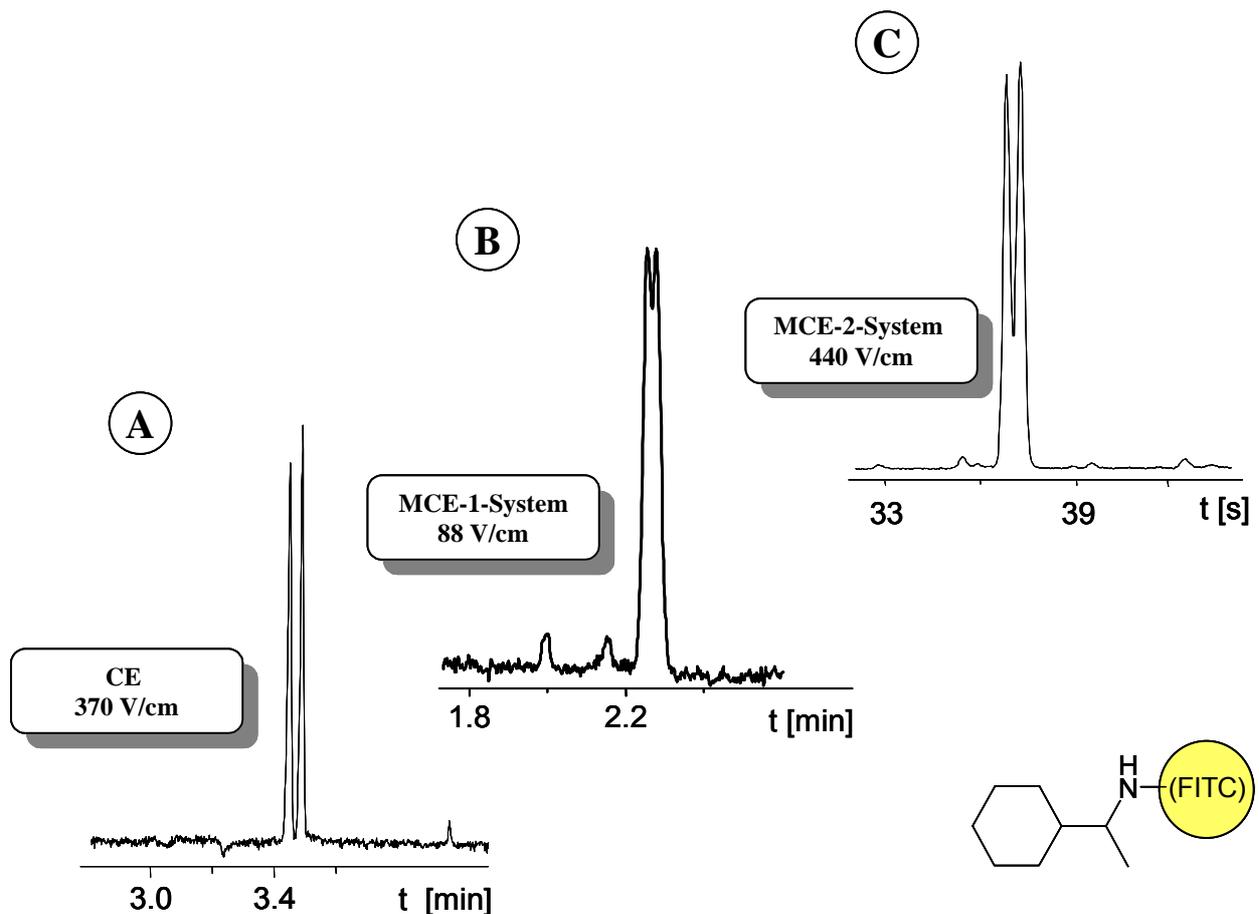


Abbildung 4.11 Vergleich der chiralen Trennung einer identischen Probe durchgeföhrt in der klassischen CE (A) und MCE (B) bzw. (C) Probe: Mischung aus FITC-markiertem (R)-(-) und (S)-(+)-1-Cyclohexylethylamin. Probenkonzentration: 2 μ M. Elektrolyt: 40 mM CHES, 6,25 mM HP- γ -CD, pH 9,2.

Hinzu kam die extrem geringe Reproduzierbarkeit der Messungen, die eine Optimierung der Trennparameter unmöglich machte. Dies gelang erst während dieser Arbeit durch den Aufbau des MCE-2-Systems. In der Abbildung 4.11 C ist eine

chirale Trennung unter optimierten Bedingungen dargestellt. Unter diesen Bedingungen konnte auf einer Trennstrecke von 7 cm in lediglich 38 s eine Auflösung von 0,9 erzielt werden.

4.6 Validierung des MCE-2-Systems

4.6.1 Reproduzierbarkeit

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit (Präzision) unter Wiederholbedingungen wurden 25 aufeinanderfolgende Trennungen eines Gemisches aus drei Rhodaminfarbstoffen durchgeführt. Aufgrund der hohen Selektivität gelang die Trennungen auf einer Trennstrecke von lediglich 1,6 cm. Die Trennung erfolgte bei Spannungsparametern, die ein maximales Signal-Rausch-Verhältnis gewährleisten. Durch das im Vergleich zur CE sehr viel geringere Elektrolytvolumen von 2 μL je Reservoir wird schon nach kurzer Zeit eine „Erschöpfung“ des Elektrolyten festgestellt, was zu einer Veränderung der Migrationszeit führt. Zur Erzielung einer hohen Präzision erfolgten die Messungen daher mit jeweils frischer Elektrolytlösung. Hierzu wurde der Chip zwischen den einzelnen Messungen 30 s lang mit der Elektrolytlösung gespült. Die erzielten relativen Standardabweichungen (RSD) der Migrationszeiten von < 2,6 % sind der Abbildung 4.12 zu entnehmen.

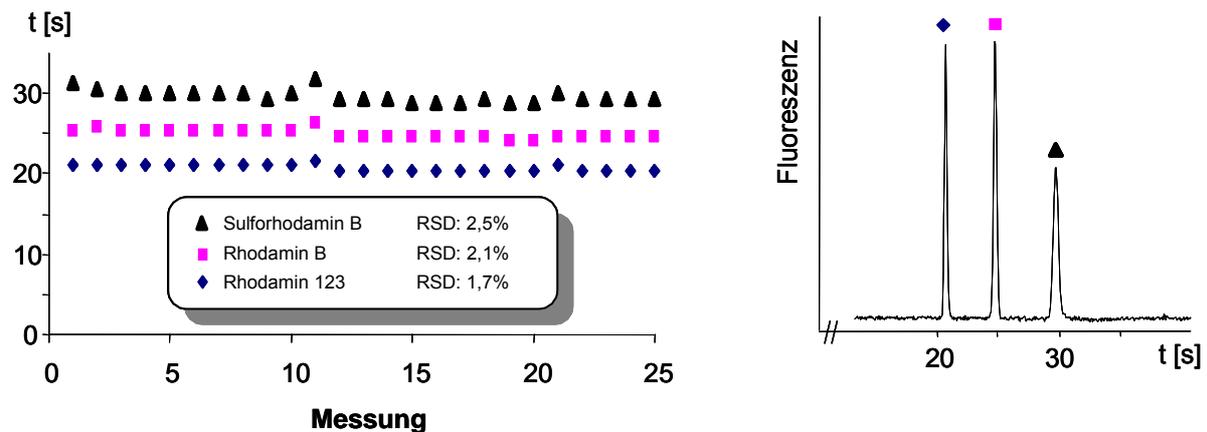


Abbildung 4.12 Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten von 25 aufeinanderfolgenden MCE-Trennungen dreier Rhodaminderivate. Zwischen den Messungen wurden die Chipkanäle 30 s lang mit Elektrolytlösung gespült. Probe: Sulforhodamin B (100 nM), Rhodamin B (100 nM) und Rhodamin 123 (10 μ M). Elektrolyt: 40 mM CHES, 6,25 mM HP- γ -CD, pH 9,0. Effektive Trennstrecke: 5,2 cm. Injektion: BI 1,35; BO 4,1; SI 1,5; SO 0 [kV]. Trennung: BI 4,0; BO 0; SI und SO 3,6 [kV].

4.6.2 Empfindlichkeit und Linearität

Die Bestimmung der Empfindlichkeit des MCE-2-Systems erfolgte an zwei Farbstoffgemischen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt wurden. Als Anregungsquelle wurde eine 100 W Quecksilberdampf-Hochdrucklampe benutzt. Sie besitzt gegenüber einem Laser eine Reihe von Vorteilen. So ist der Einsatz einer Lampe deutlich ökonomischer, und der Betrieb aus sicherheitstechnischen Gründen weniger problematisch. Der Grund für den Einsatz hier lag jedoch in der Flexibilität der Anregung. So steht Anregungslicht über einen weiten spektralen Bereich zur Verfügung. Die Auswahl des Anregungs- und Emissionswellenlängenbereiches erfolgte lediglich über einen Wechsel des Filtersystems. Dieser bestand aus austauschbaren Filterblöcken, die neben dem Anregungs- und Emissionsfilter jeweils einen dichroitischen Teilerspiegel enthielten. Im Falle der FITC-derivatisierten Amine wurde zur Anregung der blaue Spektralbereich (450-480 nm) ausgewählt und Emissionslicht mit einer Wellenlänge > 515 nm transmittiert. Bei den Rhodaminfarbstoffen erfolgte die Anregung im grünen Spektralbereich (500-570 nm), wobei Fluoreszenzlicht von 574-648 nm den Filterblock passierte. Mit diesem lampengestützten System konnte eine hohe Detektionsempfindlichkeit erreicht

werden. So war es im Falle der drei Rhodaminfarbstoffe möglich, eine Nachweisgrenze von 500 pmol/L (240 ppt) für Rhodamin B zu erzielen (s. Abbildung 4.13 A). Bei der MCE-Trennung von vier FITC-Amininen betrug beispielsweise die Nachweisgrenze für FITC-2-Butylamin 1 nmol/L (463 ppt). Das entsprechende Elektropherogramm wird in der Abbildung 4.13 B gezeigt. Um einen Empfindlichkeitsvergleich mit Literaturdaten vornehmen zu können, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Nachweisempfindlichkeit für Fluorescein ermittelt. So war es möglich 500 pmol/L (166 ppt) Fluorescein nachzuweisen (s. Abbildung 4.13 C)

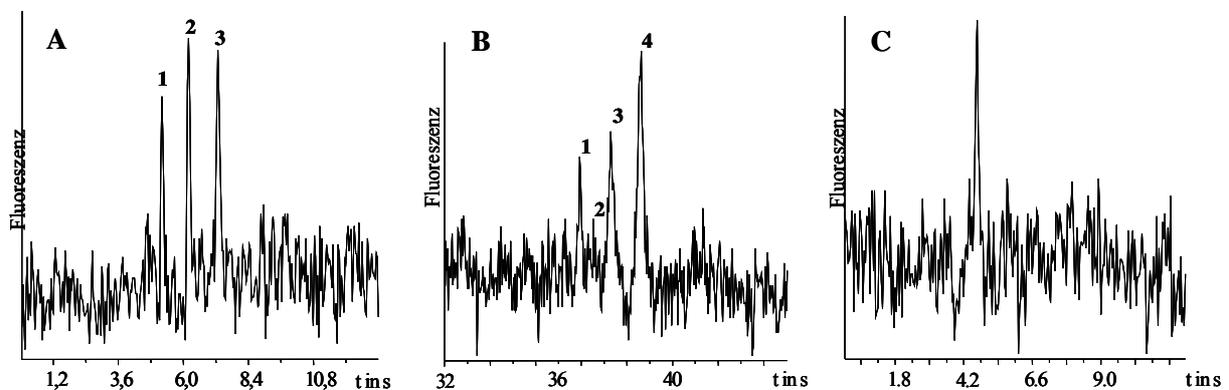


Abbildung 4.13 Elektropherogramme von drei Rhodaminfarbstoffen (A), vier FITC-Amininen (B) und von Fluorescein (C) an der Nachweisgrenze, bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1. (A) Probe: 1 Rhodamin 123 (50 nM); 2 Rhodamin B (0,5 nM); 3 Sulforhodamin B (0,5 nM). Effektive Trennstrecke: 1,6 cm. (B) Probe: 1 FITC-Metoprolol; 2 FITC-Propranolol; 3 FITC-2-Oktylamin; 4 FITC-2-Butylamin; jeweils 1 nM. Effektive Trennstrecke: 7,4 cm. (C) Probe: Fluorescein (500pM). Effektive Trennstrecke: 0,7 cm. Weitere Bedingungen s. Abbildung 4.12.

Die erzielten Nachweisgrenzen für Rhodamin B und Fluorescein sind somit um mehr als drei Größenordnungen besser als entsprechende Literaturdaten [109-111].

Neben einer sehr hohen Empfindlichkeit konnten auch lineare Kalibrierfunktionen mit ausgezeichneten linearen Korrelationskoeffizienten r ermittelt werden, wie Abbildung 4.14 zeigt. Hierzu wurde eine entsprechende Stammlösung seriell verdünnt und zur Ermittlung der Peakflächen jeweils 5 Messungen durchgeführt. Die relativen Standardabweichungen der Peakflächen im Falle von FITC-2-Butylamin betragen 3,3 % - 15,7 %. Für Rhodamin B wurden Werte von 5,1 % - 23,7 % ermittelt.

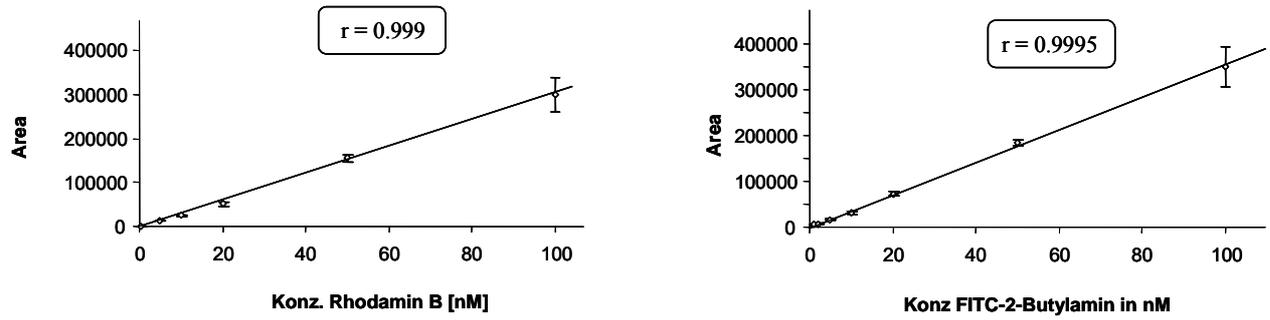


Abbildung 4.14 Kalibrierfunktionen für FITC-2-Butylamin und Rhodamin B. Die Probenlösungen wurden durch serielle Verdünnung mit dem entsprechenden Elektrolyten erhalten. Fehlerbalken = RSD. Bedingungen entsprechen denen der Abbildung 4.12.

5. Verbesserung der Auflösung

5.1 Einleitung

Trotz der Möglichkeit, besonders schmale Probenzonen zu injizieren, ist die praktisch erzielbare Auflösung in der MCE im Vergleich zur klassischen CE aufgrund der geringen Trennstrecke häufig geringer. Dies gilt insbesondere für anspruchsvolle chirale Trennungen. Will man die optische Reinheit einer Verbindung exakt bestimmen, so muß eine ausreichend hohe Auflösung der Signale der beiden Enantiomeren gegeben sein. Dies gilt insbesondere bei der Erfassung sehr geringer Verunreinigungen. So muß eine Analysenmethode in der pharmazeutischen Forschung in der Lage sein ein Enantiomerenverhältnis von mindestens 0,1 % zu bestimmen [112]. Eine quantitative Auswertung mit den bislang auf den Mikrochips erzielten Auflösungen ist jedoch nur sehr begrenzt möglich. Zur Verbesserung der Auflösung bieten sich mehrere Möglichkeiten an.

Der offensichtlichste Weg besteht darin die Trennstrecke auf dem Mikrochip einfach zu verlängern. Will man jedoch die kompakten Dimensionen des Chips beibehalten, müssen gekrümmte Kanalstrukturen verwendet werden. Mathies et. al. [113] haben diese Methode bei der allerersten chiralen MCE-Trennung angewendet. Im Vergleich zu einem geraden 5 cm langen Kanal konnte mit Hilfe eines 19 cm langen gefalteten Kanals die Auflösung zweier Enantiomere wesentlich verbessert werden. Ähnlich gekrümmte Strukturen verwendeten Wallenborg et al. [114] und Cho et. al. [115]. Um die unzureichende chirale Auflösung in einem 6 cm langen Trennkanal zu verbessern, verwendeten sie „U-förmige“ bzw. „S-förmige“ Kanäle mit einer Länge von bis zu 170 mm. Die Integration von Krümmungen zur Realisierung solcher langen Trennkanäle erzeugt jedoch einen zusätzlichen geometrischen Beitrag zur Analytdispersion [113, 116].

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Steigerung der Enantioselektivität des Trennsystems. Dies kann zum einen durch Erhöhung der Selektorkonzentration erfolgen, wie Cho et. al. [115] zeigen konnten. Dies setzt jedoch voraus, dass die optimale Elektrolytzusammensetzung noch nicht erreicht wurde. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von hochselektiven chiralen Selektoren. Mit

hochsulfatierten Cyclodextrinen (HS-CD) weisen in der CE eine besonders hohe Selektivität auf [117]. Wallenborg et. al. haben HS-CD zur chiralen Trennung von 4-Fluoro-7-nitro-benzofurazanen in gekrümmten Mikrochipkanälen eingesetzt.

Durch Beschichtung der mikrofluidischen Kanäle eines Glas-Chips sollte die chirale Trennleistung beträchtlich verbessert werden können. Ergebnisse zur Trennung chiraler Verbindung in beschichteten Mikrostrukturen sind bislang jedoch noch nicht veröffentlicht worden.

5.2 Beschichtung mikrofluidischer Strukturen

Aus der klassischen CE ist es bekannt, dass die Trennleistung und die Reproduzierbarkeit einer elektrophoretischen Trennung durch Verwendung geeigneter Oberflächenbeschichtungen erheblich gesteigert werden kann. Oberflächenbeschichtete Kapillaren ermöglichen die Kontrolle über den elektroosmotischen Fluss [118-120] und unterdrücken die Analytadsorption an die Kapillarwände [121,122]. Für die Mikrochipelektrophorese ist die Anwendung beschichteter Kanäle aus einem weiteren Grund sinnvoll. So erfordert eine reproduzierbare Probenaufgabe einen reproduzierbaren EOF [123]. Die Stabilität des EOF in sich wiederholenden Messungen ist jedoch häufig ungenügend. Ursächlich ist eine Adsorption von Probe und Pufferkomponenten an die Kanalwände. Zur Gewährleistung eines konstanten EOF sind deshalb entweder zeitaufwendige Konditionierungsschritte oder alternativ hierzu beschichtete Kanäle erforderlich. Obwohl bereits eine große Anzahl elektrophoretischer Anwendungen von der klassischen CE auf die MCE übertragen werden konnten, erfolgte die Durchführung fast ausschließlich in unbeschichteten Mikrochips aus Glas, Quarz oder diversen Polymeren. Ein Grund hierfür ist, dass das Auftragen einer homogenen Oberflächenschicht in den komplexeren mikrofluidischen Strukturen ungleich schwieriger ist [124]. So sind erst zu Beginn dieser Arbeit Berichte zur chemischen Modifikation vom Mikrochipkanaloberflächen erschienen [125-128]. In diesen Beiträgen konnte jedoch keine signifikanten Vorteile der oberflächenbeschichteten Strukturen gezeigt werden.

5.2.1 Beschichtung eines Mikrochips mit Polyvinylalkohol

Von den in der klassischen CE beschriebenen Beschichtungen haben sich die hydrophilen nichtionischen Beschichtungen als besonders geeignet herausgestellt den EOF zu kontrollieren und Analyt-Wand-Wechselwirkungen zu reduzieren. Polyvinylalkohol (PVA) ist das hydrophilste nichtionische Polymer. Mit PVA-beschichtete Oberflächen weisen über einen weiten pH-Bereich einen sehr stabilen stark reduzierten EOF auf und ermöglichen hocheffiziente Trennungen basischer Proteine [40]. Zur Immobilisierung des Polymers hat sich ein von Belder et al. entwickeltes Verfahren als besonders robust und leistungsstark erwiesen [61,62]. Hierbei erfolgt die Immobilisierung der Beschichtung an die Oberfläche von FS-Kapillaren durch Quervernetzung mit Glutardialdehyd (Abbildung 5.1). Zur Erzeugung der PVA-Beschichtung wird die Kapillare zunächst komplett mit Glutardialdehyd-Lösung gefüllt und anschließend eine wenige cm lange PVA-Zone in die Kapillare gedrückt. Durch Verwendung von Druckluft wird die PVA-Zone dann durch die gesamte Kapillare bewegt, wobei an der Grenzfläche zwischen Polymer-Lösung und Quervernetzer die zur Immobilisierung führende Reaktion stattfindet.

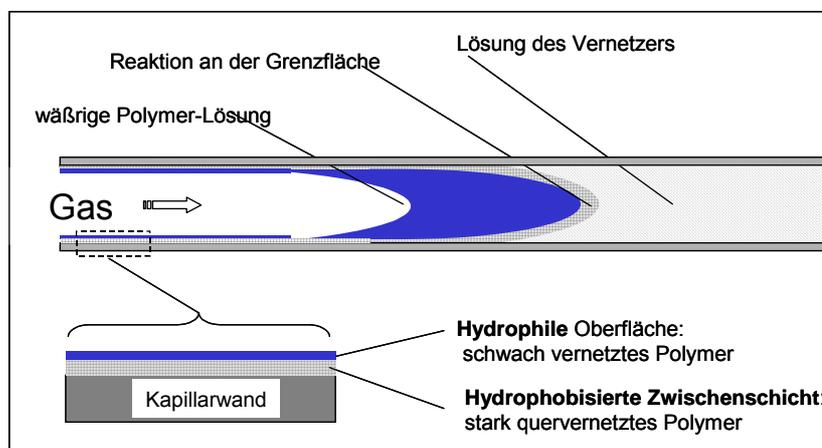


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung des Beschichtungsverfahrens von quervernetzten PVA

Versuche zur Übertragung dieser Methode auf mikrofluidische Chips mit gekreuzten Kanälen führten jedoch zu einer irreversiblen Verstopfung der Kanäle. Ursache sind vermutlich unterschiedlich induzierte Strömungsgeschwindigkeiten in den verschiedenen langen Kanälen. Bei zu geringer Strömungsgeschwindigkeit in einem

Kanal führt die fortschreitende Polymerisation zu einem Verstopfen des Kanals. Im folgenden wurde daher auf eine Quervernetzung des PVA verzichtet und der adsorbierte Polymerfilm thermisch auf den Kanalwänden immobilisiert. Hierzu wurde zunächst die Chipkanäle vollständig mit einer wässrigen PVA-Lösung gefüllt und durch Verwendung von Druckluft wieder geleert. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, um eine ausreichende Belegung der Kanaloberflächen mit PVA zu erzielen. Die Immobilisierung der Polymerschicht erfolgte anschließend thermisch in einem kommerziellen GC-Ofen. Einzelheiten der Durchführung sind dem Kapitel 6.5 zu entnehmen.

5.2.2 Charakterisierung der PVA-Beschichtung

Die Charakterisierung von PVA-belegten Glaschips erfolgte zunächst an Hand einer achiralen Trennung von vier mit AlexaFluor® 350 fluoreszenzmarkierten Aminen. Die Strukturen dieser Verbindungen und die zugrundeliegende Derivatisierungsreaktion kann man der Abbildung 5.2 entnehmen.

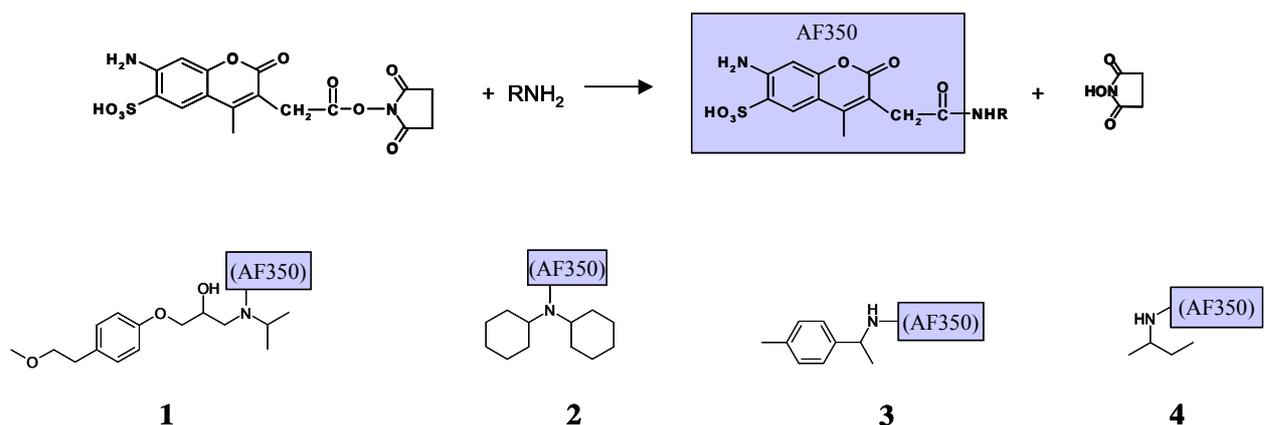


Abbildung 5.2 Derivatisierung von Aminen mit AlexaFluor® 350 und chemische Strukturen der hieraus erhaltenen Verbindungen.

Die AlexaFluor-Derivate liegen ab einem pH-Wert von 5 und höher als Anionen vor und haben ein Absorptionsmaximum bei etwa 350 nm. Die Erfassung der

Fluoreszenzsignale erfolgte über ein Filtersystem bestehend aus einem Bandpass-Anregungsfilter (360-370 nm), einem dichroitischen Spiegel (400 nm) sowie einem Fluoreszenz- Barrierefilter (>420 nm).

Die Mischung der fluoreszenzmarkierten Aminen wurde zunächst in einem unbeschichteten Chip mit einem 40 mM Phosphatpuffer von pH 5 analysiert. Da bei diesem pH-Wert ein dominanter kathodischer EOF vorhanden ist, besitzen die anionischen Verbindungen eine Gesamtmobilität in Richtung Kathode. Die Polarität der Hochspannungskanäle wurde entsprechend gewählt. Die Injektion der Probe erfolgte mit einem zweistufigen *pinched injection* Spannungsprogramm. Hierbei wurde im 1. Schritt der Injektionskanal mit der Probe gefüllt und diese durch anliegende Gegenströme im Kreuzungsbereich der beiden Kanäle fokussiert. Die Spannungswerte betragen hierbei 1,7 (BI), 2,09 (BO) und 1,55 kV (SI) während das SO geerdet wurde. Die Spannungsparameter für den zweiten Schritt, bei dem eine kleine Injektionszone in den Trennkanal gelangt und die Trennung erfolgt, betragen 4,0 (BI), 0,0 (BO), 2,9 (SI) und 2,9 kV (SO). Bei diesen Werten und einer effektiven Trennstrecke von 3,4 cm konnte hierbei eine Trennung der vier Verbindungen in etwa 80 s erzielt werden (Abbildung 5.3 A). Neben den vier Signalen der AlexaFluor-Verbindungen ist ein weiteres Signal (#) bei etwa 102 s zu erkennen, welches Nebenprodukten aus der Derivatisierungsreaktion zuzuordnen ist. Die gleiche Messung wurde in einem PVA-beschichteten Glas-Chip bei identischer Trennstrecke wiederholt. Da durch die Beschichtung der EOF unterdrückt ist, resultiert eine Gesamtmobilität der Anionen zur Anode. Die Potentiale an den Elektroden wurden entsprechend umgepolt, wobei die absoluten Potentialwerte beibehalten wurden. Das Resultat einer solchen Trennung ist in der Abbildung 5.3 B dargestellt.

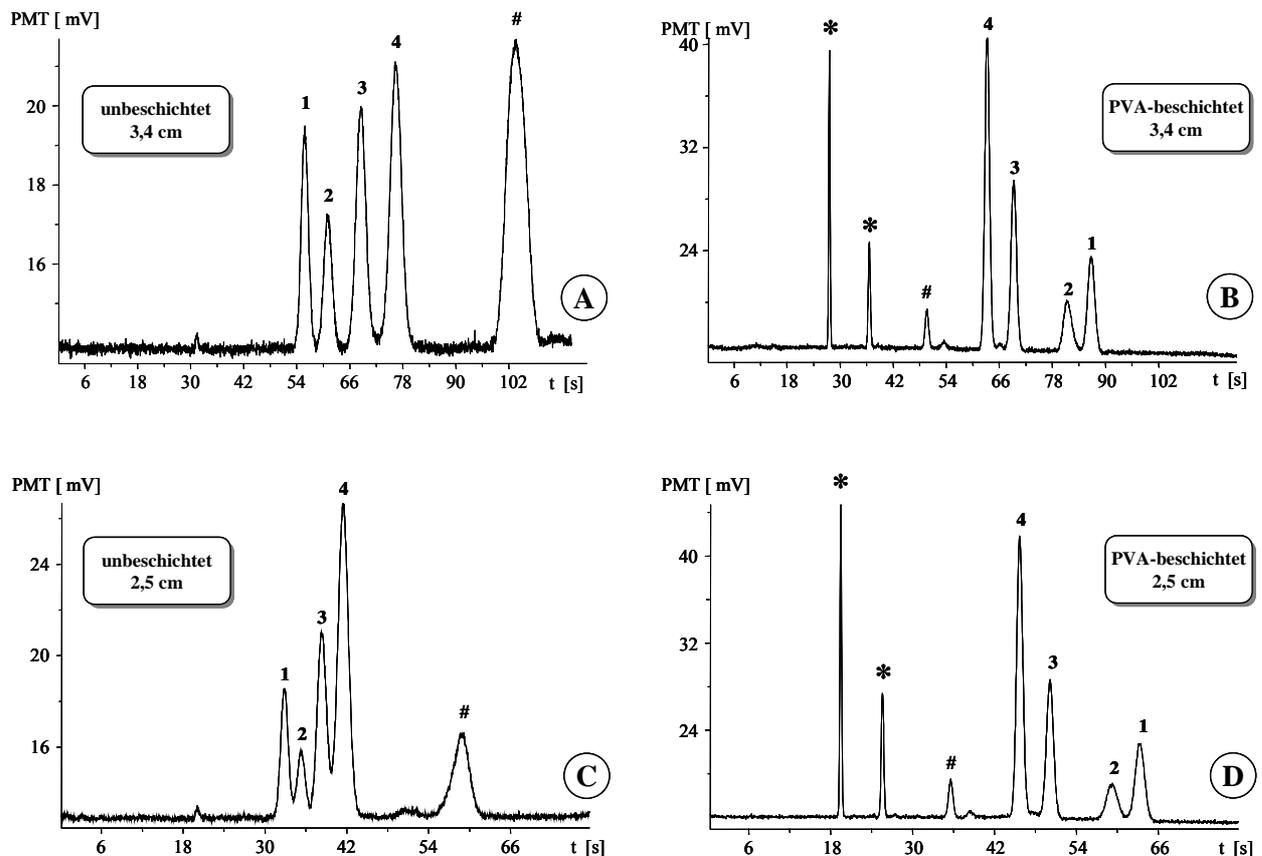


Abbildung 5.3 Vergleich der MCE-Trennungen von AF350-derivatisierten Aminen in einem unbeschichteten und einem PVA-beschichteten Mikrochip bei zwei unterschiedlichen Trennstrecken. Signalzuordnung: 1 AF350-Metoprolol; 2 AF350-Dicyclohexylamin; 3 AF350- α -Dimethylbenzylamin; 4 AF350-2-Butylamin; jeweils 2,9 μ M. *, #: Verunreinigungen. Elektrolyt: 40 mM Phosphat, pH 5,0. Effektive Trennstrecke: 3,4 cm. Injektion (unbeschichtet): BI 1,17; BO 2,1; SI 1,5; SO 0,0 [kV]. Trennung (unbeschichtet): BI 4,0; BO 0,0; SI und SO 2,9 [kV]. Spannungsparameter (beschichtet): gleiche Beträge, negatives Vorzeichen.

Unter Verwendung eines PVA-beschichteten Mikrochips konnte eine Trennung der vier AlexaFluor-Derivate in etwa 90 s erreicht werden. Im Vergleich zu einem unbelegten Chip wird hierbei aufgrund des unterdrückten EOF eine umkehrte Migrationsreihenfolge erhalten. Desweiteren ist es möglich anionische Verunreinigungen (*, #), welche im unbelegten Chip komigrieren in einem PVA-beschichteten Chip in drei Signale aufzutrennen. Die im Vergleich zu unbelegten Chips signifikant verbesserte Trennleistung ist auch aus dem Vergleich der erhaltenen Trennstufenzahlen und Auflösungen ersichtlich (Tabelle 5.1). So konnte beispielsweise die Auflösung der Signale 3 und 4 von 1,39 auf 2,26 verbessert

werden, während die Trenneffizienz des Signals 4 von 4260 auf 14880 verdreifacht werden konnte, was einer Steigerung der Trennstufenzahl pro Meter von 125300 auf 437600 m^{-1} entspricht. Die erhöhte Trennleistung in einem PVA-beschichteten Mikrochip ermöglicht sogar eine weitere Verkürzung der Trennstrecke. Während bei Verwendung eines unbeschichteten Chips zur Erzielung einer ausreichenden Auflösung eine Trennstrecke von mindestens 3,4 cm erforderlich ist, kann bei einem beschichteten Chip die Trennstrecke auf 2,5 cm verkleinert werden. Die dabei erzielbaren Auflösungen sind der Abbildung 5.3 C und D zu entnehmen. Im unbeschichteten Chip können bei einer Trennstrecke von 2,5 cm die Signale lediglich angetrennt werden. Im beschichteten Chip ist aber nach wie vor eine Basislinientrennung aller Signale möglich.

	2,5 cm		3,4 cm	
	unbeschichtet	PVA-beschichtet	unbeschichtet	PVA-beschichtet
$N_1 (R_{1,2})$	6070 (1,36)	13320 (1,38)	3670 (0,95)	9490 (1,19)
$N_2 (R_{2,3})$	5440 (1,63)	8450 (3,41)	4020 (0,99)	6650 (3,05)
$N_3 (R_{3,4})$	4410 (1,39)	13600 (2,26)	3680 (0,94)	9760 (2,02)
N_4	4260	14880	3070	10360

Tabelle 5.1 Vergleich der Trennstufenzahl N und Auflösung R erhalten in unbeschichteten und PVA-beschichteten Mikrochips für die in Abbildung 5.3 gezeigten Elektropherogramme.

Die durch PVA-Beschichtung verursachte signifikante Verbesserung der Auflösung und der Trenneffizienz kann auf eine Verringerung von Analyt-Wand-Wechselwirkungen und einen unterdrückten EOF zurückgeführt werden. Ein ungleichförmiger EOF bzw. ein ungleiches ζ -Potential trägt zur Bandenverbreiterung bei [129], was insbesondere für den Kreuzungsbereich von Injektions- und Trennkanal zutrifft. Ist das ζ -Potential in den einzelnen Kanalabschnitten nicht einheitlich, so kann dies zu einem parabolischen Strömungsprofil führen, wie man es

von druckbetriebenen Systemen her kennt. Der Einfluss einer PVA-Beschichtung auf das Strömungsprofil und die Zonenverbreiterung wird aus den Videobildern einer Videosequenz deutlich, welche in der Abbildung 5.4 zu sehen sind. Die experimentellen Parameter entsprechen denen der Abbildung 5.3. Auf den oberen vier Bildern ist der Injektionsprozess in einem unbeschichteten Chip zu sehen. Nach 360 ms wird eine etwa 230 μm schmale Probenzone mit parabolischem Strömungsprofil injiziert, welche nach 720 ms auf eine Breite von etwa 420 μm angewachsen ist. Die Form des Strömungsprofils deutet auf einen hydrodynamischen Fluss hin, welcher wahrscheinlich durch einen ungleichmäßigen EOF verursacht wurde. Wiederholt man das Experiment mit einem PVA-beschichteten Chip, so müssen die Potentiale aufgrund des unterdrückten EOF umgepolt werden. Die bei gleichen Spannungsbeträgen aufgezeichneten Bilder des Injektionsprozesses sind in der unteren Reihe dargestellt. Im Vergleich zum unbelegten Chip sind signifikante Unterschiede feststellbar. Während die Fokussierung der Probe im Kreuzungsbereich nahezu identisch ist, wird nach 360 ms eine etwa 200 μm schmale Probenzone injiziert, welche ein flaches Strömungsprofil aufweist. Diese flache, symmetrische Zone ermöglicht nach 600 ms eine beginnende Auftrennung des Gemisches, welche nach nur 800 ms auf einer Trennstrecke von lediglich 650 μm abgeschlossen ist. Eine vergleichbare Auftrennung mit einem unbeschichteten Chip ist in diesem Zeitrahmen und bei den geringen Trennstrecken nicht möglich.

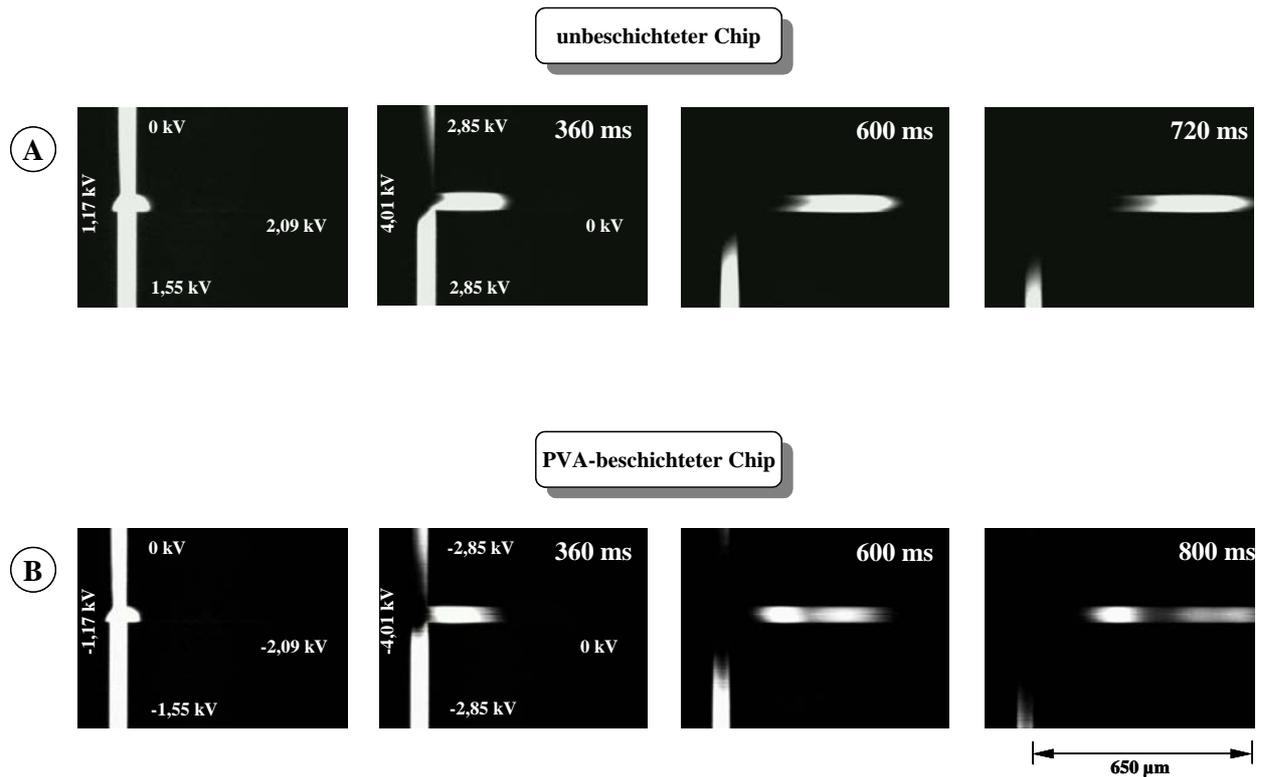


Abbildung 5.4 Bilder einer Videoaufzeichnung des Injektionsprozesses in einem unbeschichteten Glass-Mikrochip (A) und einem PVA-beschichteten Mikrochip (B). Die Zeiten nach der Injektion wurden aus der Bildaufnahmefrequenz berechnet. Die experimentellen Parameter entsprechen denen der Abbildung 5.3.

Diese Resultate zeigen, dass es durch Verwendung beschichteter Mikrokanäle möglich ist, eine ausreichend hohe Trennleistungen auch in kurzen Kanälen zu erzielen. Die PVA-Beschichtung von Mikrokanälen ist für anspruchsvolle Applikationen wie beispielsweise chirale Trennungen somit eine Alternative zur Verwendung gekrümmter Mikrokanäle, die mit dem Nachteil eines zusätzlichen geometrischen Beitrags zur Zonendispersion behaftet sind.

5.2.3 Chirale Trennungen in PVA-beschichteten Mikrochips

Nachdem gezeigt werden konnte, daß eine permanente PVA-Beschichtung zu einer deutlichen Verbesserung der Trennleistung bei einer achiralen Trennung führt, wurde versucht die unzureichende Auflösung von chiralen Trennungen durch Verwendung

von PVA-beschichteten Mikrochips zu verbessern. Hierzu wurde zunächst die im Kapitel 4.5 beschriebene chirale Trennung auf einem beschichteten Mikrochip unter identischen experimentellen Parametern durchgeführt. Die chirale Trennung erfolgte unter Verwendung von HP- γ -CD. Die Ergebnisse dieser Messungen sind der Abbildung 5.5 zu entnehmen.

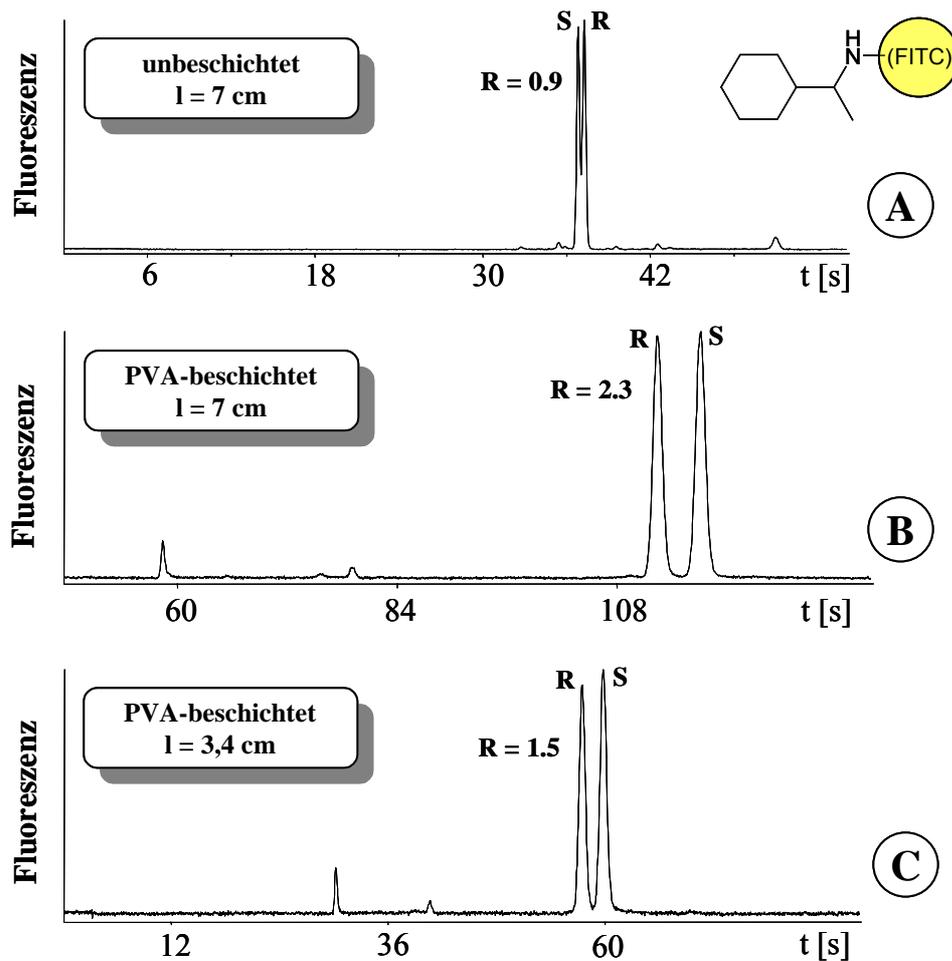


Abbildung 5.5 Einfluss einer PVA-Beschichtung auf die Auflösung einer chiralen MCE-Trennung bei unterschiedlich effektiven Trennstrecken l . Probe: Mischung aus FITC-markiertem (R)-(-) und (S)-(+)-1-Cyclohexylethylamin ($0,2 \mu\text{M}$). Elektrolyt: 40 mM CHES , $6,25 \text{ mM HP-}\gamma\text{-CD}$, $\text{pH } 9,2$. Injektion (unbeschichtet): BI $1,35$; BO $4,1$; SI $1,5$; SO $0,0$ [kV]. Trennung (unbeschichtet): BI $4,0$; BO $0,0$; SI und SO $3,4$ [kV]. Spannungsparameter (beschichtet): gleiche Beträge, negatives Vorzeichen.

Aus den Elektropherogrammen wird eine signifikante Verbesserung der Auflösung erkennbar. Während mit dem unbeschichteten Chip bei einer Trennstrecke von 7 cm in 38 s nur eine Auflösung von $0,9$ erzielt werden konnte (A), beträgt die Auflösung beim beschichteten Chip $2,3$ (B). Aufgrund dieser deutlichen Zunahme der

Trennleistung war es sogar möglich, eine Basislinientrennung auf einer Trennstrecke von lediglich 3,4 cm zu erzielen (C). Dies führte gleichzeitig zu einer Halbierung der Migrationszeit von 120 s auf 60 s.

Die bei pH 9,2 anionischen FITC-Derivate mussten aufgrund eines dominanten kathodischen EOF in unbeschichteten Chips an der Kathode detektiert werden. In PVA-beschichteten Kanälen war der EOF unterdrückt, so daß die Detektion an der Anode unter Umkehrung der Migrationsreihenfolge der Enantiomeren erfolgte. Zu diesem Zweck wurde die Polarität der Potentiale an den Elektroden im Vergleich zum unbelegten Chip umgekehrt.

Um die bisher erzielten Ergebnisse auf eine breitere Basis zu stellen, wurden Versuche unternommen, weitere chirale FITC-derivatisierte Verbindungen mit der MCE zu trennen. Auch in diesen Fällen erfolgten die Messungen in den beschichteten bzw. unbeschichteten Mikrochips mit identischen Potentialwerten, wobei lediglich die Polarität der Potentiale verändert wurde. Die chirale Trennungen wurden unter Verwendung von HP- β -CD als chiralen Selektor durchgeführt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 5.6 zu sehen. Während im Falle des unbelegten Chips auf der maximal möglichen Trennstrecke von 7 cm für beide Verbindungen keine Auftrennung erzielt werden konnte, wurde jeweils eine Auflösung von 0,9 im belegten Chip erreicht. Die hierfür benötigten Migrationszeiten betragen 120 bzw. 144 s. Auch in diesen beiden Fällen war bei Verwendung eines permanent mit PVA beschichteten Mikrochips eine signifikante Verbesserung der Auflösung möglich.

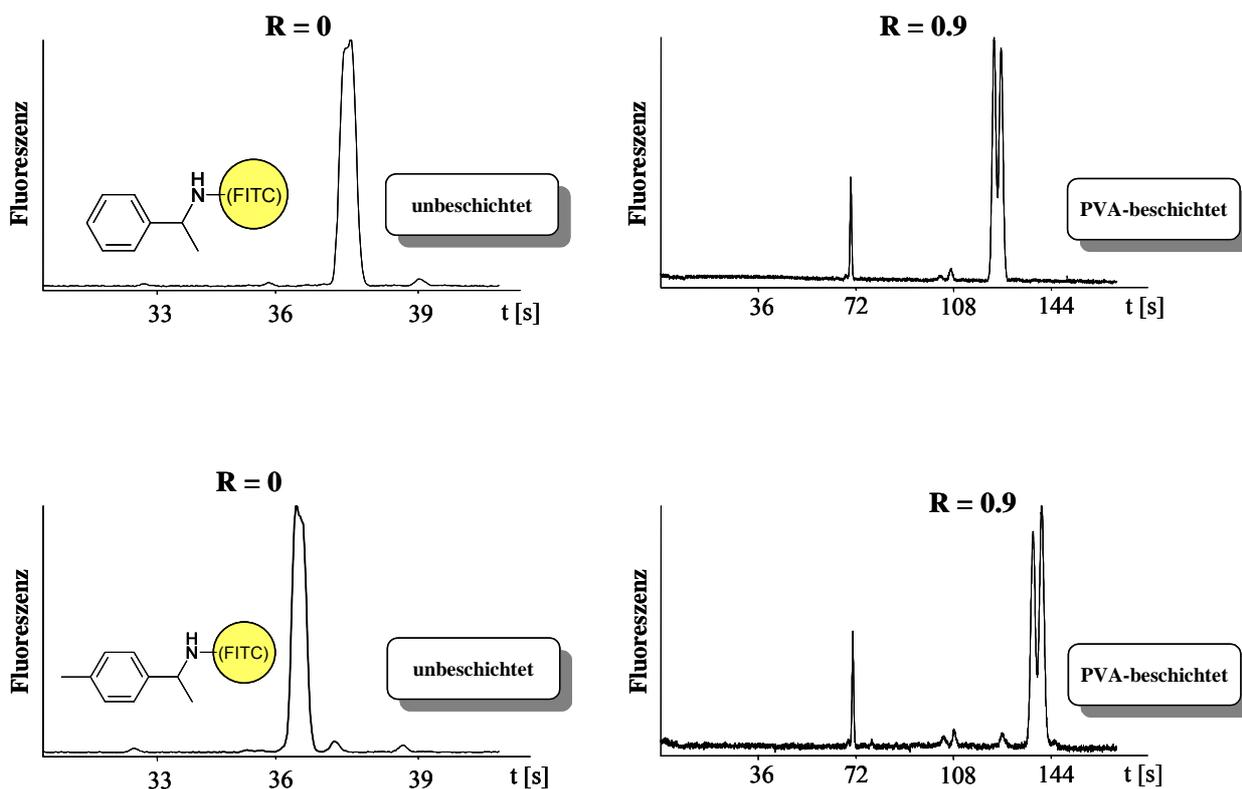


Abbildung 5.6 Chirale Trennung zweier FITC-markierter Amine jeweils durchgeführt in einem unbelegten Glas- und einem PVA-beschichteten Mikrochip. Probe: jeweils $0,2 \mu\text{M}$. Elektrolyt: 40 mM CHES, 5 mM HE- β -CD, pH 9,2. Die Spannungsparameter entsprechen denen der Abbildung 5.5.

5.2.4 Bestimmung der Enantiomerenreinheit in PVA-beschichteten Chips

Die präzise Bestimmung der Enantiomerenreinheit dient nicht nur zur Beurteilung der Güte einer enantioselektiven Reaktion, sie ist auch wesentlich zur Charakterisierung nicht-racemischer pharmazeutischer Verbindungen. Die quantitative Angabe der Reinheit eines Enantiomers kann sowohl über die optische Reinheit, den Enantiomerenüberschuß (ee, engl. enantiomeric excess) als auch über das Enantiomerenverhältnis erfolgen. Eine Methode der Wahl ist hierbei die Gaschromatographie (GC). Sie zeichnet sich durch die Vielseitigkeit ihrer Anwendung sowie in einer hohen Präzision und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus [130,131]. Zur Validierung der Richtigkeit der mit Hilfe der MCE ermittelten Enantiomerenverhältnisse wurden die MCE-Daten mit den Daten aus der GC verglichen. Hierzu wurden 9 Aminproben mit einem unterschiedlichen Enantiomerenverhältnis hergestellt und vor der Derivatisierung mit FITC aufgeteilt.

Während der nicht-derivatisierte Teil einer GC-Bestimmung unterzogen wurde, wurden die FITC-markierten Amine mit Hilfe der MCE untersucht. Jede Bestimmung sowohl in der GC als auch in der MCE wurde dreimal durchgeführt. In der Abbildung 5.7 sind die Ergebnisse der aus beiden Messreihen erhaltenen arithmetischen Mittelwerte graphisch gegeneinander aufgetragen.

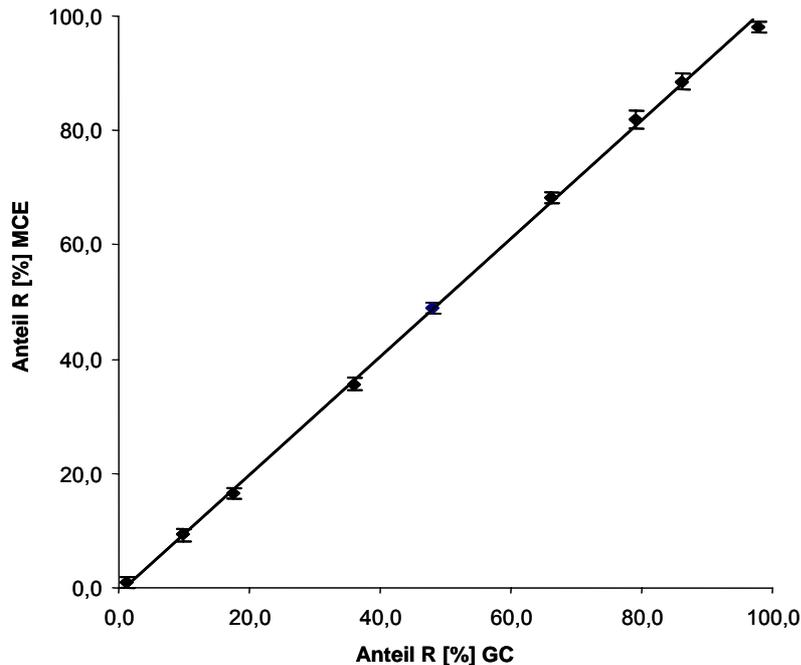


Abbildung 5.7 Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses mit Hilfe der GC und MCE. Probe: Mischung aus FITC-markiertem (R)-(-) und (S)-(+)-1-Cyclohexylethylamin, jeweils 1 μ M für die MCE bzw. 3,3 mM GC. Die Fehlerbalken entsprechen der rel. Standardabweichung ($n = 3$). Effektive Trennstrecke: 7 cm. Die Spannungsparameter entsprechen denen der Abbildung 5.5.

Der Vergleich der Analysendaten erfolgt über den Anteil des R-Enantiomers. Während die relative Standardabweichung (RSD) im Schnitt 1,9 % beträgt, wird ein linearer Korrelationskoeffizient r von 0,9996 erhalten. Diese statistischen Werte zeigen, dass das Enantiomerenverhältnis mittels MCE mit einer hohen Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann. Aufgrund der hohen Auflösung war zudem eine zuverlässige Bestimmung einer geringen Verunreinigung möglich. So konnten 1,1 % des R-Enantiomers bzw. 2,3 % des S-Enantiomers neben der Hauptkomponente erfasst werden (Abbildung 5.8). Dies entspricht nicht der Bestimmungsgrenze, da aufgrund der begrenzten optischen Reinheit der Referenzverbindung es nicht möglich war Proben mit einer höheren Reinheit als 1,1 % herzustellen.

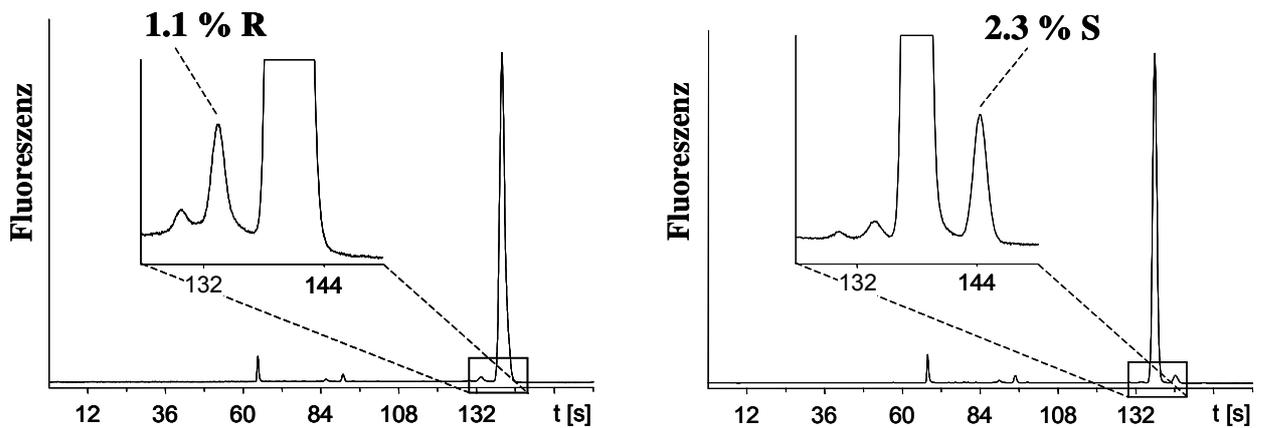


Abbildung 5.8 Quantitative Bestimmung einer geringfügigen enantiomeren Verunreinigung. Probe: Mischung aus FITC-markiertem (R)-(-) und (S)-(+)-1-Cyclohexylethylamin (jeweils 1 μM). Effektive Trennstrecke: 7 cm. Weitere Bedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.5.

Die unter Verwendung eines PVA-beschichteten Mikrochips erhaltenen Daten zeichnen sich nicht nur durch eine hohe Genauigkeit aus, sondern sie können auch mit einer hohen Reproduzierbarkeit der Migrationszeit und Auflösung ermittelt werden. Dies ist in der Abbildung 5.9 zu sehen, in der 7 Elektropherogramme von 15 aufeinanderfolgenden Messungen gezeigt werden. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Kanäle lediglich 30 s lang mit der Elektrolytlösung gespült. Die in der Abbildung aufgeführten Elektropherogramme zeigen weder einen Verlust an Auflösung, noch ist eine Veränderung der Peakverhältnisse erkennbar. Die Auflösung von 2,3 konnte mit einer RSD von 2,6 % ermittelt werden, die RSD des Flächenverhältnisses betrug lediglich 1,4 %.

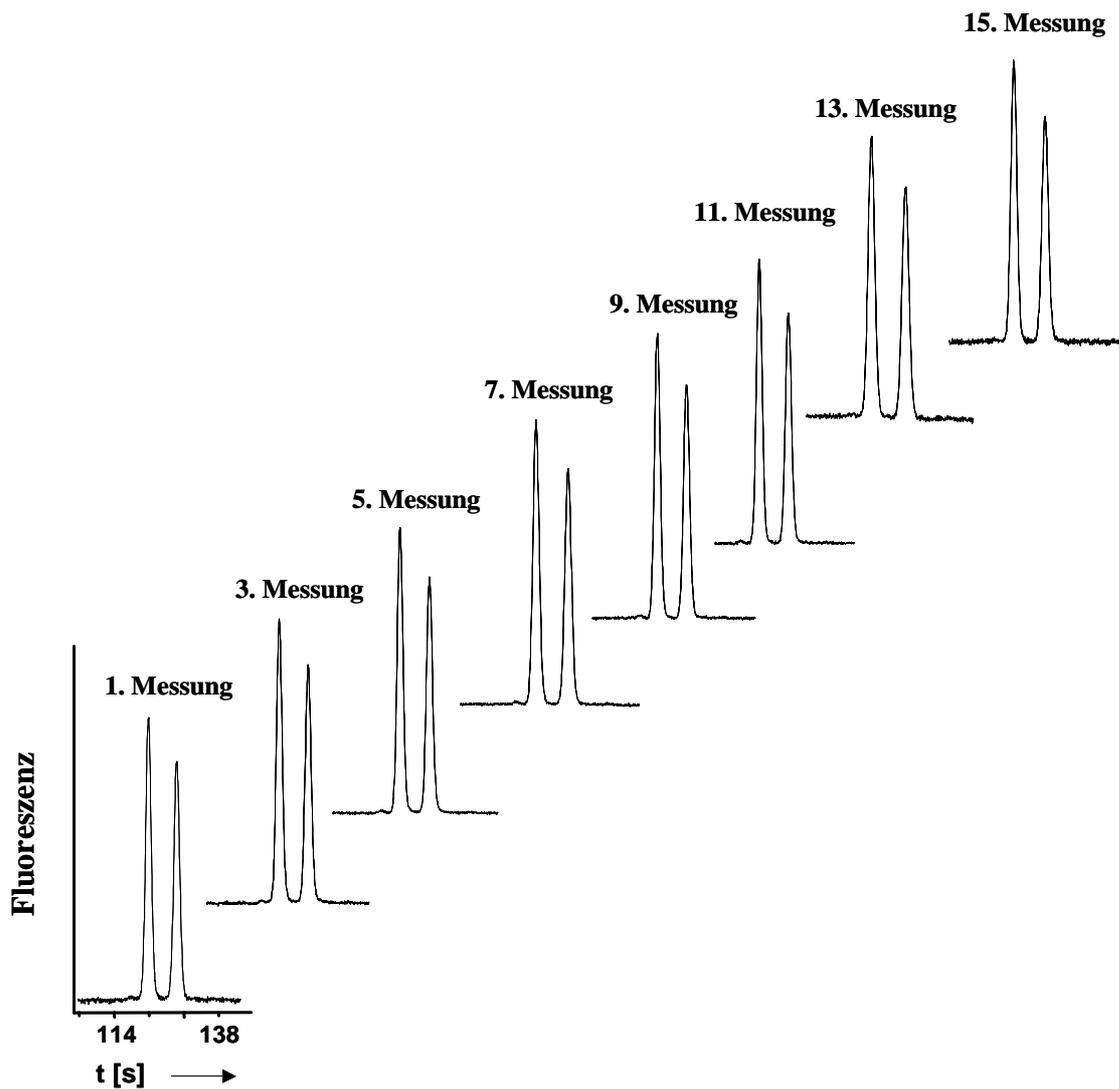


Abbildung 5.9 7 von 15 aufeinanderfolgenden chiralen MCE-Trennungen in einem PVA-beschichteten Mikrochip. Probe: Mischung aus FITC-markiertem (R)-(-) und (S)-(+)-1-Cyclohexylethylamin (jeweils 1 μM). Effektive Trennstrecke: 7 cm. Weitere Bedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.5.

In Abbildung 5.10 A sind die Migrationszeiten des 2. Signals der 15 Messungen graphisch aufgetragen. Die RSD der Migrationszeit beträgt hierbei 0,6 %. Eine entsprechend hohe Reproduzierbarkeit kann mit einem unbeschichteten Chip nur durch langwieriges Konditionieren der Kanaloberflächen erreicht werden. Hierzu wurden in einer weiteren Versuchsreihe zwischen 15 aufeinanderfolgenden Messungen die Kanäle zuerst 30 s lang mit 0,1 M NaOH und anschließend 30 s lang mit Elektrolytlösung gespült. Die hierbei erhaltenen Migrationszeiten sind in der Abbildung 5.10 B (untere Datenreihe) dargestellt. In diesem Fall konnte eine

entsprechend hohe Reproduzierbarkeit (RSD = 0,6%) wie beim beschichteten Chip erhalten werden. Wird auf den Spülschritt mit NaOH verzichtet, so ist die Reproduzierbarkeit geringer. Die Daten einer entsprechenden Versuchsreihe sind in der Abbildung 5.10 B (obere Datenreihe) dargestellt. Man erkennt eine kontinuierliche Abnahme der Migrationszeit was zu einer höheren RSD von 1,6 % führt. Ursache ist eine Zunahme des EOF und eine verzögerte Gleichgewichtseinstellung zwischen den Komponenten der Elektrolytlösung und den Kanaloberflächen.

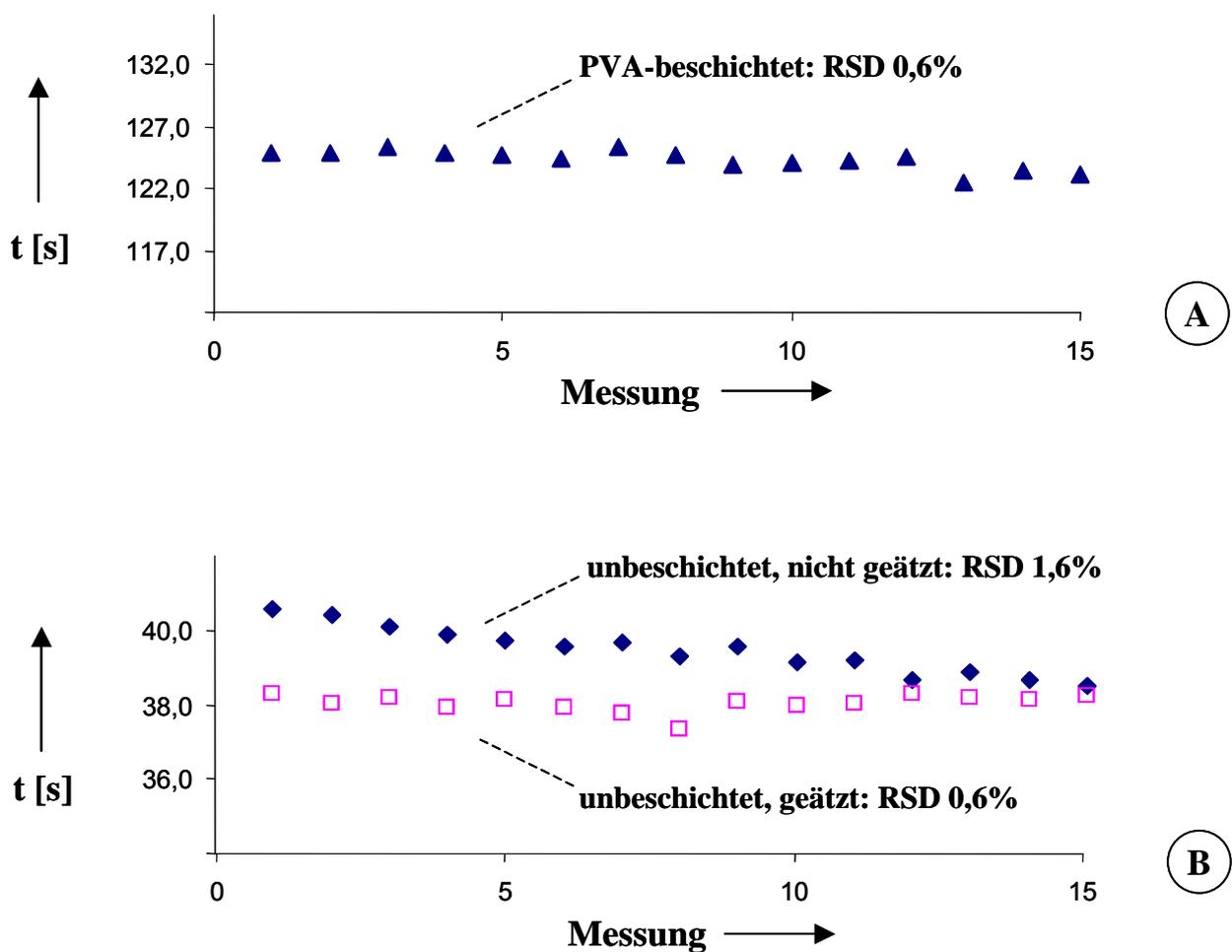


Abbildung 5.10 Reproduzierbarkeit der Migrationszeit von 15 aufeinanderfolgenden chiralen MCE-Trennungen in einem PVA-beschichteten Mikrochip. Der Mikrochip wurde zwischen den Messungen 30 s lang mit Elektrolyt (A) und (B, obere Datenreihe) sowie 30 s lang mit 1 M NaOH und Elektrolyt (B, untere Datenreihe) gespült. Weitere Bedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.5.

Hinsichtlich eines hohen Probendurchsatzes ist eine schnelle Analysenzeit wünschenswert. Das die bislang erzielten Migrationszeiten von etwa 120 s noch wesentlich verkürzt werden können, konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden. Hierzu wurden die Spannungparameter des Trennschrittes so verändert, dass die im Trennkanal vorliegende elektrische Feldstärke von 1044 V/cm auf 2150 V/cm erhöht wurde. Dies führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der Migrationszeit von 48 auf 21 s. Drei entsprechende Elektropherogramme sind in der Abbildung 5.11 zu sehen.

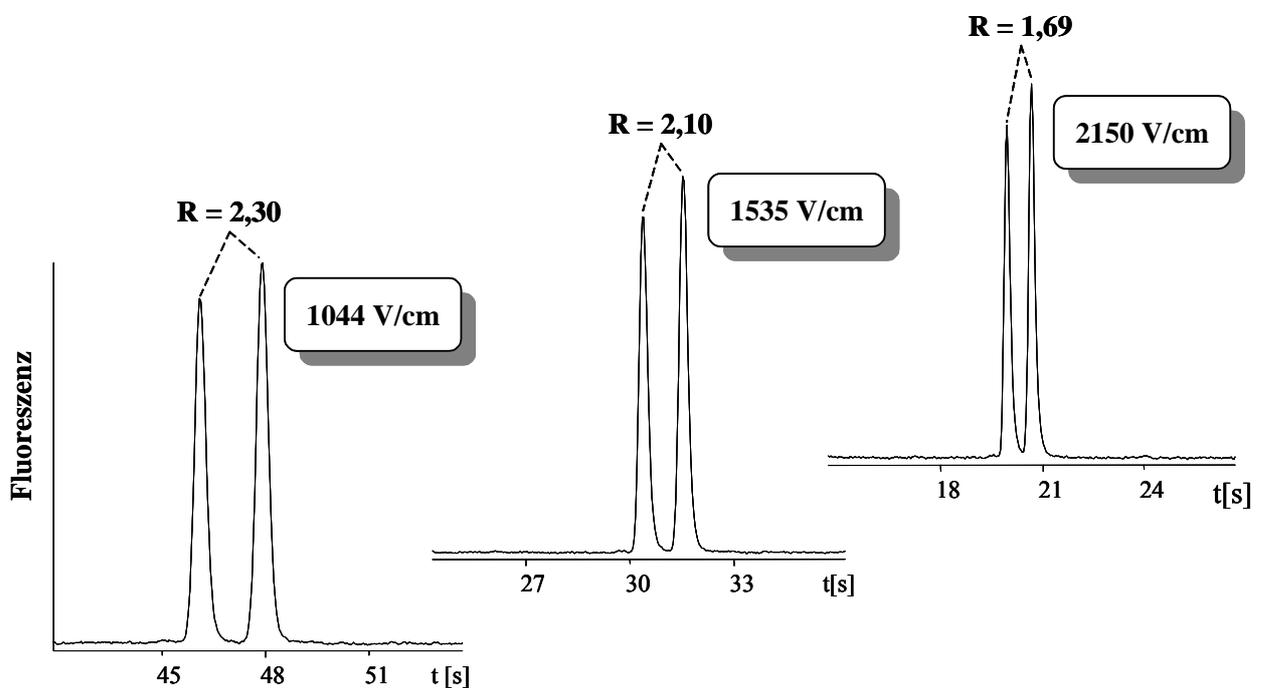


Abbildung 5.11 Verringerung der Migrationszeit durch Erhöhung der Feldstärke. Injektion (jeweils): BI $-1,35$; BO $-4,1$; SI $-1,5$; SO $0,0$ [kV]. Trennung: BI $-8,4$; SI und SO $-7,14$ (jeweils); BO $1,0$ (1044V/cm); $5,0$ (1535 V/cm) und $10,0$ (2150 V/cm) [kV]. Weitere Bedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.5.

Aus den Elektropherogrammen wird ferner ersichtlich das eine erhöhte elektrische Feldstärke mit einem Verlust an Auflösung verbunden ist. Die Abhängigkeit der Auflösung R von der elektrischen Feldstärke im Trennkanal wird aus der Abbildung 5.12 ersichtlich. Eine Erhöhung der Feldstärke von 440 auf 2150 V/cm führt zu einer Verminderung der Auflösung von 2,42 auf 1,69. Eine mögliche Ursache sind thermische Effekte. So führt die Joulsche Wärme zu einer Temperaturerhöhung des

Elektrolyten, wobei die erzeugte Wärmemenge proportional zum Quadrat der Feldstärke ist. Durch Ausbildung eines radialen Temperaturprofils wird ein parabolisches Strömungsprofil erzeugt, welches maßgeblich zur erhöhten Dispersion und somit zur Erniedrigung der Trenneffizienz beiträgt [132].

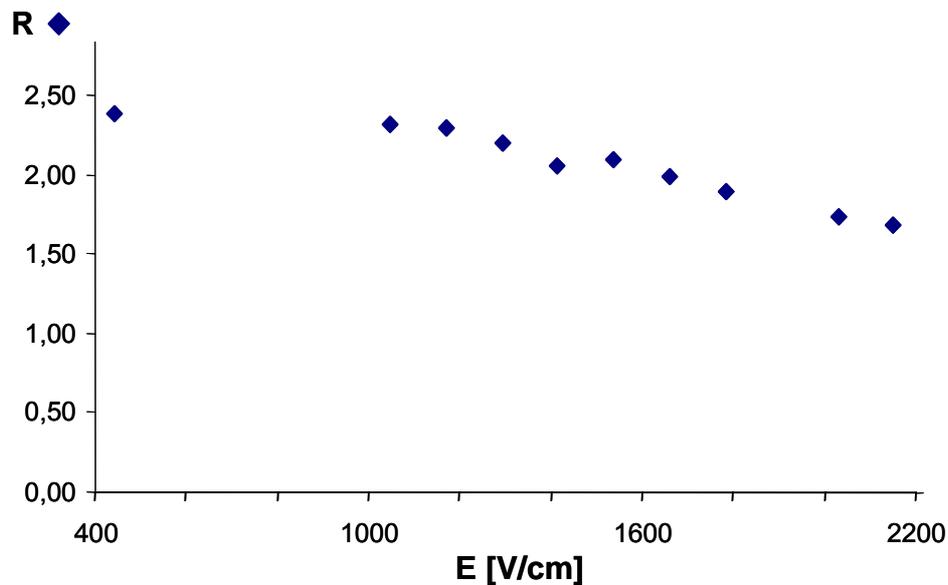


Abbildung 5.12 Abhängigkeit der Auflösung von der Feldstärke im Trennkanal.

5.2.5 Reproduzierbarkeit der PVA-Beschichtung

Um die Zuverlässigkeit des Belegungsprozesses zu untersuchen, wurde eine Reihe von Mikrochips mit thermisch immobilisierten PVA-Kanälen hergestellt. Die Beurteilung der Güte der PVA-Belegung erfolgte an Hand der Elektropherogramme der chiralen Trennung von FITC-markiertem (R)-(-)/(S)-(+)-1-Cyclohexylethylamin. Es wurde hierbei in 3 Kategorien eingeteilt (vgl. Abbildung 5.13). War keine Umpolung erforderlich bzw. wurde nur eine unaufgelöste Probenzone detektiert, so wurde die Qualität der Belegung als gering eingestuft. Bei Detektion eines angetrennten Signals wurde von einer mäßigen Belegung ausgegangen. Konnten jedoch 2 basisliniengetrennte Signale erhalten werden, so war eine hohe Belegungsqualität vorhanden. Die Parameter die Einfluss auf die erzielbare Qualität einer PVA-Beschichtung nehmen sind vielfältiger Natur. Hierzu zählen u.a. :

- die Art der Konditionierung der Kanaloberfläche
- die PVA-Konzentration der Belegungslösung sowie die Art des Lösungsmittels
- die Anzahl der Belegungsschritte
- das Temperaturprogramm zur Immobilisierung der PVA-Beschichtung

In ersten systematischen Versuchen wurde versucht, die Reproduzierbarkeit und die Qualität der Beschichtung durch Variation des Vorbehandlungsschrittes, der PVA-Konzentration sowie der Anzahl der Belegungsschritte zu verbessern. Hierbei zeigte sich, dass eine zweimalige Belegung mit einer 3 % PVA-Lösung in mit NaOH vorbehandelten Mikrochipkanälen zu den bislang besten Ergebnissen führte. So konnte bei 4 von 8 Belegungen eine gute Beschichtungsqualität erzielt werden, in einem Fall war die Belegung mäßig und in drei Fällen war sie gering (s. Abbildung 5.13)

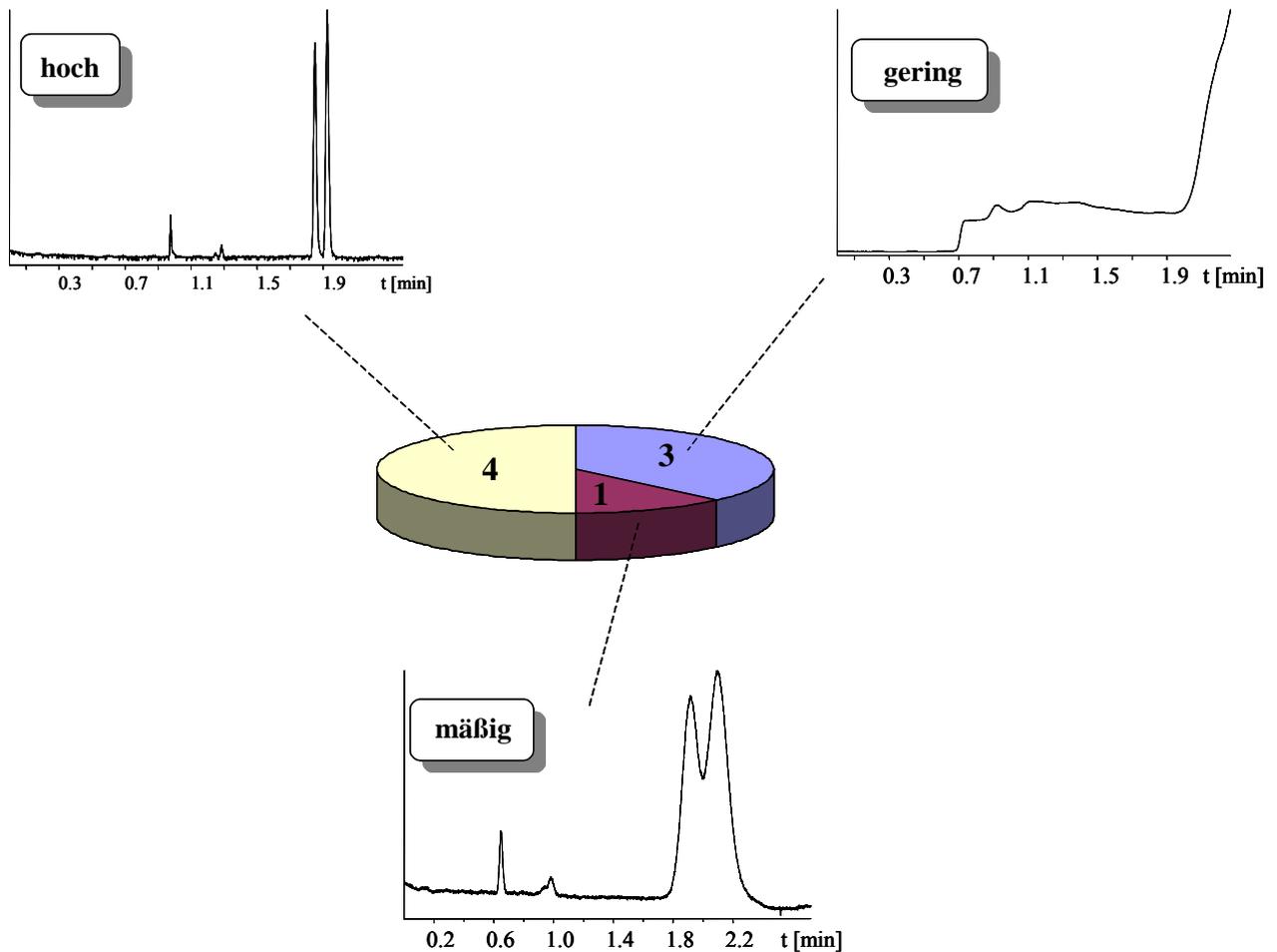


Abbildung 5.13 Reproduzierbarkeit von 8 Versuchen der Chip-Beschichtung mit thermisch immobilisierten PVA und Einteilung der Beschichtungsqualität nach der Trennleistung.

Die Reproduzierbarkeit der Belegungsprozedur ist mit 50 % nur mäßig. Inwieweit eine weitere Optimierung des Prozesses durch Variation der PVA-Konzentration, der Anzahl von Belegungsschritten und/oder durch Veränderung des Temperaturprogramms erfolgen kann, konnte hier nicht geklärt werden. Zur Steigerung der Zuverlässigkeit bedarf es weiterer Entwicklungsarbeit.

5.3 Verwendung hochselektiver chiraler Selektoren

5.3.1 Einleitung

In der klassischen Kapillarelektrophorese werden eine Vielzahl unterschiedlicher chiraler Selektoren wie z.B. Cyclodextrine (CD), Kronenether, Proteine, makrozyklische Antibiotika und chirale Mizellen eingesetzt [133]. CD werden hiervon am häufigsten verwendet, da sie eine Reihe von Vorteilen aufweisen. Sie sind UV-transparent, in wässriger Phase leicht löslich, stabil und kommerziell günstig zu erwerben [134]. Durch Derivatisierung der Hydroxylgruppen können die Eigenschaften der CD gezielt verändert werden. So entstehen durch Sulfatisierung CD, die bei einem pH-Wert größer 2,0 als Anionen vorliegen. Geladene CD ermöglichen nicht nur die Trennung ungeladener Analyte, sie weisen auch eine besonders hohe Selektivität gegenüber vielen basischen und sauren Verbindungen auf [135,136].

Dies gilt insbesondere für hochsulfatisierte Cyclodextrine (HS-CD) [117,137]. Die in dieser Arbeit eingesetzten HS-CDs besaßen einen durchschnittlichen Substitutionsgrad von 11 (α -Form), 12 (β -Form) bzw. 13 (γ -Form). Der Puffer bestand aus Triethylammoniumphosphat mit einem pH-Wert von 2,5. Bei diesem pH-Wert ist der EOF weitgehend unterdrückt und die polyanionischen CDs besitzen eine hohe elektrophoretische Mobilität in Richtung Anode. Die Enantiomere werden ungeachtet ihrer Ladung aufgrund ihrer starken Wechselwirkung mit den HS-CDs an der Anode detektiert. Die Ermittlung des für ein gegebenes Analyten optimalen HS-CDs erfolgte über ein systematisches Screening. Hierzu wurde der Analyt in dem entsprechenden Elektrolyten gelöst und mit Hilfe der klassischen CE getrennt. Eine weitere Optimierung durch Variation der Selektorkonzentration erfolgte nicht.

5.3.2 Mikrochipelektrophorese-System mit UV-Detektion

Das Hauptanwendungsgebiet der Mikrochipelektrophorese liegt zur Zeit in der Analyse von Biomolekülen wie Oligonukleotiden, Proteinen und Peptiden. Die Durchführung chiraler Trennungen ist erst kürzlich erfolgt und hat bislang nur wenig Beachtung gefunden [138]. In den wenigen hierzu erschienenen Arbeiten erfolgte die

Detektion durch Fluoreszenz. Sie ist aufgrund der hohen Empfindlichkeit die zur Zeit am häufigsten eingesetzte Detektionsmethode in der MCE. Ein Nachteil der Fluoreszenzdetektion ist jedoch, dass die meisten Analyte vor der Analyse derivatisiert werden müssen. Zur Vermeidung dieses zusätzlichen arbeitsaufwendigen Schrittes bietet sich die UV-Detektion an. Während die UV-Detektion in der CE häufig angewendet wird, ist sie in der MCE wegen der limitierten optischen Weglänge bislang selten eingesetzt worden [139,140].

Die UV-Detektion der nachfolgenden MCE-Messungen wurde auf einem kommerziellen System der Firma Shimadzu durchgeführt (s. experimenteller Teil). Das mit einer D₂-Lampe ausgestattete Gerät besitzt ein Dioden-Array, welches direkt unter dem Trennkanal angeordnet ist. Dieser bildgebende Detektor ermöglichte die Verfolgung der Trennungen in Echtzeit. Der für die UV-Messungen erforderliche Quarz-Chip besitzt eine Trennstrecke von lediglich 25 mm.

5.3.3 Ergebnisse

In der klassischen Kapillarelektrophorese erfolgt die Detektion an einem ortsfesten Detektionspunkt. Der bildgebende Detektor des Shimadzu-Systems ermöglicht jedoch die Verfolgung der Trennung in Echtzeit über die gesamte Trennstrecke. In der Abbildung 5.14 sind vier Elektropherogramme einer chiralen Trennung eines Tocainid-Derivates (Tabelle 5.2: Verbindung 9) zu sehen. Mit Hilfe der *pinched injection* wurde hierbei zunächst der Injektionskanal mit dem Analyten gefüllt und dieser im Kreuzungsbereich von Injektions- und Trennkanal fokussiert (0 s). Am linken Rand des oberen Bildes erkennt man eine schmale Zone, deren Intensität über den ausgewählten Bereich hinausgeht. Nach 60s erfolgt das Umschalten der Spannungen in den Trennmodus und der im Kreuzungsbereich befindliche Teil der Probe wird nun nach rechts in den Trennkanal injiziert und der Injektionskanal vom Rest der Probe freigespült. Im Trennkanal erfolgt dann die Auftrennung in die beiden Enantiomeren. So kann nach 6 s bereits eine Antrennung in die beiden Enantiomere beobachtet werden. Nach 23 s und einer Trennstrecke von 16 mm (bzgl. des 2. Signals) wird eine Basislinientrennung erhalten und unter Ausnutzung der Gesamttrennstrecke von 25 mm kann in 37 s eine Auflösung von 2,3 erzielt werden.

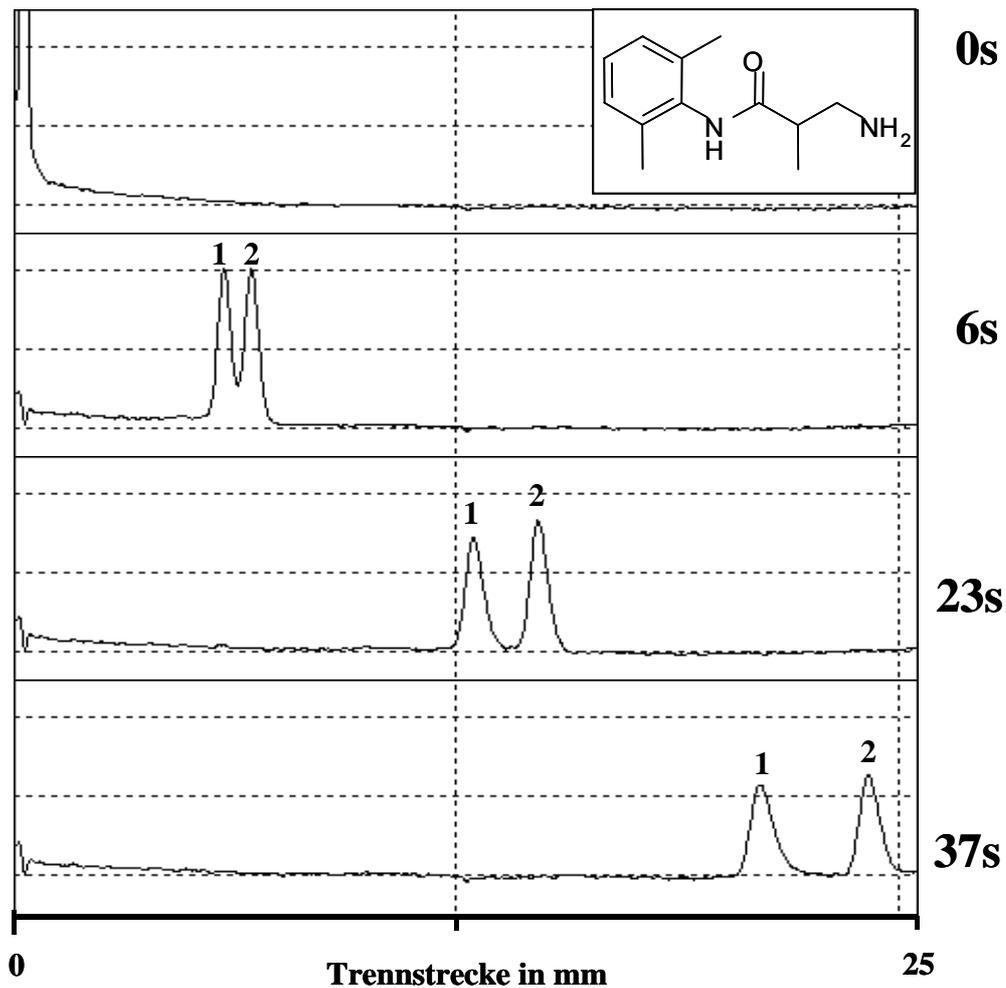


Abbildung 5.14 4 Elektrochromatogramme der chiralen Trennung eines Tocainid-Derivates nach unterschiedlichen Trennzeiten. Probe: 2 mg/mL. Elektrolyt: 5 % HS- γ -CD, 25 mM Triethylammoniumphosphat, pH 2,5. Injektion: BI 0,34; BO 0,30; SI 0,0; SO 0,84 [kV]. Trennung: BI 0,0; BO 1,8; SI und SO 0,5 [kV].

Für die strukturell sehr ähnliche Stammverbindung der Tocainide (Tabelle 5.1 Verbindung 7) ist unter Verwendung des gleichen Elektrolytsystems eine Basislinientrennung in lediglich 4 s auf einer Trennstrecke von 4,7 mm möglich. Noch schnellere chirale Trennungen können mit Norephedrin (Tabelle 5.1 Verbindung 19) erreicht werden. Vier Bilder der entsprechenden Videosequenz sind in der Abbildung 5.15 zu sehen. Das obere Bild zeigt wiederum die Fokussierung der Probe im Kreuzungsbereich der beiden Kanäle. Auf dem zweiten Bild aufgenommen nach 1,5 s, ist bereits eine Antrennung der beiden Signale zu erkennen, die nach lediglich 2,5

s zu einer Basislinientrennung führte. Dies entsprach zum damaligen Zeitpunkt der schnellsten chiralen Trennung.

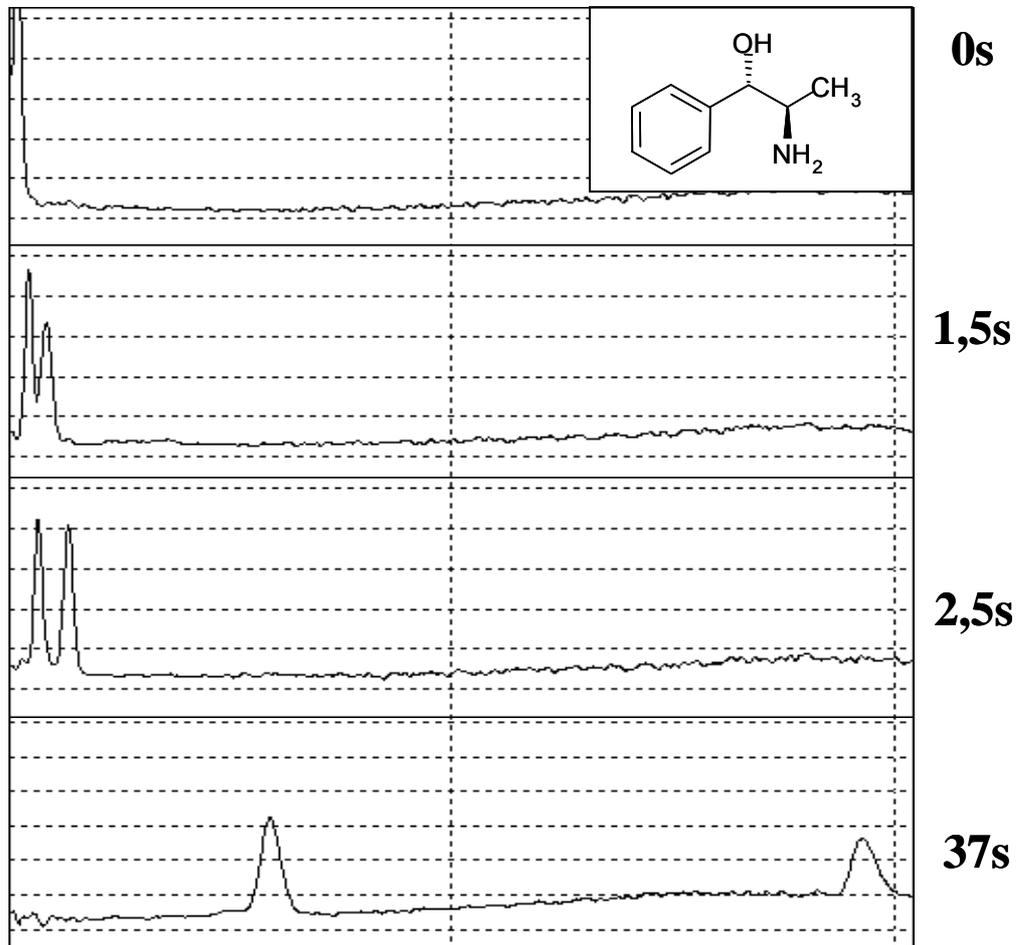


Abbildung 5.15 4 Elektropherogramme der chiralen Trennung von Norephedrin nach unterschiedlichen Trennzeiten. Weitere Bedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.14.

Die hohe Enantioselektivität der hochsulfatierten Cyclodextrine konnte eindrucksvoll an der Trennung eines Enantiomergemisches demonstriert werden. Trotz der sehr geringen Trennstrecke von 25 mm gelang die gleichzeitige Trennung eines Gemisches dreier enantiomerer Verbindungen in 11 s. Hierbei konnte eine Basislinientrennung aller Signale auf einer Trennstrecke von lediglich 12,5 mm erzielt werden. Ein entsprechendes Elektropherogramm ist in der Abbildung 5.16 zu sehen. Dieses Beispiel unterstreicht noch einmal das hohe Potential hinsichtlich der Möglichkeit der Durchführung sehr schneller chiraler Trennungen durch Kombination der MCE und der Verwendung hochselektiver chiraler Selektoren.

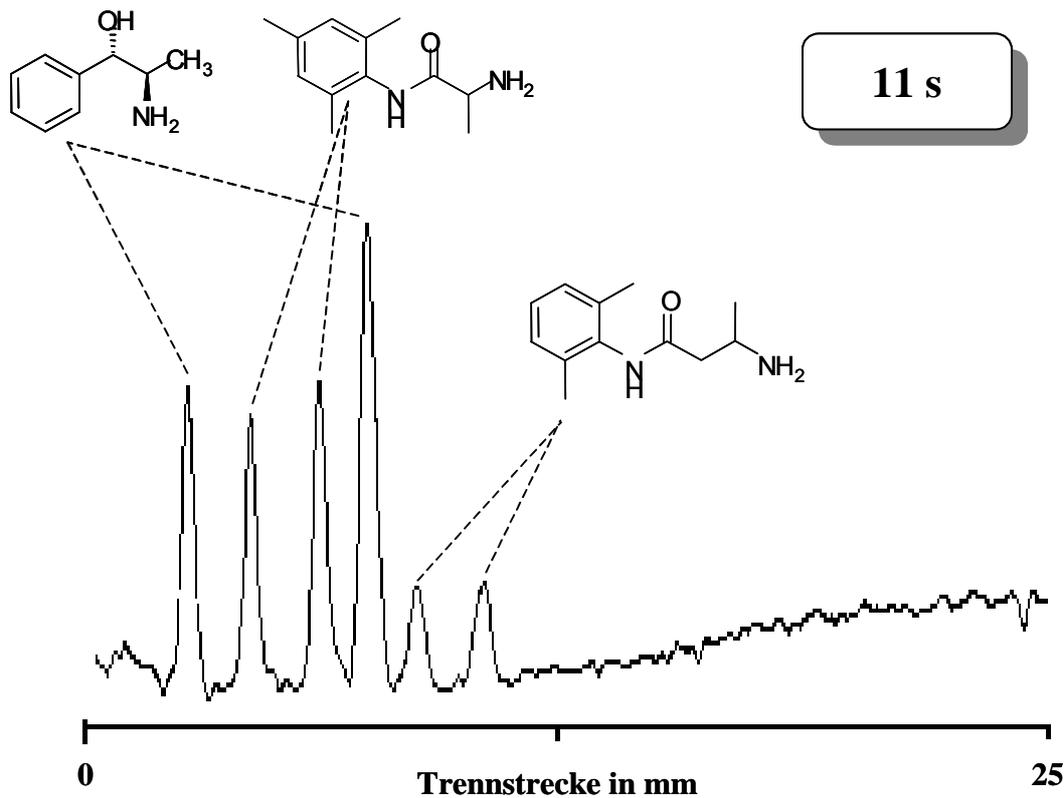


Abbildung 5.16 Simultane Trennung dreier chiraler Verbindungen in 11 s. Die Trennbedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.14.

Durch Verwendung verschiedener HS-CD konnte eine Vielzahl unterschiedlichster chiraler Verbindung getrennt werden. Die Strukturen von 19 Verbindungen und die elektrophoretischen Daten ihrer Trennung sind der ersten Spalte der Tabelle 5.2 zu entnehmen. Die Tabelle reicht von synthetisch wichtigen Grundbausteinen wie 1-Phenylethylamin (Verbindung 1) bis zu pharmazeutischen Verbindungen wie dem Betablocker Alprenolol (Verbindung 5) oder den antiarrhythmisch wirkenden Tocainiden (Verbindungen 6-13). In der zweiten Spalte der Tabelle 1 sind die für eine Basislinientrennung erforderliche Migrationszeit t sowie die Trennstrecke x aufgeführt. Alle 19 aufgeführten Verbindungen konnten in weniger als 1 min basisliniengetreunt werden. Bei fünf Verbindungen war sogar eine Basislinientrennung in weniger als 10 s möglich. Wird die gesamte Trennstrecke von 25 mm zur Trennung ausgenutzt, so sind entsprechend höhere Auflösungen erzielbar. Die hierbei erhaltenen Werte sind in der dritten Spalte der Tabelle 1

zusammengefasst. Während bei nur zwei Verbindungen eine Auflösung von weniger als zwei erreicht wurde, konnten in den anderen Fällen deutlich bessere Auflösungen von im Schnitt 3,6 erzielt werden. Die höchste Auflösung von 12,3 konnte in Fall der Verbindung 19 erzielt werden.

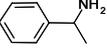
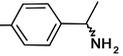
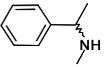
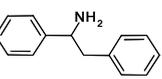
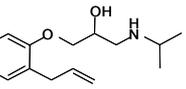
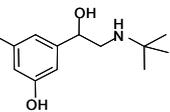
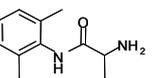
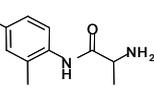
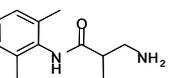
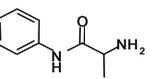
Verbindung	chiraler Selektor	A: Daten bzgl. Basislinientrennung		B: Daten bzgl. Ausnutzung gesamte Trennstrecke		
		t [s]	x [mm]	t [s]	RSD [%]	R
1 	HS- γ -CD	39	11,2	83	3,7	2,1 \pm 0,1
2 	HS- α -CD	15	13,6	28	4,2	2,6 \pm 0,2
3 	HS- β -CD	13	15,4	21	1,4	2,1 \pm 0,1
4 	HS- γ -CD	4	6	18	4,2	6,4 \pm 0,1
5 	HS- α -CD	20	21,6	23	1,2	1,9 \pm 0,2
6 	HS- γ -CD	28	12,8	56	5,8	2,6 \pm 0,1
7 	HS- γ -CD	4	4,7	25	3,1	7,3 \pm 0,5
8 	HS- α -CD	31	11,3	70	1,4	2,5 \pm 0,2
9 	HS- γ -CD	23	15,8	37	3,4	2,3 \pm 0,2
10 	HS- γ -CD	11	8,5	34	1,7	3,8 \pm 0,1

Tabelle 5.2: Elektrophoretische Daten der chiralen Trennung 19 unterschiedlicher Verbindungen (Teil 1)

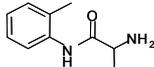
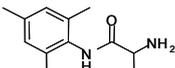
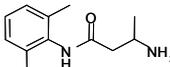
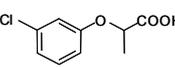
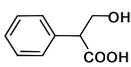
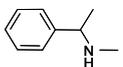
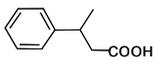
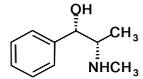
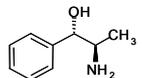
Verbindung	chiraler Selektor	A: Daten bzgl. Basislinientrennung		B: Daten bzgl. Ausnutzung gesamte Trennstrecke		
		t [s]	x [mm]	t [s]	RSD [%]	R
11 	HS- α -CD	7	4,8	36	7,3	6,3 \pm 0,4
12 	HS- γ -CD	11	11,1	26	3,4	4,1 \pm 0,4
13 	HS- γ -CD	9	5,9	40	1,4	5,7 \pm 0,3
14 	HS- α -CD	27	16,1	43	0,7	2,2 \pm 0,1
15 	HS- β -CD	22	10,8	50	7,3	2,9 \pm 0,2
16 	HS- γ -CD	58	18,1	74	1,4	1,7 \pm 0,1
17 	HS- γ -CD	31	13,2	59	3,5	2,3 \pm 0,3
18 	HS- β -CD	10	15,8	16	3,6	3,0 \pm 0,1
19 	HS- γ -CD	3	2,5	37	4,8	12,3 \pm 0,6

Tabelle 5.2: Elektrophoretische Daten der chiralen Trennung 19 unterschiedlicher Verbindungen (Teil 2)

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und der Auflösung wurde jede Messung dreimal durchgeführt. Die hierbei erhaltenen Werte sind in der dritten Spalte der Tabelle 5.1 aufgeführt. Die Migrationszeiten konnten hierbei mit einer durchschnittlichen relative Standardabweichung (RSD) von 3,3 % ermittelt werden, wobei im schlechtesten Falle die RSD 7,3 % und im besten Falle die RSD 0,7 % betrug. Diese hohe Reproduzierbarkeit wird auch aus der Abbildung 5.17 ersichtlich, in der die nach jeweils 9 s erhaltenen Elektropherogramme von 3 aufeinanderfolgenden Trennungen dargestellt werden.

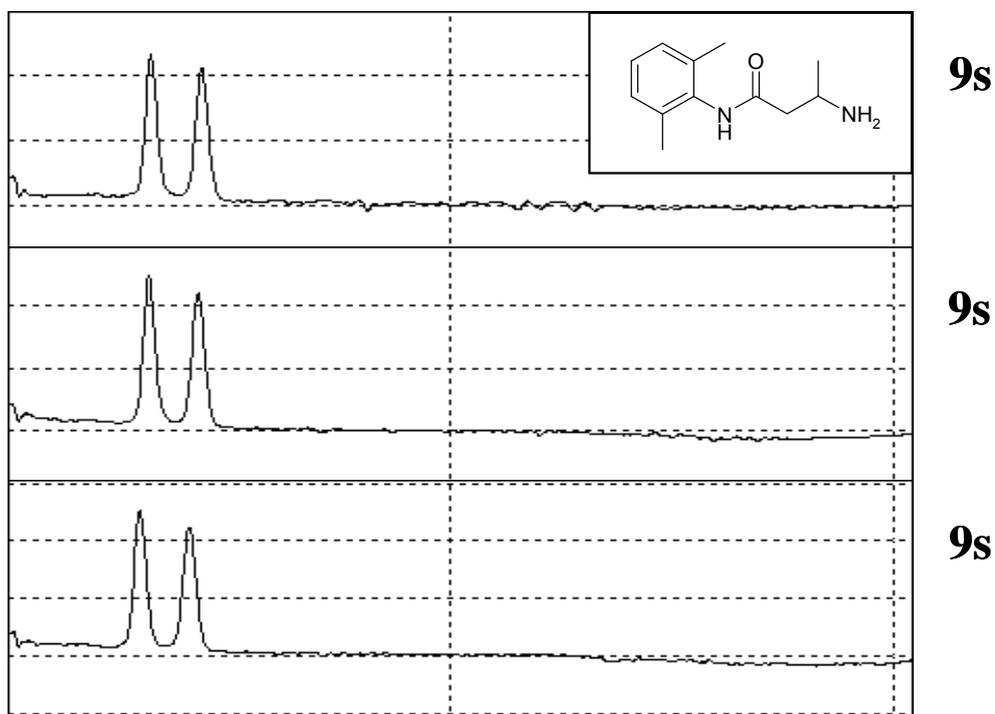


Abbildung 5.17 Reproduzierbarkeit der chiralen Trennung eines Tocainid-Derivates. Die Trennbedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.14.

Diese hohe Reproduzierbarkeit konnten erhalten werden, da der EOF stark reduziert und damit sehr stabil war. Die starke Erniedrigung des EOF kann durch den niedrigen pH-Wert des Puffers von 2,5 und einer besonders hohen Ionenstärke durch die polyanionischen HS-CD erklärt werden. Der stabile EOF führte zu stabilen Injektionsbedingungen, die zusätzliche den EOF stabilisierende Schritte wie ein Spülen der Mikrochip-Kanäle mit NaOH überflüssig machten. Zwischen den Messungen wurden die Chip-Kanäle lediglich mit Wasser und Elektrolyt gespült wie

im experimentellen Teil näher beschrieben. Neben der erfolgreiche Trennung einer Vielzahl von Verbindungen war es auch möglich, die optische Reinheit von Pseudoephedrin zu ermitteln. Dies ist in der Abbildung 5.18 zu sehen, in der 2 % des (-)-Enantiomers erfolgreich neben der Hauptkomponente bestimmt werden konnte.

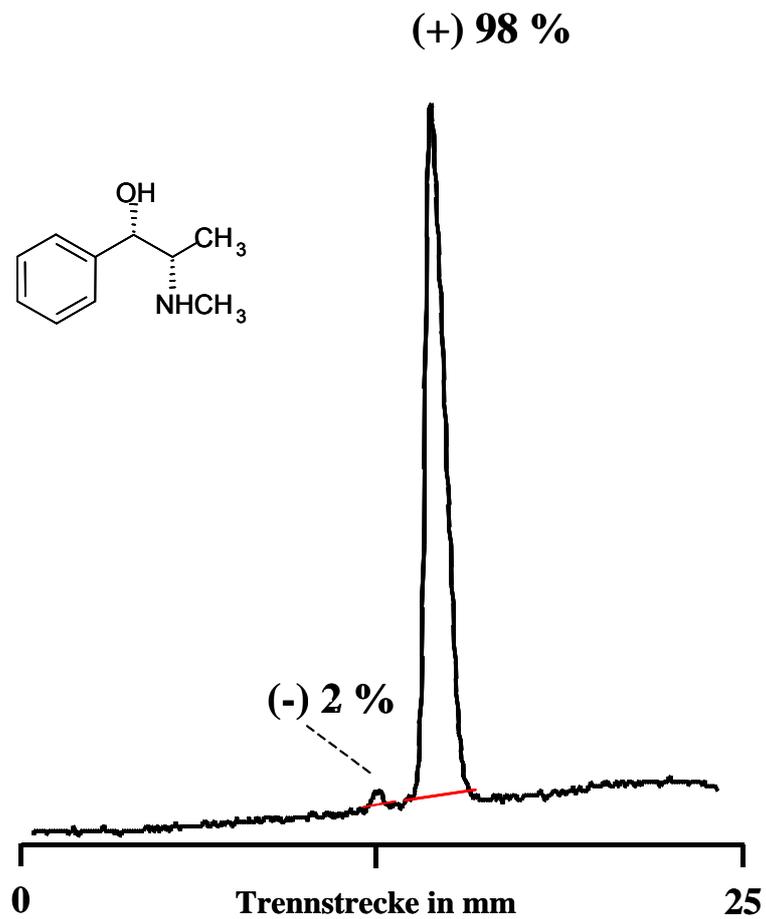


Abbildung 5.18 Bestimmung der optischen Reinheit von Pseudoephedrin. Chiraler Selektor: HS- β -CD. Die Trennbedingungen entsprechen denen der Abbildung 5.14.

6. Experimenteller Teil

6.1 Berechnung der Feldstärke

Zur Berechnung der im Trennkanal anliegenden Feldstärke, muß die im Kreuzungsbereich von Injektions- und Trennkanal anliegende Spannung U_k bekannt sein [141]. Das elektrische Schaltbild eines einfachen Kreuz-Injektors ist in der Abbildung 6.1 dargestellt.

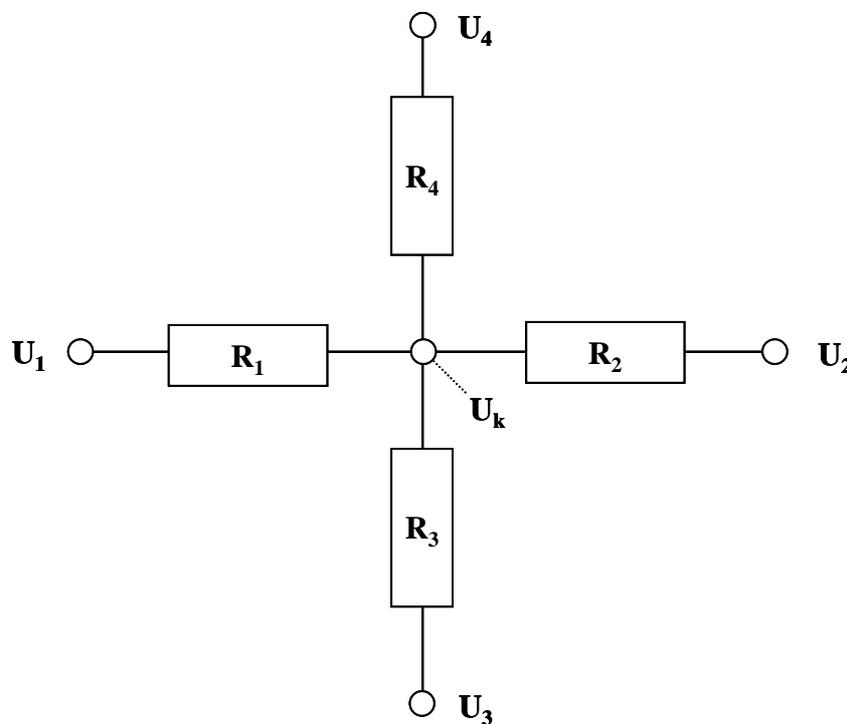


Abbildung 6.1 Ersatzschaltbild eines Kreuzinjektors

Der elektrische Widerstand R in den vier Kanalsegmenten ist sowohl proportional zum spezifischen Widerstand ρ des Elektrolyten als auch zur Länge l bzw. dem Querschnitt A des Segments (6.1).

$$R = \rho l / A \quad (6.1)$$

Da der Querschnitt und der spezifischer Widerstand in allen Segmenten gleich ist, kürzen sich ihre Beiträge heraus und lediglich die Segmentlänge muß im folgenden berücksichtigt werden. Die Stromstärke in den Segmenten beträgt gemäß der Gleichung (6.2):

$$I_1 = (U_1 - U_k) / \left(\frac{l_1}{l_3} R \right)$$

$$I_2 = (U_2 - U_k) / \left(\frac{l_2}{l_3} R \right) \quad (6.2)$$

$$I_3 = (U_3 - U_k) / R$$

$$I_4 = (U_4 - U_k) / R$$

Entsprechend des 1. Kirchhoffschen Gesetzes addieren sich die abfließenden und zufließenden elektrischen Ströme im Kreuzungsbereich zu Null.

$$\sum_i I_i = 0 \quad (6.3)$$

Setzt man die Gleichung (6.2) in die Gleichung (6.3) ein und stellt diese nach U_k um, so erhält man für die Spannung im Kreuz die Gleichung (6.4),

$$U_k = \frac{U_3 + U_4 + (l_3 / l_1) U_1 + (l_3 / l_2) U_2}{2 + l_3 / l_1 + l_3 / l_2} \quad (6.4)$$

aus der dann leicht die Feldstärke im Trennkanal berechnet werden kann:

$$E = (U_k - U_2) / l_2 \quad (6.5)$$

6.2 Datenerfassung

Die elektronische Erfassung der Signale erfolgte mit einer Datenrate von 25 Hz über die hauseigene Computeranlage. Zur Auswertung diente die hausinterne *Colachrom*-Software [142]

6.3 GC-Bestimmung der Enantiomerenreinheit

Die Enantiomerenreinheit der underivatisierten Amine wurde mit einem Hewlett Packard 6890 Series 2 Gas-Chromatographen (Waldbronn, Deutschland) bestimmt, welcher mit einer chiralen stationären Phase (Ivadex-1/PS086, $d_f = 0,15 \mu\text{m}$; ID = 0.25 mm; l = 25 m) und einem FID ausgestattet war. Die Probeninjektion (1 μL / 1 mL Aceton) erfolgte mit einem HP7683-Autosampler. Als Trägergas wurde Wasserstoff (0,5 bar) eingesetzt. Das Temperaturprogramm betrug 60°C-150°C mit einer Heizrate von 2 °C/min. Die Injektortemperatur betrug 200 °C, die des Detektors 300 °C.

6.4 CE-Instrument und Kapillaren

Die CE-Experimente wurden mit einem Eigenbausystem des Max-Planck-Institutes durchgeführt [143]. Die Detektion erfolgte on-column, mit Hilfe eines Spectra-100 UV-Detektors von Spectra Physics (Darmstadt, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 214 nm. Die FS-Kapillare hatte einen ID von 50 μm und wurde von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) bezogen.

6.5 Chip-Beschichtung

Vor der Beschichtung des Chips wurden die Kanaloberflächen mit 1 M NaOH 1 Stunde lang konditioniert und anschließend mit deionisiertem Wasser 1 min lang gespült. Hiernach wurde, mit Hilfe einer 50 μL -Spritze, eine zentrifugierte wässrige PVA-Lösung schrittweise durch die 4 Reservoirs gedrückt (Abbildung 6.2A). Nach dem vollständigen Befüllen des Chips, wurde dieser durch Anwendung eines

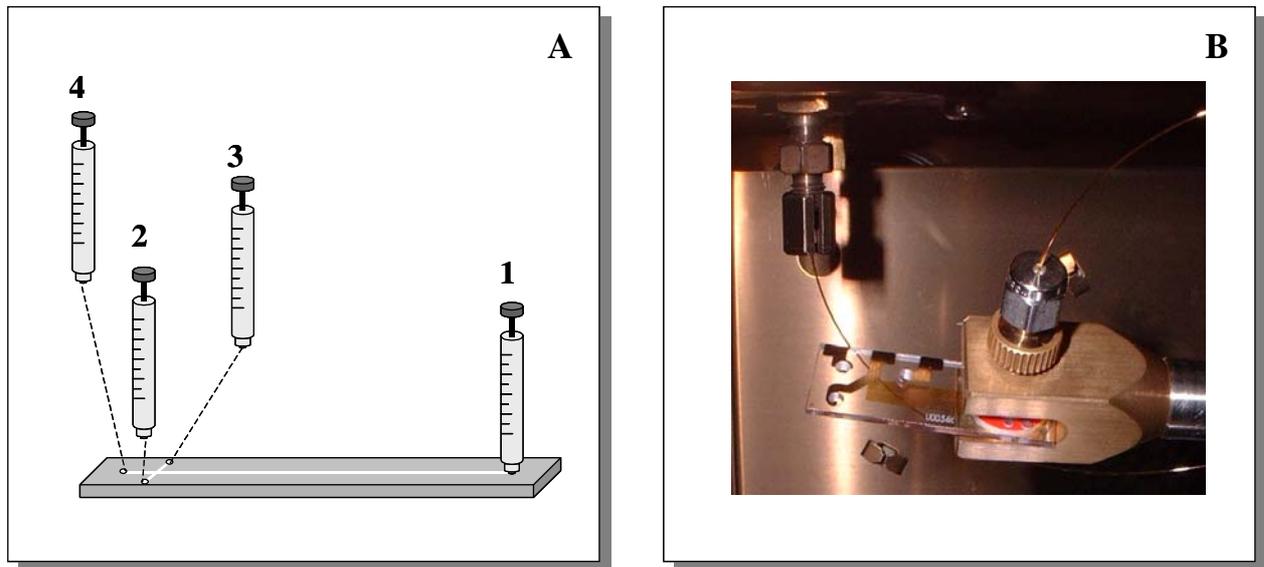


Abbildung 6.2 Schematische Darstellung zum schrittweisen Befüllen der Mikrochip-Kanäle mit PVA-Lösung (A) sowie ein Photo einer metallischen Halterung mit Quarz-Chip installiert in einem GC-Gaschromatographen zur thermischen Immobilisierung der Oberflächenbeschichtung (B).

Gasstroms (N_2 , 5 bar) wieder entleert. Der Vorgang des Befüllens und Entleerens wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Chip mit Hilfe eines metallischen Verbindungsstückes mit einer FS-Kapillare verbunden und die Kanäle in einem Gasstrom (N_2 , 5 bar) 15 min lang vorgetrocknet. Zur thermischen Immobilisierung der PVA-Beschichtung wurde dieser mit dem Verbindungsstück versehen in einem GC-Ofen eingebaut (Abbildung 6.2B) und in einem 1. Temperaturschritt mit $15^\circ\text{C}/\text{min}$ auf 70°C aufgeheizt und 1 Stunde lang bei dieser Temperatur gehalten. In dem folgenden 2. Schritt wurde die Temperatur mit $15^\circ\text{C}/\text{min}$ 10 min lang auf 160°C gebracht und anschließend der Chip im Ofen auf 40°C abgekühlt. Während des gesamten Prozesses wurde ein Stickstoffstrom mit 1,5 bar durch die Kanäle gedrückt.

6.6 Konditionierung und Lagerung der Chips

- *unbeschichtet*: Vor jedem erneutem Gebrauch wurden die Chips zunächst 1 Stunde lang mit 1 M NaOH gefüllt und anschließend 2 min lang mit Wasser und

Puffer gespült. Nach jeder Anwendung wurden die Chips 2 Minuten lang mit Wasser gespült. Zur Reinigung wurden die Chips mit 96% H_2SO_4 / 30% H_2O_2 über Nacht gefüllt. Zur Lagerung wurde 2 Minuten lang mit Wasser und Methanol gespült und anschließend trocken gesaugt.

- *beschichtet*: Vor jeder erneuten Benutzung wurde die PVA-Chips 2min lang mit Wasser und Puffer gespült. Nach den Gebrauch wurden die Chips 2 min lang mit Wasser gespült. Die Lagerung erfolgte in 40 mM CHES-Puffer mit pH 9,2.

6.7 Durchführung der MCE-Messungen Fluoreszenzsystem

Während das Entleeren der Reservoirs mit Hilfe von Vakuum und einer in die Reservoirs eintauchenden Nadel durchgeführt wurde, erfolgte das Befüllen durch einen μL -Dispenser. Durch Anlegen von Vakuum am BO konnten die Kanäle gespült werden.

Vor jeder Messung mußten die Kanäle blasenfrei mit dem entsprechenden Puffer gefüllt werden. Hierzu wurden eventuell vorhandene Reste von Probe, Puffer oder Spüllösung aus der Vormessung bzw. dem Spülschritt entfernt, die Reservoirs mit 2 μL Puffer gefüllt und durch Anlegen von Vakuum am BO die Kanäle 30 Sekunden lang gespült. Anschließend wurden die Reservoirs erneut entleert und BI, BO und SO mit je 2 μL Puffer bzw. SI mit 2 μL Probe aufgefüllt. Nach dem Aufsetzen der Elektrodenplatte und Ausrichtung des Trennkanals, wurde die Probe mittels *pinched injection* injiziert und aufgetrennt. Nach jeder Messung wurden die Reservoirs entleert und die Kanäle gegebenenfalls mit NaOH 30 Sekunden lang gespült werden.

6.8 MCE-System mit UV-Detektor

Hierbei handelte es sich um ein MCE 2010-System von Shimadzu (Kyoto, Japan). Das mit einer D_2 -Lampe ausgestattete Instrument besitzt ein Dioden-Array mit 1024 Elementen, welches direkt unter dem gesamten Trennkanal angeordnet ist. Dieses ermöglicht die Verfolgung der Trennung in Echtzeit, wie es auch bei der

Gelelektrophorese möglich ist. Das System besitzt einen Autosampler und eine Spritzeneinheit zum Befüllen und Entleeren und ist vollautomatisierbar. Die Analyse erfolgt über eine separate Software.

6.9 Durchführung der MCE-Messungen UV-System

Obwohl die Messungen vollautomatisch durchgeführt werden können, erfolgte das Befüllen des Chips aus Kostengründen manuell. Im Gegensatz zum Eigenbausystem wurde jedoch auf die Anwendung von Vakuum verzichtet, vielmehr wurde das Befüllen mit einer 50 µL-Spritze unter Anwendung von Druck durch die BO-Öffnung durchgeführt¹. Vor dem 1. Gebrauch wurde der Chip 1 Stunde lang mit 0,1 M NaOH geätzt und vor jeder Messung mit Wasser gespült. Nach Entleeren der Reservoirs wurde Puffer durch das System gedrückt, die Reservoirs erneut geleert und schließlich mit je 4 µL Puffer bzw. Probe gefüllt. Diese Vorgehensweise stellte eine gleichstarke Befüllung der Reservoirs sicher. Nach Einsetzen des Chips in das Instrument konnte die Probe unter Verwendung eines zweistufigen *pinched-injection*-Hochspannungsprogramms injiziert und getrennt werden.

Nach Gebrauch wurde der Chip gründlich mit Wasser und Aceton gereinigt und die Kanäle trockengesaugt.

6.10 Herstellung der Elektrolytlösungen

6.10.1 CHES-Puffer

Zur Herstellung der Puffer wurde eine entsprechende Menge CHES eingewogen und auf das gewünschte Volumen mit Wasser aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 3 M NaOH mit Hilfe einer Glaselektrode eingestellt. Die Herstellung der

¹ Die Wahl der Befüllungsmethode des Mikrochips, erfolgte aus reinen praktischen Erwägungen. Beide Methoden sind äquivalent und können unabhängig vom verwendeten Chipmaterial eingesetzt werden.

cyclodextrinhaltigen Puffer erfolgte durch Lösen einer entsprechende Menge Cyclodextrin im CHES-Puffer.

6.10.2 Hochsulfatierte Cyclodextrin-Puffer

Die Herstellung der Puffer erfolgte durch Vermischen von 1 Volumenteil 20 % wässriger HSCD-Lösung (α , β bzw. γ), 1 Volumenteil Wasser und 2 Volumenteilen Triethylammoniumphosphatpuffer.

6.11 Derivatisierung von Aminen mit Fluoresceinisothiocyanat

Zur Derivatisierung werden jeweils 100 μL Aminlösung (0,67 μmol in Aceton bzw. Methanol), 12,7 μL FITC-Lösung (0,33 μmol in Aceton) und 50 μL Boratpuffer (20 mM, pH 9) zusammengegeben. Um überschüssiges FITC zu vermeiden, wurde ein Molverhältnis Amin zu FITC von 2 zu 1 gewählt. Nach ca. 1 Stunde unter Lichtausschluß ist die Reaktion beendet. Die so erhaltenen Stammlösungen (je 2 mM) sind bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ca. 4 Woche verwendbar.

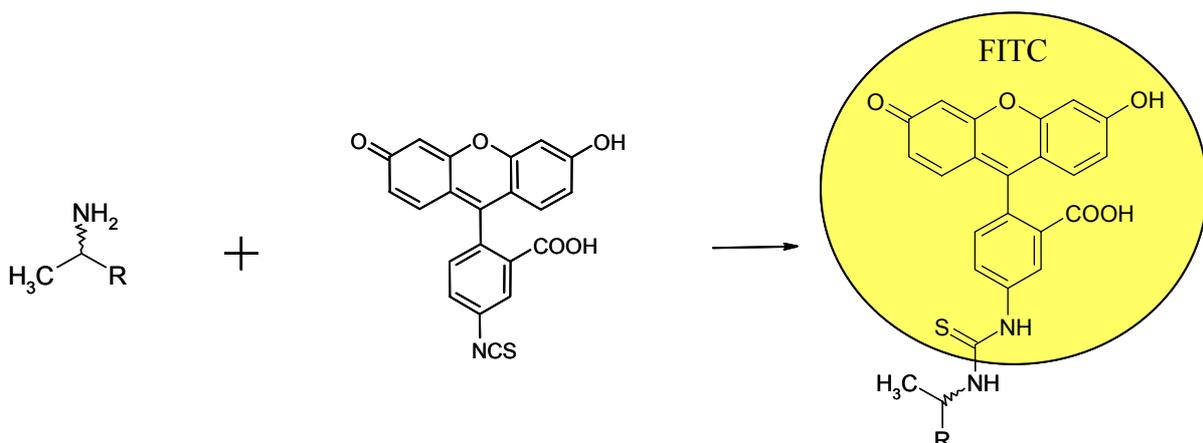


Abbildung 6.3 Reaktionsgleichung der Derivatisierung von Aminen mit FITC

6.12 Derivatisierung von Aminen mit Alexafluor®350

Zur Derivatisierung werden jeweils 100 µl Aminlösung (0,5-1 µmol in Acetonitril), 20 µL Alexa Fluor® 350 carbonsäure-succinimidylester (0,05 µmol in DMSO) und 50 µL Boratpuffer (20 mM, pH 8,5) zusammengegeben. Nach ca. 4 Stunde unter Lichtausschluß ist die Reaktion beendet. Die so erhaltenen Stammlösungen (je 0,3 mM) sind bei -20 °C ca. 1 Woche verwendbar.

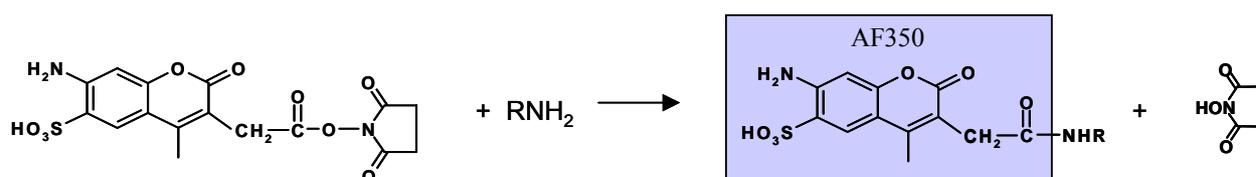


Abbildung 6.4 Reaktionsgleichung der Derivatisierung von Aminen mit AF 350

6.13 Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

Acetone, HPLC-grade	Merck ²
Acetonitril	Fluka ³
Alexa Fluor® 350 carbonsäure-succinimidylester	Molecular Probes ⁴
Alprenolol	Prof. J. Crommen ⁵
3-Amino-N-(2,6-dimethylphenyl)-butanamid	Astra-Hässle ⁶
3-Amino-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-methylpropanamid	Astra-Hässle
2-Butylamin	Aldrich ⁷
2-(3-Chlorphenoxy)-propionsäure	Aldrich
2-(N-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure (CHES)	Sigma ⁸
(R)(-) / (S)(+)-1-Cyclohexylethylamin	Aldrich

² Merck (Darmstadt, Deutschland)

³ Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)

⁴ Molecular Probes (Leide, Niederlande)

⁵ Prof. J. Crommen (Universität Lüttich, Belgien)

⁶ Astra-Hässle (Mölnal, Schweden)

⁷ Aldrich (Steinheim, Deutschland)

⁸ Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Dicyclohexylamin	Aldrich
(R)-(+)/(S)-(-)- α -4-Dimethylbenzylamin	Aldrich
N-(2,4-Dimethylphenyl)-alaninamid	Astra-Hässle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
1,2-Diphenylethylamine	Aldrich
Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC, Isomer I)	Fluka
Fluorescein	Merck
Hochsulfatiertes- α -Cyclodextrin (HS- α -CD)	Beckman Coulter ⁹
Hochsulfatiertes- β -Cyclodextrin (HS- β -CD)	Beckman Coulter
Hochsulfatiertes- γ -Cyclodextrin HS- γ -CD)	Beckman Coulter
Hydroxyethyl- β -Cyclodextrin (HE- β -CD), MS=1,0	Wacker
Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin (HP- γ -CD), MS=0,6	Wacker
Methanol, HPLC-grade	Merck
N-(2-Methylphenyl)-alaninamid	Astra-Hässle
N-Methyl-1-phenylethylamin	Aldrich
Metoprolol	Prof. J. Crommen
Natriumhydrogenphosphat-monohydrate	Merck
Natriumhydroxid	Fluka
Natriumtetraborat-decahydrat	Fluka
Norephedrin	Aldrich
2-Oktylamin	Aldrich
N-Phenylalaninamid	Astra-Hässle
3-Phenylbutansäure	Fluka
1-Phenylethylamin	Aldrich
Polyvinylalkohol (PVA) (M _r 89000-98000)	Aldrich
Propranolol	Prof. J. Crommen
Pseudoephedrin	Aldrich
Rhodamin B	Fluka
Rhodamin 123	Fluka
Schwefelsäure	Fluka
Sulforhodamin B	Aldrich

⁹ (Unterschleissheim, Deutschland)

Terbutalin	Prof. J. Crommen
Triethylammoniumphosphat-Puffer	Beckman Coulter
N-(2,4,6-Trimethylphenyl)-alaninamid	Astra-Hässle
Tocainid	Astra-Hässle
Tropasäure	Aldrich
Wasserstoffperoxid	Fluka

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Verfügbarkeit von enantiomerenreinen Verbindungen und die damit verbundene Bestimmung der Enantiomerenreinheit ist von grundlegendem Interesse für die pharmazeutische und präparativen Organischen Chemie. Durch Einführung von kombinatorischen Techniken zur Entwicklung asymmetrischer Katalysatoren ist ein Bedarf nach chiralen Hochdurchsatz-Screeningsystemen (HTS) entstanden. Während die Kapillar-Array-Elektrophorese bereits erfolgreich als chirales HTS eingesetzt wurde, steht der Einsatz eines HTS auf Basis der Mikrochipelektrophorese (MCE) noch aus.

Um eine Grundlage für ein potentielles HTS zu schaffen, mußte zunächst ein robust arbeitendes Mikrochipelektrophorese-System aufgebaut werden. Ein solcher Aufbau wurde auf Basis eines inversen Fluoreszenzmikroskops realisiert. Dieses neue MCE-2-System besteht aus einer Vier-Kanal-Hochspannungsquelle sowie einem lampengestützten Epifluoreszenz-Detektionssystem. Mit diesem Aufbau war es möglich, den Einfluss experimenteller Parameter auf MCE-Trennungen systematisch zu untersuchen und diese gezielt zu verbessern. Hierdurch konnte die im Vergleich zum ursprünglichen bereits bestehenden MCE-1-System geringe Robustheit und Reproduzierbarkeit wesentlich verbessert werden. Das lampengestützte Fluoreszenzsystem ermöglicht zudem eine variable Wellenlängenanregung bei hoher Detektionsempfindlichkeit. So wurden beispielsweise für Rhodaminfarbstoffe und Fluoresceinderivate Nachweisgrenzen im oberen ppt-Bereich erzielt, wodurch vergleichbare Literaturdaten um mehr als drei Zehnerpotenzen übertroffen wurden. Das mit zwei Kameras ausgestattete Instrument ermöglichte ferner die videomikroskopische Verfolgung des Injektionsprozesses und eine exakte Justierung des Trennkanals im Strahlengang. Mit diesem System konnte ein Zusammenhang zwischen dem Injektionsprozess und dem resultierenden Elektropherogramm hergestellt werden. Mögliche Fehlerquellen konnten so erkannt und vermieden werden. Für anspruchsvolle chirale Trennung musste die im Vergleich zur klassischen Kapillarelektrophorese vorhandene geringere Auflösung verbessert werden. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt.

Zum einen wurden die Oberflächeneigenschaften der mikrofluidischen Kanäle durch Beschichtung gezielt verändert. Durch Modifikation eines für die klassische Kapillarelektrophorese entwickelten Verfahrens gelang erstmals die Innenbeschichtung von Mikrochips mit Polyvinylalkohol (PVA). Die PVA-Beschichtung führt zu einer Verringerung von Analyt-Wand-Wechselwirkungen und zu einer Unterdrückung des elektroosmotischen Flusses. Hierdurch konnten in PVA-beschichteten Kanälen im Vergleich zu unbeschichteten Mikrochips deutlich höhere Trenneffizienzen erzielt werden. Durch ein gleichförmiges ζ -Potential in den einzelnen Kanalabschnitten werden druckinduzierte Dispersionseffekte vermieden, wodurch deutlich symmetrischere, flachere Zonen erhalten werden. Dies konnte anhand von videomikroskopischen Daten belegt werden. Ein flaches Strömungsprofil ermöglichte die achirale Trennung von fluoreszenzmarkierten Aminen in 800 ms auf einer Trennstrecke von lediglich 650 μm . Eine vergleichbare Trennleistung konnte mit unbeschichteten Chips nicht erzielt werden. Die erhöhte Trennleistung konnte auch an mehreren derivatisierten Aminen demonstriert werden. So war es möglich die Enantiomerenverhältnisse mit hoher Präzision ($\text{RSD}=1,9\%$) und Genauigkeit ($R=0,9996$) zu bestimmen. Aufgrund der in PVA-beschichteten Chips erzielten hohen Auflösung war es sogar möglich 1,1 % der Nebenkomponente zu quantifizieren. Durch PVA-Beschichtung konnte zudem die Reproduzierbarkeit der Migrationszeit auf 0,6 % verbessert werden, wobei gleichzeitig auf aufwendige Spülschritte verzichtet werden konnte.

Eine weitere Möglichkeit, die chirale Trennleistung zu erhöhen, ist die Verwendung eines hochselektiven Elektrolytsystems. Dies konnte auf einem kommerziellen MCE-System mit UV-Detektion realisiert werden. Mit Hilfe dieses für DNA-Applikationen konzipierten Systems, war die Basislinientrennung von 19 chiralen Verbindungen in weniger als 1 min auf einer Trennstrecke von lediglich 25 mm möglich. Als chirale Selektoren wurden hochsulfatierte Cyclodextrine eingesetzt. Die relative Standardabweichung betrug hierbei weniger als 7 %. Die schnellste Trennung erfolgte in 2,5 s, was zu diesem Zeitpunkt die schnellste chirale Trennung war. Ferner wurde auf einer Trennstrecke von 12 mm in 11s die Auftrennung einer Mischung dreier chiraler Verbindungen erzielt. Quantitativ war es möglich 2 % der Nebenkomponente zu bestimmen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse haben gezeigt, daß die chirale MCE eine schnelle Alternative zur HPLC aber auch zur CE ist. Während jedoch die CAE bereits als robustes HTS-System gilt, muß die Mikrochipelektrophorese sich in der Praxis noch bewähren. Zur Weiterentwicklung des bereits bestehenden Systems sind mehrere Wege denkbar. Zur Erhöhung des Probendurchsatzes kann das Chip-Layout verändert werden. So kann durch parallele Anordnung einer Vielzahl von Kanälen die chirale Trennung vieler Proben simultan erfolgen. Aber auch die Integration von Analyse und enantioselektiver Reaktion auf einem einzigen Chip ist möglich.

Die optischen Komponenten des Fluoreszenz-Detektionssystems bestehen aus Borosilikatglas, das erst ab etwa 300 nm transparent ist und bis etwa 320 nm fluoresziert. Da nur die wenigsten Verbindungen bei Wellenlängen von mehr als 320 nm eine native Fluoreszenz besitzen, ist eine Derivatisierung der Analyten vor der Analyse gewöhnlich notwendig. Dieser Schritt ist nicht nur zeitaufwendig, sondern teilweise auch schwierig durchzuführen. Optischen Komponenten aus Quarz- bzw. fused silica erlauben jedoch Fluoreszenzmessungen ab etwa 200 nm (tiefes UV). Dies ermöglicht die native Fluoreszenzanregung einer Vielzahl von Verbindungen ohne das aufwendige Derivatisierungsschritte notwendig wären.

8. Verzeichnis wichtiger Abkürzungen und Symbole

α	Selektivität
ϵ	elektrische Feldkonstante [$A^2 \cdot s^2 \cdot J^{-1} \cdot m^{-1}$]
κ^{-1}	Doppelschichtdicke [m]
μ -TAS	Mikrototalanalysesystem
μ_{EOF}	elektroosmotische Mobilität [$cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$]
μ_{ep}	elektrophoretische Mobilität [$cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$]
μ_{ges}	effektive Mobilität [$cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$]
η	dynamische Viskosität [Pa·s]
ρ	spezifischer Widerstand [$V \cdot m \cdot A^{-1}$]
σ	Oberflächenladungsdichte [$C \cdot m^{-2}$]
σ	Standardabweichung [s oder m]
ζ	Zetapotential [V]
Ψ	elektrische Potential [V]
Ψ_i	elektrische Potential innere Helmholtz-Schicht [V]
Ψ_s	Stern-Potential [V]
A	Anion
A	Querschnitt [m^2]
AF350	AlexaFluor 350
BI	Buffer-Inlet
BO	Buffer-Outlet
CAE	Kapillar-Array-Elektrophorese
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CATB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
D	Diffusionskoeffizient [m^2/s]
D ₂	Deuterium
d _f	Filmdicke

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	elektrische Feldstärke
e	Elementarladung [C]
ee	Enantiomerenüberschuß
EOF	elektroosmotische Fluß
ep	elektrophoretisch
FID	Flammenionisationsdetektor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	fused silica
GC	Gaschromatographie
HEC	Hydroxycellulose
Hg	Quecksilber
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HS-CD	hochsulfatiertes Cyclodextrin
I	Ionenstärke
ID	Innendurchmesser
IR	Infrarot (760 nm - 0,5 mm)
K	Kation
l	Zonenbreite [m]
L	effektive Trennstrecke [m]
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
M	Molar [mol/L]
MCE	Mikrochipelektrophorese
MCE-1-System	vor der Promotion bereits bestehendes Mikrochipelektrophorese-System
MCE-2-System	während dieser Arbeit optimiertes Mikrochipelektrophorese-System
MEKC	Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie
MS	Massenspektrometrie
N	Neutralteilchen
N	Trennstufenzahl [dimensionslos]
NACE	nichtwäßrige Kapillarelektrophorese

nm	Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
pL	Picoliter
pM	Picomolar
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	Photomultiplier
Pt	Platin
PVA	Polyvinylalkohol
r	Korrelationskoeffizient
r	Teilchenradius [m]
R	Auflösung [dimensionslos]
R	elektrische Widerstand [$V \cdot A^{-1}$]
RSD	relative Standardabweichung
SI	Sample-Inlet
SO	Sample-Outlet
t	Migrationszeit [s]
U	Trennspannung [V]
UV	Ultraviolett (10-400 nm)
v_{ep}	elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [$m^2 \cdot s^{-1}$]
w	Basisbreite eines Peaks [s oder m]
W	Watt
w/w	Massenanteil
w_h	Halbwertsbreite [s oder m]
x	Abstand von der starren Schicht [m]
x	Wegstrecke [m]
z	Ladung eines Teilchens

9. Literaturverzeichnis

- [1] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Science* **1981**, 222, 266.
- [2] D.J. Harrison, A. Manz, Z.H. Fan, H. Ludi, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* **1992**, 261, 895.
- [3] S.C. Jacobson, R. Hergenröder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1114.
- [4] A.T. Wooley, G.F. Sensabaugh, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2181.
- [5] J.W. Simpson, M.C. Ruiz-Martinez, G.T. Mulhern, J. Berka, D.R. Latimer, J.A. Ball, J.M. Rothberg, G.T. Went, *Electrophoresis* **2000**, 21, 135.
- [6] C.X. Zhang, A. Manz, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2656.
- [7] C.S. Effenhauser, A. Paulus, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 566.
- [8] S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, J.E. Daler, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3476.
- [9] S.R. Wallenborg, C.G. Bailey, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1872.
- [10] L.H. Zhang, F.Q. Dang, Y. Baba, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 30, 1645.
- [11] D. Belder, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2422.
- [12] S.C. Stinson, *Chem. Eng. News* **1999**, 77(41), 101.
- [13] S.C. Stinson, *Chem. Eng. News* **2000**, 78(43), 55.
- [14] M.G. Finn, *Chirality* **2002**, 14, 534.
- [15] M.T. Reetz, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, 40, 284.
- [16] N.J. Dovichi, J. Zhang, *Angew. Chemie* **2000**, 112, 4635.
- [17] M.T. Reetz, K.M. Kühling, A. Deege, H. Hinrichs, D. Belder, *Angew. Chemie* **2000**, 112, 4049.
- [18] G. Quincke, *Pogg. Ann. Phys. Chem.* **1859**, 107, 1.
- [19] E. Dorn, *Wied. Ann.* **1880**, 10, 46.
- [20] K.D. Lukacs, J.W. Jorgenson, *J. High Res. Chromatogr.* **1985**, 8, 407.
- [21] P.D. Grossman, J.C. Colburn, "Capillary Electrophoresis", Academic Press, San Diego **1992**, 14.
- [22] S. Terabe, K. Otsuka, H. Nishi, *J. Chromatogr.* **1994**, 666, 295.
- [23] J.C. Giddings, *Sep. Sci.* **1969**, 4, 181.

-
- [24] H.K. Jones, N.T. Nguyen, R.D. Smith, *J. Chromatogr.* **1990**, 504, 1.
- [25] J.C. Giddings, "Dynamics of chromatography", Marcel Dekker, New York **1965**.
- [26] R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand.* **1974**, 123, 7.
- [27] J.C. Sternberg, *Adv. Chromatogr.* **1966**, 2, 205.
- [28] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T. Verheggen, *J. Chrom.* **1979**, 169, 11.
- [29] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* **1992**, 64, A489.
- [30] R.J. Nelson, A. Paulus, A.S. Cohen, A. Guttman, B.L. Karger, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 111.
- [31] W.J. Lambert, D.L. Middleton, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 1585.
- [32] J. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Science* **1983**, 222, 266.
- [33] G. Schomburg, D. Belder, M. Gilges, S.R. Mutsch, *J. Cap. Elec.* **1994**, 1, 219.
- [34] M.A. Moseley, L.J. Deterding, K.B. Tomer, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 109.
- [35] G.J.M. Bruin, J.P. Chang, R.H. Kuhlman, K. Zegers, J.C. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* **1989**, 471, 429.
- [36] M.R. Schure, A.M. Lenhoff, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 3024.
- [37] M. Satastna, S.P. Radtko, A. Chrambach, *Electrophoresis* **2001**, 22, 66.
- [38] B. Verzola, C. Gelfi, P.G. Rigetti, *J. Chromatogr. A* **2000**, 868, 86.
- [39] J.K. Towns, F.E. Regnier, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2473.
- [40] M. Gilges, H. Husmann, M.H. Kleemiß, S.R. Motch, G. Schomburg, *J. High. Res. Chrom.* **1992**, 15, 452,
- [41] D. Belder, G. Schomburg, *J. High. Res. Chrom.* **1992**, 15, 686.
- [42] M.H. Kleemiß, M. Gilges, G. Schomburg, *Electrophoresis* **1993**, 14, 515.
- [43] H. Lindner, W. Heiliger, B. Sarg, C. Meraner, *Electrophoresis* **1995**, 16, 604.
- [44] T. Tsuda, *J. High. Res. Chrom.* **1987**, 10, 622.
- [45] M. Chiari, L. Ceriotti, G. Crini, M. Morcellet, *J. Chromatogr. A* **1999**, 836, 81.
- [46] C. Stathakis, E.A. Arrianga, D.L. Lewis, N.J. Dovichi, *J. Chromatogr. A* **1998**, 817, 227.
- [47] G. Schomburg, D. Belder, *J. Cap. Elec.* **1994**, 001, 219.
- [48] H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 5272.
- [49] H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2254.
- [50] G. Bruin, R. Huisden, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 339.

-
- [51] A. Dougherty, C. Woolley, D. Williams, D. Swaile R. Cole, M. Sepaniak, J. Liq. Chromatogr. **1991**, 14, 907.
- [52] S. Swedberg, Anal. Biochem. **1990**, 185, 51.
- [53] M. Gilges, Dissertation Universität Saarbrücken **1994**.
- [54] J. Köhler, G. Heinemann, P. Kolla, H.W. Sturman, A. Deege, G. Schomburg, Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie **1987**, 327, 53.
- [55] G.Schomburg, Trac-Trends in Analytical Chemistry **1991**, 10, 163.
- [56] J. Warnke, Diplomarbeit MPI für Kohlenforschung Mülheim (Ruhr) **1998**.
- [57] Z. Zhao, A. Malik. M.L. Lee., J. Microcol. Sep. **1992**, 4, 411.
- [58] G. Schomburg, H. Husmann, Chromatographia **1975**, 8, 517.
- [59] S. Hjerten, J. Chromatogr. **1985**, 347, 191-198.
- [60] M. Gilges, M.H. Kleemiß, G. Schomburg, Anal. Chem. **1994**, 66, 2038.
- [61] D. Belder, H. Husmann, Studiengesellschaft Kohle **1999**, Patentapplikation, DE-A 199 38 002 A1.
- [62] D. Belder, A. Deege, H. Husmann, F. Kohler, M. Ludwig, Electrophoresis **2001**, 22, 3813.
- [63] B. Chankvetadze, "Capillary Electrophoresis in chiral Analysis", Wiley, Chichester **1997**.
- [64] Y.Y. Rawjee, D.U. Staerk, G. Vigh, J. Chromatogr. **1993**, 635, 291.
- [65] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Sens. Actuators B **1990**, 1, 244.
- [66] D.J. Harrison, A. Manz, Z.H. Fan, H. Ludi, H.M. Widmer, Anal. Chem. **1992**, 64, 1926.
- [67] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler; Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, Science **1993**, 261, 895.
- [68] V. Dolnik, S. Liu, S. Jovanovich, Electrophoresis **2000**, 21, 41.
- [69] G.J.M. Bruin, Electrophoresis **2000**, 21, 3931.
- [70] J.P. Kutter, Trends in Analytical Chemistry **2000**, 19, 352.
- [71] S. C. Terry, Jerman, J. H. Angell, IEEE Trans Electron Devices **1979**, ED-26, 1880.
- [72] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fettingner, A. Paulus, H. Lüdi, H.M. Widmer, J. Chromatogr. **1992**, 593, 253.
- [73] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, Science **1993**, 261, 895.

-
- [74] C.A. Emrich, H. Tian, I. L. Medintz, R. A. Mathies, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5076.
- [75] S.C. Jacobson, C. T. Culbertson, J. E. Daler, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3476.
- [76] J. P. Kutter, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 5165.
- [77] L. C. Waters, S. C. Jacobson, N. Kroutchinina, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 158.
- [78] C.T. Culbertson, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3781..
- [79] E. Zubritsky, *Anal. Chem.* **2000**, 1, 687..
- [80] A. G. Hadd, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 5206.
- [81] Z.H. Liang, N. Chiem, G. Ocvirk, T. Tang, K. Fluri, D.J. Harrison, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1040.
- [82] C.S. Effenhauser, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2637.
- [83] U. Backofen, F. M. Matysik, C.E. Lunte, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4054.
- [84] J. Khandurina, T.E. McKnight, S.C. Jacobson, L.C. Waters, R.S. Foote, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2995.
- [85] O. Salas-Solano, D. Schmalzing, L. Koutny, S. Buonocore, A. Adourian, P. Matsudaira, D. Ehrlich, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3129.
- [86] S.C. Jacobson, L.B. Koutny, R. Hergenroder, R.J. Warmack, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1107-1113
- [87] S. Ermakov, C. Stephen, J. Ramsey, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3512.
- [88] S.C. Jacobson, L.B. Koutny, R. Hergenröder, A. Moore, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3472.
- [89] Y. Liu, R.S. Foote, S.C. Jacobson, R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4608.
- [90] C. S. Effenhauser, G. J. Bruin, A. Paulus, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3451.
- [91] S.M. Ford, B.J. Kar, J. Davis, *Microcol. Sep.* **1998**, 10, 431.
- [92] T. Creedy, *Trends in Analytical Chemistry*, **2000**, 19, 6.
- [93] K.B. Mogensen, N.J. Petersen, J. Hubner, J.P. Kutter, *Electrophoresis* **2001**, 22, 3930.
- [94] H. Nakanishi, T. Nishimoto, A. Arai, H. Abe, M. Kanai, Y. Fujiyama, *Electrophoresis* **2001**, 22, 230.

-
- [95] G.J.M. Bruin, J.P. Chang, R.H. Kuhlman, K. Zegers, J.C. Kraak, *J.Chromatogr.* **1989**, 471, 429.
- [96] P.G. Righetti, C. Gelfi, B. Vergola, L. Castelletti, *Electrophoresis* **2001**, 22, 603.
- [97] S.C. Jacobson, R. Hergenröder, R. Moore, A.W. Ramsey, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 4127.
- [98] N. Burggraf, A. Manz, C.S. Effenhauser, E. Verpoorte, N.F. Derooij, H.M.Widmer, *J. High Res. Chromatogr.* **1993**, 16, 594.
- [99] R.A. Mathies, X.C. Huang, *Nature* **1992**, 359, 176.
- [100] G. Ocvirk, T. Tang, D.J. Harrison, *Analyst* **1998**, 123, 1429.
- [101] G. Jiang, S. Attiya, G. Ocvirk, W.E Lee, D.J. Harrison, *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 14, 861.
- [102] S.S. Sirichai, A. de Mello, *Analyst* **2000**, 125, 133.
- [103] P.F. Gavin, A.G. Ewing, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 3838.
- [104] A.T. Wooley, K.Q. Lao, A.N. Glazer, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 684.
- [105] D. Figeys, R. Aebersold, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3721.
- [106] R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, *Anal Chem.* **1997**, 69, 1174.
- [107] E. Ziegler, D. Henneberg, G. Schomburg, *Anal. Chem.* **1970**, 42, 51A.
- [108] D.Belder, M. Ludwig, *Electrophoresis* **2003**, 24, 2422.
- [109] Y. Zhang, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Talanta* **1998**, 45, 613.
- [110] S.S. Sirichi, A. de Mello, *Analyst* 2000, 125, 133.
- [111] G.O. Ocvirk, T.T. Tang, D.J. Harrison, *Analyst* 1998, 123, 1429.
- [112] M.E. Swartz, *J. Liq. Chromatogr.* **1991**, 14, 923.
- [113] B.M. Paegel, L.D. Hutt, P.C. Simpson, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3030.
- [114] S.R. Wallenborg, I.S. Lurie, D.W. Arnold, C.G. Bailey, *Electrophoresis* **2000**, 21, 3257.
- [115] S. Il Cho, K.N. Lee, Y.K. Kim, J.H. Jang, Chung, *Electrophoresis* **2002**, 23, 972.
- [116] C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5814.
- [117] C. Perrin, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D.L. Massart, *Electrophoresis* **2001**, 22, 3203.

-
- [118] G. Schomburg, D. Belder, M. Gilges, S.R. Motsch, J. Capil. Electrophor. **1994**, 1, 219.
- [119] M.A. Moseley, L.J. Deterding, K.B. Tomer, J.W. Jorgenseon, Anal. Chem. **1991**, 63, 109.
- [120] D. Belder, H. Husmann, J. Warnke, Electrophoresis **2001**, 22, 666.
- [121] M. Stastna, S.P. Radko, A. Chrambach, Electrophoresis **2001**, 22, 66.
- [122] B. Verzola, C. Gelfi, P.G. Rigetti, J. Chromatogr. A **2000**, 868, 85.
- [123] D. Belder, M. Ludwig, Electrophoresis **2003**, 24, 3595.
- [124] M.Y. Badal, M. Wong, N. Chiem, H. Salimi-Moosavi, D.J. Harrison, J. Chromatogr. **2002**, 277, 286.
- [125] Y. Liu, J.C. Fanguy, J.M. Bledsoe, C.S. Henry, Anal. Chem. **2000**, 72, 5939.
- [126] V. Linder, E. Verpoorte, W. Thormann, N.F. de Rooij, H. Sigrist, Anal. Chem. **2001**, 73, 4181.
- [127] L. Xiong, F.E. Regnier, J. Chromatogr. A **2001**, 924, 165.
- [128] M. Pumera, J. Wang, E. Grushka, R. Polsky, Anal.Chem. **2001**, 73, 5625.
- [129] C.A. Keely, T.A.A.M. Vandegoor, D. McManigill, Anal. Chem. **1994**, 66, 4236.
- [130] V. Schurig, Asymmetric Synthesis, J.D. Morison, Ed., Vol. 1; p 59, Academic, New York **1983**.
- [131] W. König, The Practice of Enantiomer Separation by Gas Chromatography, Hüthig, Heidelberg **1987**.
- [132] N.J. Petersen, R.P.H. Nikolajsen, K.B. Mogensen, J.P. Kutter, Electrophoresis **2004**, 25, 253.
- [133] A. Rizzi, Electrophoresis **2001**, 22, 3079.
- [134] G. Gubitz, M.G. Schmid, J. Chromatogr. A **1997**, 792, 179.
- [135] T. Schmitt, H. Engelhardt, Chromatographia **1993**, 37, 475.
- [136] R.J. Tait, D.O. Thompson, V.J. Stella, J.F. Stobaugh, Anal. Chem. **1994**, 66, 4013.
- [137] K.Verleysen, T. Van den Bosch, P. Sandra, Electrophoresis **1999**, 20, 2650.
- [138] D. Belder, M. Ludwig, Electrophoresis **2003**, 24, 2422.
- [139] K.B. Mogensen, N.J. Petersen, J. Hubner, J.P. Kutter, Electrophoresis **2001**, 22, 3930.
- [140] H. Salimi-Moosavi, Y.T. Jiang, L. Lester, G. McKinnon, D.J. Harrison, Electrophoresis **2000**, 21, 1291.

-
- [141] S.C. Jacobson, S.V. Ermakov, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3273-3276.
- [142] E. Ziegler, D. Henneberg, G. Schomburg, *Anal. Chem.* **1970**, 42, 51A.
- [143] Belder, D., Schomburg, G., *HRC-J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, 15, 686-693.