



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 046 657 B4** 2008.10.09

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 046 657.5**  
(22) Anmeldetag: **29.09.2005**  
(43) Offenlegungstag: **12.04.2007**  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **09.10.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **B03C 1/035** (2006.01)  
**B03C 1/02** (2006.01)  
**G01N 27/416** (2006.01)  
**C07K 1/24** (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

**Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE**

(72) Erfinder:

**Nikolaev, Evgenij, Moskau, RU; Franzen, Jochen,  
28359 Bremen, DE**

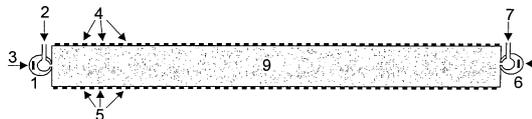
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

**DE 197 09 752 C1**  
**DE 697 12 348 T2**  
**DE 693 23 488 T2**  
**EP 03 76 611 A2**  
**WO 02/26 292 A1**

(54) Bezeichnung: **Stationäres Trennsystem für Gemischkomponenten**

(57) Hauptanspruch: Stationär arbeitendes Trennsystem zur Auftrennung der Komponenten eines Substanzgemisches, bestehend aus

- a) einem räumlich begrenzten Medium, in dem die Moleküle der Komponenten von einem elektrischen Feld zum Wandern gebracht werden können,
- b) einer Einrichtung zur Erzeugung eines elektrischen Ziehfeldes im Medium,
- c) einer Einrichtung zur Erzeugung eines zeitlich oder örtlich asymmetrisch wechselnden elektrischen Feldes quer zum elektrischen Ziehfeld,
- d) einer Einrichtung zur kontinuierlichen Eingabe des Substanzgemisches an einer Stelle des Mediums, und
- e) einer Einrichtung zur Entnahme einer Komponente des Gemisches von einer anderen Stelle des Mediums.



**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung bezieht sich auf die Trennung der Komponenten von Gemischen in kleinem Maßstab, insbesondere die Trennung von Proteinen oder Peptiden in Gemischen, beispielsweise für analytische Zwecke.

**[0002]** Die Erfindung besteht darin, die geladenen Moleküle der Gemischkomponenten durch ein elektrisches Gleichfeld in Längsrichtung durch ein geeignetes Medium, beispielsweise ein Gel, zu ziehen, die so migrierenden Moleküle aber gleichzeitig in Querrichtung einer Wechselfeldspannung mit stark asymmetrischem Profil auszusetzen. Durch das nichtlineare Verhalten der elektrisch erzeugten Migration werden viele Gemischkomponenten in Querrichtung aus dem Medium wandern, während nur wenige Komponenten die gegenüber liegende Stirnfläche des Mediums erreichen. Durch eine überlagerte Gleichspannung in Querrichtung kann eingestellt werden, welche der Gemischkomponenten das Medium vollständig in Längsrichtung durchwandern. Die getrennten Komponenten können aber nicht nur der gegenüberliegenden Stirnfläche, sondern auch Stellen der Oberseite oder Unterseite des Mediums entnommen werden.

**Stand der Technik**

**[0003]** Eine Trennung der Komponenten eines Substanzgemisches für analytische Zwecke kann durch Gaschromatographie (GC), Flüssigkeitschromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie (DC), Kapillarelektrophorese (CE) Polyacryl-Gelelektrophorese (PAGE), Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) und weitere, ähnliche Verfahren vorgenommen werden. Allen diesen Verfahren ist eigen, dass jeweils nur eine geringe Menge des Substanzgemisches eingebracht wird, und dass sich für die verschiedenen Komponenten des Gemisches verschiedene Wandergeschwindigkeiten einstellen, die zu einer zeitlichen Trennung der Komponenten führen. Die einzelnen Komponenten verlassen das jeweilige System jeweils in Form von kleinen Substanzschüben („Peaks“) oder sind bei Beendigung des Trennvorgangs in Form von kleinen Ansammlungen („Spots“ oder „Banden“) zugänglich. Es handelt sich also in keinem Fall um eine stationäre Trennung mit einer ständigen Eingabe von Gemisch an einer Stelle und einer ständigen Entnahme einer Gemischkomponente an einer anderen Stelle. Alle diese Verfahren sind daher grundsätzlich nicht durch Variation der Zeitdauer an die Probenmenge anpassbar und können Komponenten geringer Konzentration nicht anreichernd sammeln.

**[0004]** Es gibt nur sehr wenige stationär arbeitende Trennsysteme für Gemische, die meisten davon in der Großindustrie, wie beispielsweise die Kolon-

nen-Destillation. Für analytische Mikropräparationen sind fast keine stationär arbeitenden Trennsysteme bekannt.

**[0005]** Lediglich auf dem Gebiet der Ionenmobilität ist ein Trennsystem bekannt geworden, das stationär arbeitet. Es handelt sich um das „High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometer“ (FAIMS). Wird zwischen zwei konzentrischen Rohren eine hohe Wechselfeldspannung geschaltet, so ergibt sich ein asymmetrisches Wechselfeld. Eingebrachte Ionen wandern in diesem Feld durch die nichtlinearen Anteile ihrer Mobilität zu einer der beiden rohrförmigen Elektroden. Durch eine überlagerte Gleichspannung kann nun für genau eine Ionensorte ein Gleichgewicht so eingestellt werden, dass genau diese Ionensorte im Zwischenraum zwischen den beiden Rohren gespeichert wird. Die Ionen können dabei an einer Stelle als Gemisch in das System eingeführt und an einer anderen Stelle als separierte Ionensorte entnommen werden. Nachteilig ist hier, dass es sich dabei um ein Trennsystem handelt, das nur als Ionenfilter betrieben werden kann: eine Ionensorte kommt durch, alle anderen Ionensorten werden an den Elektroden vernichtet. Nachteilig ist hier ferner, dass es keinen aktiven Transport der ausgewählten Ionensorte von der Eingabestelle zur Entnahmestelle gibt.

**[0006]** Die Ionenmobilität bei der elektrischen Feldstärke  $E$  gehorcht dem einfachen Gesetz  $v = K \times E$ , wobei  $v$  die Geschwindigkeit der Ionenwanderung ist.  $K$  ist eine Konstante, die vom Reibungsquerschnitt der Ionen abhängt und somit spezifisch für eine Ionensorte ist.  $K$  wird die Mobilität der Ionensorte genannt. Die Mobilität  $K$  ist jedoch nicht von der Feldstärke  $E$  unabhängig; die Geschwindigkeit  $v$  ist damit nicht einfach der Feldstärke proportional.

**[0007]** Es gilt hier vielmehr die Beziehung  $K(E) = K_0 \times (1 + K_1 \times E^2 + K_2 \times E^4 + \dots)$ .  $K_0$  ist dabei die Mobilität für verschwindend kleine elektrische Felder. Diese Abhängigkeit der Mobilität von der Feldstärke  $E$  bewirkt, dass eine Ionensorte unter der Wirkung einer asymmetrischen Wechselfeldspannung in Feldrichtung wandert, obwohl das zeitliche Integral über den Spannungsverlauf der Wechselfeldspannung genau Null ist. Eine asymmetrische Wechselfeldspannung in diesem Sinne ist eine Spannung, die zu einer Seite hin, beispielsweise zur positiven Seite hin, ein hohes Spannungsmaximum aufweist, allerdings nur für eine kurze Zeit, während zur anderen Seite hin, hier zur negativen Seite, eine nur geringe Spannung herrscht, die aber wesentlich länger anhält. Wenn die Konstanten  $K_1$  und  $K_2$  nicht Null sind, bewirkt diese Asymmetrie eine Wanderung in eine der beiden Feldrichtungen.

**[0008]** Es ist nicht sicher geklärt, warum die Mobilität  $K$  von der elektrischen Feldstärke abhängt. Es gibt

die Hypothese, dass es sich um variable Zustände der auch im gasförmigen Zustand immer vorhandenen Solvathüllen um die einzelnen Ionen handelt, die sich bei hoher Wanderungsgeschwindigkeit durch Stöße mit Umgebungsgas oder Reibung mit der umgebenden Flüssigkeit mehr oder weniger abstreifen lassen. Es ändert sich dann der Querschnitt, und damit die Mobilität. Für die Ionenmobilitätsspektrometrie ist bekannt, dass sich stets einige Wassermoleküle an den Ionen befinden, und dass diese Wassermoleküle einem sehr raschen und ständigen Austausch unterliegen.

**[0009]** Es kann sich aber auch um eine andersartige Konformitätsänderung der Ionen handeln. Besitzt das Molekül beispielsweise neben seiner Ladung auch noch einen Dipol, so kann dieser im Feld auseinander gezogen werden. Damit wird das Molekül bei höherer Feldstärke länger und schlanker, sein Querschnitt ändert sich und damit seine Mobilität im umgebenden Medium. Es sind weitere Mechanismen für Konformitätsänderungen vorstellbar.

**[0010]** Die Einstellung der Konformitätsänderung muss nicht momentan erfolgen, sie kann eine Einstellzeit haben. Zur Ausnutzung dieser Konformitätsänderungen für die Trennung von Substanzen ist es aber immer notwendig, die Konformitätsänderung auch spürbar eintreten zu lassen, oder gar die Einstellung eines Gleichgewichtes abzuwarten. Aus dieser Notwendigkeit ergibt sich eine Obergrenze für die Frequenz des asymmetrischen Wechselfeldes.

#### Aufgabe der Erfindung

**[0011]** Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein stationäres Trennsystem für analytische Proben bereitzustellen. Das Trennsystem soll möglichst auch vielkanalig arbeiten können.

**[0012]** Das Trennsystem soll insbesondere auch für Protein- oder Peptidgemische eingesetzt werden können. Viele Gemische, darunter auch Peptide und Proteine, enthalten in wässriger Lösung überwiegend geladene Moleküle, wobei die über die Moleküle eines Peptids und die Zeit gemittelte Ladung vom pH-Wert der Lösung abhängt. Die Anzahl der Ladungen eines Moleküls in Lösung ist nicht ganzzahlig, wie sie es bei gasförmigen Ionen der Fall ist, sondern ergibt sich nur als zeitliches Mittel über einen ständig oszillierenden Vorgang der Ionisation und Deionisation.

#### Kurze Beschreibung der Erfindung

**[0013]** Die Erfindung besteht darin, geladene Moleküle der Gemischkomponenten durch ein elektrisches Gleichfeld in einer Richtung, der Ziehrichtung, durch ein geeignetes Medium, beispielsweise ein Gel, zu ziehen, die so in Ziehrichtung wandernden

Moleküle aber gleichzeitig quer zur Ziehrichtung einer Wechselfeldspannung mit stark asymmetrischem Profil auszusetzen. Durch das nichtlineare Verhalten der elektrisch erzeugten Migration werden viele Gemischkomponenten in Querrichtung aus dem Medium wandern, während nur wenige Komponenten parallel zum elektrischen Ziehgleichfeld ohne Ablenkung in Ziehrichtung wandern und gegenüber der Eingabestelle entnommen werden können. Durch eine überlagerte Gleichspannung in Querrichtung, die die Wanderung einer Komponente in Querrichtung kompensiert, kann eingestellt werden, welche der Gemischkomponenten das Medium vollständig in Ziehrichtung ohne Ablenkung durchwandern. Die getrennten Komponenten können aber nicht nur am Ende der Ziehrichtung, sondern auch anderen Stellen des Mediums entnommen werden.

**[0014]** Die Erfindung besteht also darin, die nichtlineare Mobilität geladener Substanzkomponenten unter der Wirkung von elektrischen Feldern in geeigneten Medien in besonderer Weise auszunutzen. Als Medium können beispielsweise stehende oder laminar bewegte Gase Verwendung finden, wie das in Ionenmobilitätsspektrometern der Fall ist. Das Gas ist dabei in irgendeiner Weise einzuhüllen. Die Ladung der Substanzmoleküle ist dann durch Ionisierung eigens zu erzeugen. Es können aber auch in Lösung dissoziierte Moleküle, also irgendeine Form von Molekülonen, durch eine Flüssigkeit bewegt werden, oder, besonders günstig, durch ein Gel. Hier braucht die ionische Form der Moleküle nicht eigens hergestellt zu werden; der Grad der Dissoziation und somit der zeitlich-räumliche Mittelwert der Ladung pro Molekül lässt sich in einfacher Weise durch den pH-Wert der Lösung einstellen. Das gilt insbesondere auch für Peptide, Proteine und die meisten anderen Biomoleküle. Selbst die Permeabilität vieler Substanzen durch gummiartige Festkörper kann ausgenutzt werden, wenn sich dabei ionische Formen der Moleküle herstellen lassen. Diese Migration der Substanzen in Lösung durch flüssige, gelartige oder gummiartige Medien ist der Mobilität von Ionen in Gasen sehr ähnlich; die Migration in der Flüssigkeit oder im Gel ist lediglich sehr viel langsamer.

**[0015]** Das Medium kann eine Vielzahl von Formen haben, beispielsweise die Form einer länglichen, nicht allzu dünnen Schicht oder eines flachen Quaders. Es braucht beispielsweise die Dicke der Schicht nicht gleichförmig zu sein, oder es braucht die Schicht nicht eben zu sein. Eine der Richtungen senkrecht zur Ziehrichtung werde hier als Querrichtung angesehen, wobei eine Querrichtung senkrecht durch die Schicht oder den flachen Quader hindurch besonders günstig für die Herstellung der elektrischen Felder ist. Wenn Gase oder Flüssigkeiten als Medium dienen, sollen sie durch feste Hüllen oder Gefäße zusammengehalten und auch ortsfest ruhig oder in ruhiger, laminarer Strömung gehalten wer-

den. Ist das Medium ein Gel, so kann es kleinräumig seine Form selber halten, für die Gesamtform braucht es entsprechende Unterstützung.

**[0016]** Es werden in der Erfindung die Moleküle der Gemischkomponenten an einer kleinen Stelle des Mediums, beispielsweise an einer Stirnseite einer flachen Schicht, stetig in das Medium eingegeben. Die Gemischkomponenten werden nun durch ein elektrisches Ziehfeld durch das Medium gezogen, wie es zum Beispiel bei PAGE der Fall ist. Das Ziehfeld kann zeitlich konstant, aber auch moduliert oder gepulst sein. Gleichzeitig aber wird in Querrichtung eine Wechselspannung mit stark asymmetrischem Profil an das Medium angelegt, vorzugsweise überlagert mit einem Quergleichfeld einstellbarer Feldstärke. Durch das nichtlineare Verhalten der elektrisch erzeugten Migration werden viele Gemischkomponenten in Querrichtung aus dem Medium wandern, während nur wenige Komponenten im Gleichgewicht zwischen asymmetrischen Wechselfeld und überlagertem Quergleichfeld geradeaus wandern und die gegenüber liegende Oberfläche des Mediums erreichen, beispielsweise die gegenüber liegende Stirnfläche. Durch die gegebenenfalls überlagerte Quergleichspannung kann eingestellt werden, welche der Gemischkomponenten das Medium in Ziehrichtung geradeaus durchwandert. Diese Gemischkomponente kann an der Ankunftsstelle kontinuierlich entnommen oder längere Zeit gesammelt werden. In dieser Ausführungsform wirkt die Einrichtung als Filter, nur die an der Ankunftsstelle ankommenden Substanzen werden entnommen und weiter verarbeitet. Für eine gute Ausnutzung der nichtlinearen Mobilität sollte die Maximalfeldstärke in Querrichtung wesentlich größer sein als die Ziehfeldstärke.

**[0017]** Statt der asymmetrischen Wechselspannung kann ein quer anliegendes, von Ort zu Ort in Richtung und Stärke längs der Ziehrichtung asymmetrisch wechselndes, aber zeitlich konstantes Gleichfeld durchwandert werden. Die Asymmetrie besteht hier darin, dass über eine kurze Wanderstrecke in Längsrichtung ein hohes Feld in einer Querrichtung, sodann über eine längere Wanderstrecke in Längsrichtung ein niedriges Feld in der entgegen gesetzten Querrichtung durchlaufen wird.

**[0018]** Es können durch viele Entnahmestellen an der Oberfläche des Mediums die quer aus dem Medium migrierenden Substanzen in vielen einzelnen Fraktionen aufgefangen und weiter verarbeitet werden. In dieser Ausführungsform handelt es sich um eine vielkanalige Trennung. Die Fraktionen können in vielen kleinen Flüssigkeitsvolumen oder auch direkt auf einem analytischen Probenträger aufgefangen werden.

**[0019]** Die elektrischen Zieh- und Querfelder können durch eine Vielzahl von parallelen, linear ausge-

dehten geraden oder auch gekrümmten Elektroden erzeugt werden, die in zwei Schichten angeordnet sind, zwischen denen das Medium eingeschlossen ist. Die Schichten von Elektroden können auf Oberflächen des Mediums oder in der Nähe der Oberflächen angebracht sein. Die Elektroden können auch jeweils mit Entnahmekanälchen kombiniert werden.

#### Kurze Beschreibung der Abbildungen

**[0020]** [Abb. 1](#) gibt das Prinzip einer einkanaligen, stationären Trenneinrichtung mit einem Gel (9) wieder. Durch die Eingabeeinrichtung (1) können mit der Elektrode (3) geladene Moleküle, die über die Zuführung (2) zugeführt werden, in das Gel (9) hineingedrückt werden. Spannungen an den einzelnen Elektroden der beiden Elektrodenschichten (4) und (5) können die gewünschten Zieh- und Querfelder im Gel (9) erzeugen. Die geradeaus wandernde Molekülsorte kann über die Entnahmeeinrichtung (6) mit Hilfe der Elektrode (8) aus dem Gel (9) herausgezogen und durch das Röhrchen (7) abgeführt werden.

**[0021]** [Abb. 2](#) zeigt das Prinzip der stationären Trenneinrichtung aus [Abb. 1](#) in schräger Aufsicht.

**[0022]** In [Abb. 3](#) wird eine vielkanalige Trenneinrichtung gezeigt, in der das Gel (9) auf Ober- und Unterseite jeweils von einem Kunststoffteil (10) und (11) abgedeckt wird, das benachbart zu jeder Elektrode der beiden Elektrodenschichten (4) und (5) jeweils einen feinen Entnahmekanal für getrennten Komponenten enthält. Auch an der entnahmeseitigen Stirnfläche befinden sich in einem weiteren Kunststoffteil (13) einige Entnahmekanäle, jeweils mit Elektroden (12) bewehrt, deren Spannungen die geladenen Moleküle aus dem Gel (9) in die Entnahmekanäle ziehen können.

**[0023]** [Abb. 4](#) zeigt einen Ausschnitt aus [Abb. 3](#). Es sind hier die feinen Kanälchen oder Riefen des Riefenmusters (14) in jeweiliger Nähe zu einer Elektrode aus der Elektrodenschicht (4) besser sichtbar.

**[0024]** In den [Abb. 5](#) und [Abb. 6](#) sind die Wanderwege für die geladenen Moleküle verschiedener Substanzen eingezeichnet. In [Abb. 5](#) ist der Fall eines elektrischen Ziehfeldes konstanter Stärke wiedergegeben, wobei sich gerade Wanderwege ergeben. In [Abb. 6](#) hingegen ist das elektrische Ziehfeld eingangsseitig zunächst sehr stark und wird zur gegenüberliegenden Stirnseite hin wesentlich schwächer. Dadurch ergeben sich gekrümmte Wanderwege und, je nach Gemischzusammensetzung, eine möglicherweise bessere Verteilung der Substanzen auf die Entnahmekanäle.

**[0025]** [Abb. 7](#) gibt ein Beispiel für die zeitliche (t) oder örtliche (l) asymmetrische Wechselspannung wieder, die quer zur Ziehrichtung die Trennung der

Substanzkomponenten bewirkt.

#### Bevorzugte Ausführungsformen

**[0026]** Eine erste günstige Ausführungsform ist in den [Abb. 3](#) und [Abb. 4](#) gezeigt. Sie sieht eine Trennung in einem schichtförmigen, nicht zu dünnen Gel (**9**) vor. Das quaderförmige Gel (**9**) befindet sich zwischen zwei Schalen (**10**) und (**11**) aus Kunststoff, die es fest umschließen und dem Gel Halt geben. Die Kunststoffschalen (**10**) und (**11**) haben auf der Oberseite und der Unterseite des Gels (**9**), jeweils nahe an den Elektroden der beiden Elektrodenschichten (**4**) und (**5**), viele kleine Querriefen (**14**), etwa je einen halben Millimeter tief und etwa einen Millimeter breit, die während des Betriebes mit Flüssigkeit, vorzugsweise leicht angesäuertem Wasser, gefüllt sind als Entnahmekanäle dienen können. Die Riefen (**14**) verlaufen parallel zu den Stirnseiten des Gels. Am Grunde der Riefen (**14**) liegen voneinander und zu den Flüssigkeitskanälen hin isoliert die Einzelelektroden der beiden Elektrodenschichten (**4**) und (**5**) für die Erzeugung sowohl der elektrischen Ziehfelder wie auch der Querfelder. Die inneren Oberflächen der Riefen (**14**) sind durch bekannte Maßnahmen stark hydrophil gemacht, damit sich hier keine Gemischkomponenten durch hydrophob-hydrophobe Wechselwirkungen fest ablagern können.

**[0027]** An der eingangsseitigen Stirnseite des Gels (**9**) befindet sich die Eingabevorrichtung (**1**) für die Lösung mit dem Peptidgemisch, das hier als Beispiel für eine Substanzauftrennung dienen soll. Die Eingabevorrichtung (**1**) presst sich mit einer runden oder länglichen Öffnung dicht an die Stirnseite des Gels (**9**), so dass die Lösung mit dem Peptidgemisch direkten Kontakt mit dem Gel hat. Die längliche Öffnung liegt parallel zur Schichtoberfläche des Gels. Eine Elektrode (**3**) nahe am inneren Kanal der Eingabevorrichtung sorgt dafür, dass die geladenen Peptidmoleküle durch die Wirkung des elektrischen Feldes aus der Flüssigkeit in das Gel wandern. Die Lösung mit dem Peptidgemisch kann durch zwei rohrförmige Kanäle (**2**) der Eingabevorrichtung zugeführt werden, auch ein Kreislauf ist möglich. Auch hier sind die inneren Oberfläche stark hydrophil gemacht worden, um hydrophobe Substanzen nicht durch Oberflächenadsorption zu verlieren.

**[0028]** Aus der Kapillarelektrophorese ist bekannt, dass die überwiegende Anzahl der Peptide in Lösung geladen sind, wobei die Stärke der Ladung vom pH-Wert der Lösung abhängt. Auch im Gel sind die Peptide geladen, wobei auch hier die Stärke der Ladung vom pH-Wert der Flüssigkeit im Gel abhängt. Die Peptide (oder Proteine) können also bereits im nativen Zustand mit Hilfe eines elektrischen Feldes durch das Gel gezogen werden. Es können die Peptide aber auch durch besondere Maßnahmen in bekannter Weise mit ladungstragenden chemischen

Gruppen derivatisiert werden, um ihre Ladung in Lösung zu erhöhen.

**[0029]** Die Elektroden der beiden Elektrodenschichten (**4**) und (**5**), die hier in die Kunststoffschalen (**10**) und (**11**) eingebettet sind, können zur Kontaktierung feste Anschlussdrähte besitzen (in [Abb. 3](#) nicht gezeigt), die aus den Kunststoffschalen (**10**) und (**11**) hervorstehen. Diese Anschlussdrähte können über aufsteckbare Flachbandkabelstecker in sehr einfacher Weise mit Flachbandkabeln verbunden werden, die zu entsprechenden elektronischen Platinen zur Spannungsversorgung führen. Es ist somit zweckmäßig, für die Abstände der einzelnen Elektroden in der Elektrodenschicht (**4**) voneinander genau die Abstände der Kontaktierungsstellen in standardisierten Flachbandkabelsteckern (1,27 bzw. 2,0 Millimeter) zu wählen. Das gleiche gilt für die einzelnen Elektroden der Elektrodenschicht (**5**), und auch für die Elektroden (**12**) im Kunststoffteil (**13**).

**[0030]** Die beiden Elektrodenschichten (**4**) und (**5**) mit jeweils voneinander isolierten Elektroden in den Kunststoffschalen (**10**) und (**11**) auf beiden Seiten des Mediums bauen im Gel (**9**) durch ihre Versorgung mit Spannungen ein elektrisches Längsziehfeld von einigen Kilovolt Spannungsdifferenz auf, in ähnlicher Weise, wie es die Elektrodenringe um die Driftstrecken in der Ionenmobilitätsspektrometrie tun. In diesem elektrischen Längsziehfeld wandern die geladenen Peptide (oder anderen Moleküle) langsam in Richtung auf die gegenüberliegende Stirnfläche zu.

**[0031]** Die Elektroden der beiden Elektrodenschichten (**4**) und (**5**) bauen aber auch durch entsprechende Spannungsüberlagerungen das asymmetrische Querwechselfeld quer durch die Schicht des Gels (**9**) auf. Ein Beispiel für einen zeitlichen (oder auch örtlichen) Verlauf einer solchen asymmetrischen Wechselspannung ist in [Abb. 7](#) wiedergegeben. Das asymmetrische Querwechselfeld lässt die geladenen Peptide quer zur Schicht auf eines der beiden Elektrodenschichten (**4**) oder (**5**) zu wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist spezifisch für das jeweilige Peptid. Da die maximale Querfeldstärke ein Vielfaches der Ziehfeldstärke betragen soll, sollte die Maximalspannung ebenfalls bei einigen Kilovolt liegen. Beträgt die Dicke des Gels etwa ein Zehntel der Länge, so ist bei gleichen Spannungen die Stärke des Querfeldes etwa zehn Mal so groß wie die des Ziehfeldes. Die Frequenz sollte nicht zu hoch liegen. Für ein Gel als Medium sollte die Frequenz bei einigen Hertz bis zu einigen Hundert Hertz liegen, da sich für jede veränderte Spannung in jedem Spannungszyklus wieder ein Gleichgewicht für die Wanderungsgeschwindigkeit einstellen sollte.

**[0032]** Weiterhin liegt an den Elektroden der beiden Elektrodenschichten (**4**) und (**5**) eine einstellbare Gleichspannungsdifferenz, die ein elektrisches Quer-

gleichfeld aufbaut. Dieses Quergleichfeld dient zur Kompensation der Wanderung einer gewünschten Komponente auf eines der Elektrodenschichten zu; diese Komponente wandert also nicht aus dem Gel (9) heraus, sondern läuft ungestört (aber in leichtem Zickzack) zu einer Stelle der gegenüberliegenden Stirnfläche hin, beispielsweise zum mittleren Entnahmekanal an den Elektroden (12).

**[0033]** Das Prinzip einer sehr einfach aufgebauten einkanaligen Ausführungsform, das in [Abb. 1](#) gezeigt ist, besitzt an der der Eingabevorrichtung (1) gegenüberliegenden Stirnfläche nur eine einzige Entnahmestelle (6). Über rohrförmige Anschlüsse (7) kann das Entnahmeholumen mit Flüssigkeit gefüllt werden. Eine Elektrode (8) zieht die geladenen Moleküle der hier ankommenden Gemischkomponente in diese Flüssigkeit, diese Komponente kann damit in stetiger Weise in der Flüssigkeit gelöst durch die Anschlüsse (7) abgeführt werden. Die Komponente kann aber auch für längere Zeit gesammelt werden, bevor sie abgeführt wird. Dieses Trennsystem ist einkanalig, nur eine einzige ausgewählte Substanz wird durchgelassen. Es kann sich beispielsweise um ein sehr niedrig konzentriertes Peptid in einem komplexen Gemisch handeln, das ohne eine solche Anreicherung nicht analytisch vermessen werden könnte. Die analytische Messung kann sich auf die Struktur dieses Peptids, auf die Identität, oder auch nur auf die präzise Masse beziehen. Diese einkanalige Ausführungsform hat den Nachteil, dass die nicht verwendeten Komponenten im Gel verbleiben und eigens ausgewaschen werden müssen, falls das Gel mehrfach verwendet werden soll.

**[0034]** Es kann die Stirnseite aber auch mit mehreren parallelen Entnahmestellen versehen sein, wie es in [Abb. 3](#) zu sehen ist. Damit können mehrere Komponenten mit nur leicht verschiedenen  $K_f$ -Werten aufgefangen werden, beispielsweise für die vergleichende Messung mehrerer posttranslativ Modifikationen des gleichen Peptids.

**[0035]** Es ist schließlich aber auch möglich, alle oder einen Teil der mit den Elektroden der beiden Elektrodenschichten (4) und (5) verbundenen Riefen für die Entnahme der dort jeweils ankommenden Komponenten zu verwenden. So entsteht ein Vielkanal-Trennsystem. Die Entnahme aus diesen vielen Kanälen kann beispielsweise mit einem mikrofluidischen Schaltsystem geregelt werden. Die Flüssigkeiten in diesen Kanälen kann auch über längere Zeit befüllt werden, wobei auch nur jeweils die Länge des Kanals über die Breite des Gels hinweg mit Flüssigkeit gefüllt zu sein braucht. Dazu sind je nach Riefenform und Gelbreite nur 10 bis 50 Mikroliter Flüssigkeit notwendig. Die Flüssigkeiten können schließlich beispielsweise aus den Kanälen über ein einfaches Verteilungssystem in den Kunststoffteilen (10), (11) und (13) in eine Mikrotiterplatte gedrückt werden, die 96

oder 384 Proben mit Flüssigkeiten aufnehmen kann.

**[0036]** Da alle Elektroden der beiden Elektrodenschichten (4) und (5) unabhängig voneinander ansteuerbar sind, können auf elektronischem Wege viele Besonderheiten geschaltet werden. So braucht beispielsweise das elektrische Ziehfeld nicht konstant sein; es kann das Ziehfeld beispielsweise am Substanzeingang stärker sein, um hier eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit in Ziehrichtung zu erzeugen, wie es in [Abb. 5](#) dargestellt ist. Die [Abb. 4](#) zeigt dagegen die geraden Wanderwege von Substanzen in einem konstanten Ziehfeld. Ein nicht konstantes Ziehfeld ist dann vorteilhaft, wenn es viele Komponenten gibt, die bereits nach kurzer Wanderung quer aus dem Gel herauswandern. Diese Komponenten können so über mehr Entnahmekanäle verteilt werden.

**[0037]** Es müssen aber auch die asymmetrischen Wechsellspannungen nicht überall gleich stark oder gleich asymmetrisch sein. Auch hiermit lassen sich Komponenten besser und gleichmäßiger über die Entnahmekanäle verteilen. Es sind dann aber auch die kompensierenden Quergleichfelder entsprechend anzupassen.

**[0038]** Insbesondere lassen sich durch die Elektroden der beiden Elektrodenschichten (4) und (5) auch statische, aber örtlich wechselnde asymmetrische Querfelder erzeugen. Ein Beispiel des Spannungsverlaufs für diese örtliche Variation der Felder ist in [Abb. 7](#) als wiedergegeben, wobei jetzt statt der Zeitachse  $t$  eine Ortsachse  $l$  zu lesen ist. Die Moleküle, die mit dem Ziehfeld durch diese wechselnden Querfelder gezogen werden, werden wie bei einem asymmetrischen Wechselfeld quer zur Ziehrichtung wandern, wobei wieder ein Gleichspannungsanteil des Querfeldes so eingestellt werden kann, dass eine gewünschte Komponente geradeaus wandert. Dieses Verfahren, dass keine Wechsellspannungen verwendet, ist durch den Wegfall aller dielektrischen Verluste besonders ökonomisch.

**[0039]** Lässt man in der beschriebenen Ausführungsform das Gel (9) zwischen den Kunststoffschalen (10) und (11) weg und dichtet den Raum zwischen den Kunststoffschalen ab, so hat man eine Einrichtung, in der gasförmige Mischungen von Ionen im gasförmigen Medium getrennt werden können. Es ist hier allerdings schwierig, die Entnahmekanäle zu entleeren, ohne das Gas als Medium zu Turbulenzen oder unkontrollierten Bewegungen anzuregen. Etwas einfacher ist es, eine Flüssigkeit zu verwenden, insbesondere, wenn man eine etwas zähe (hochviskose) Flüssigkeit hoher Oberflächenspannung verwendet, die nicht in die Entnahmekanäle eindringt. In den Entnahmekanälen kann sich eine zweite Flüssigkeit einer anderen Flüssigkeitsphase befinden, in die die geladenen Moleküle der getrennten Kompo-

nennten durch elektrische Felder hineingezogen werden.

**[0040]** Etwas einfacher ist es, die Gase und Flüssigkeiten durch permeable Membranen von den Entnahmekanälen zu trennen. Diese Membranen lassen sich elektrophoretisch oder auch durch einfache Diffusion durchdringen. Für diese Zwecke eignen sich beispielsweise dünne Membranen aus Silikongummi.

**[0041]** Ein Gel ist ein offenporiges dreidimensionales Molekülgitter, das recht stabil und mit Flüssigkeit, vorwiegend mit Wasser, gefüllt ist. Der pH-Wert des Wassers lässt sich durch Lösen von Säuren oder Basen (oder entsprechenden Salzen) einstellen. Moleküle in Lösung können diese offenporige Struktur durchwandern, wenn sie entsprechend angetrieben werden. Die Moleküle, vor allem geladene Moleküle, sind in der Regel mit einer Solvathülle aus Flüssigkeitsmolekülen umgeben. Das Abstreifen von Teilen der Solvathülle ist möglicherweise für die Abhängigkeit der Mobilität von der elektrischen Feldstärke verantwortlich.

**[0042]** Organische Moleküle können aber auch durch bestimmte Arten von Festkörpern permeieren (so genannte permeable Festkörper), vor allem durch gummiartige Festkörper. So ist bekannt, dass organische Moleküle von einigen Hundert atomaren Masseneinheiten sehr schnell durch Silikongummimembranen hindurch permeieren können. Eine Membran von einem Millimeter Dicke ist in Sekunden durchdrungen, wenn nicht gar bereits nach einigen Zehnteln einer Sekunde. Diese Permeation ohne elektrische Felder beruht nur auf Diffusion, es ist jedoch anzunehmen, dass geladene Moleküle auch durch elektrische Felder bewegt werden können. Durch Lösen von organischen Säuren oder Basen lässt sich der pH-Wert innerhalb des Gummis einstellen, so dass sich die Ladung bio-organischer Moleküle einstellen lässt. Es ist nicht bekannt, ob diese elektrisch unterstützte Permeation einen nicht-linearen Anteil hat, ob also die Proportionalität der Permeationsgeschwindigkeit zur elektrischen Feldstärke gestört ist. Wenn die Permeationsgeschwindigkeit nicht streng proportional zur Feldstärke ist, so lässt sich auch hiermit ein Trennsystem nach dieser Erfindung aufbauen.

**[0043]** Die Substanzen wandern im Medium längs einer Bahn, die je nach der Form der elektrischen Felder gerade oder gekrümmt sein kann. Die Bahn beginnt bei der Einrichtung zur Eingabe des Substanzgemisches. Bei einer punktförmigen Eingabe der Substanzen des Gemisches sind die Bahnen zunächst sehr fein, sie verbreitern sich aber mit zunehmender Entfernung von der Eingabestelle durch Diffusion. Die Verbreiterung findet in beiden räumlichen Richtungen quer zur Wanderungsrichtung statt. Diese Diffusion ist im Grunde unvermeidbar. Man kann

jedoch die Bahn in einer der beiden Querrichtungen fokussiert halten, wenn man dem elektrischen Querfeld einen Gradienten gibt. Ein solches fokussierendes Querfeld lässt sich durch zwei konzentrische Elektroden-schichten, die jeweils die Form von Zylinderausschnitten haben, erreichen. Es findet zwischen diesen gekrümmten Elektroden-schichten eine Fokussierung in radialer Richtung statt. Diesen Effekt kann man zur Erhöhung der räumlichen Auflösung der Komponenten benutzen.

**[0044]** Es lassen sich durch Kombination von mehreren Trenneinrichtungen nach dieser Erfindung auch sehr komplexe Trennsysteme aufbauen. So ist es beispielsweise möglich, mehrere einkanalige Trennsysteme parallel zu betreiben, wobei jede Trenneinrichtung auf eine andere Komponente ausgerichtet ist. Man kann dann die nicht zu den Entnahmestellen wandernden Substanzen auffangen und zu den Eingabeeinrichtungen zurückführen. Dieser Vorgang kann fortgesetzt werden, bis jede gewünschte Komponente aus dem Gemisch genügend gut extrahiert ist.

**[0045]** Man kann bei diesem System aber auch so vorgehen, dass die nicht zu der Entnahmestelle der ersten Trenneinrichtung wandernden Substanzen einer zweiten Trenneinrichtung für die Abtrennung einer zweiten Komponente zugeführt werden. In weiteren Stufen werden weitere Komponenten entfernt. Auf diese Weise können nacheinander eine Reihe von Komponenten abgetrennt werden.

**[0046]** Dem Fachmann ist es nach Kenntnis dieser Erfindung relativ einfach möglich, für seine speziellen Trennaufgaben geeignete Trennverfahren und Trennapparate zu entwickeln.

### Patentansprüche

1. Stationär arbeitendes Trennsystem zur Auftrennung der Komponenten eines Substanzgemisches, bestehend aus

- a) einem räumlich begrenzten Medium, in dem die Moleküle der Komponenten von einem elektrischen Feld zum Wandern gebracht werden können,
- b) einer Einrichtung zur Erzeugung eines elektrischen Ziehfeldes im Medium,
- c) einer Einrichtung zur Erzeugung eines zeitlich oder örtlich asymmetrisch wechselnden elektrischen Feldes quer zum elektrischen Ziehfeld,
- d) einer Einrichtung zur kontinuierlichen Eingabe des Substanzgemisches an einer Stelle des Mediums, und
- e) einer Einrichtung zur Entnahme einer Komponente des Gemisches von einer anderen Stelle des Mediums.

2. Trennsystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wechselnde elektrische Feld

quer zum elektrischen Ziehfeld mit einem elektrischen Quergleichfeld einstellbarer Größe überlagert ist.

3. Trennsystem nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Einrichtungen zur Entnahme mehrerer Komponenten des Gemisches von mehreren Stellen des Mediums vorhanden sind.

4. Trennsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Medium ein Gas oder eine Flüssigkeit, jeweils in einer Umhüllung, ein Gel, oder ein permeabler Festkörper verwendet wird.

5. Trennsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Erzeugung sowohl des elektrischen Ziehfeldes wie auch der Quersfelder zwei Elektrodenschichten mit voneinander isolierten Elektroden gibt, wobei sich das Medium zwischen den beiden Elektrodenschichten befindet.

6. Trennsystem nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium die Form eines länglichen Quaders hat, und dass zur Erzeugung sowohl des elektrischen Ziehfeldes in Längsrichtung des Quaders wie auch der Quersfelder über der Oberseite und unter der Unterseite des Quaders eine Vielzahl von linear ausgedehnten Elektroden vorhanden sind, die parallel zu den Stirnflächen des Quaders ausgerichtet sind.

7. Trennsystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die linear ausgedehnten Elektroden jeweils hinter Entnahmekanälen für die Komponenten angeordnet sind.

8. Trennsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Einrichtung zur Eingabe des Substanzgemisches mit einer Elektrode versehen ist, die durch Anlegen einer Spannung ein elektrisches Feld erzeugt, das die geladenen Substanzmoleküle in das Mediums drückt.

9. Trennsystem nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass alle oder einige Einrichtungen zur Entnahme von getrennten Komponenten des Substanzgemisches jeweils mit Elektroden versehen sind, die durch Anlegen von Spannungen die Komponenten aus dem Medium ziehen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

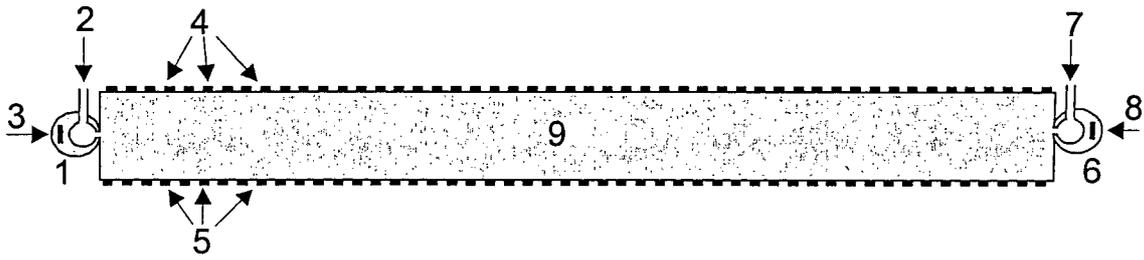


Abbildung 1

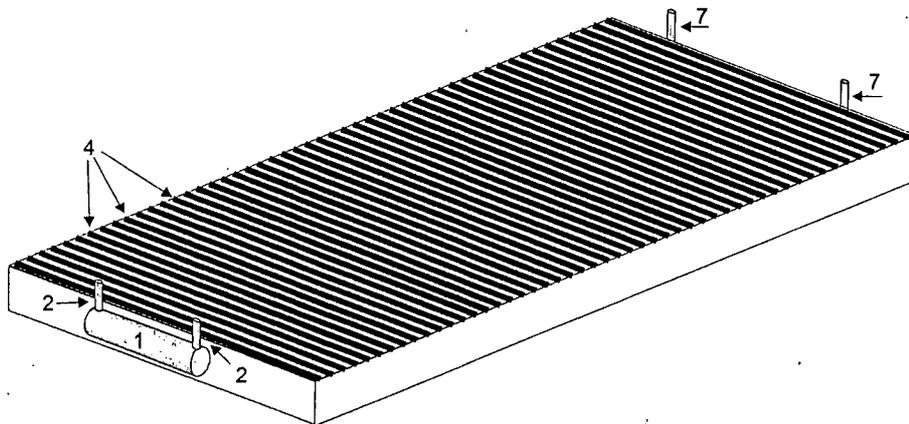


Abbildung 2

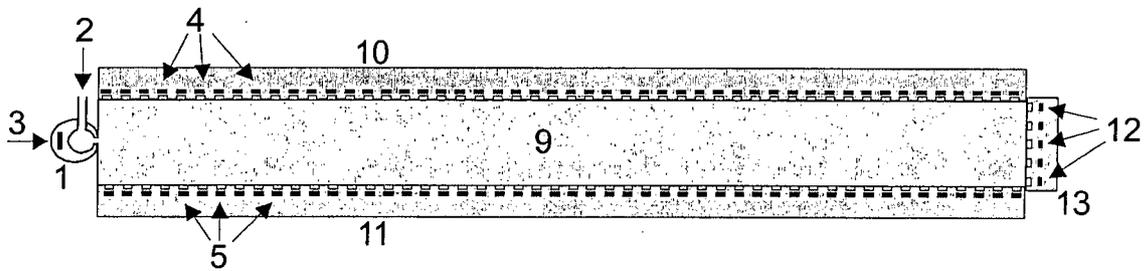


Abbildung 3

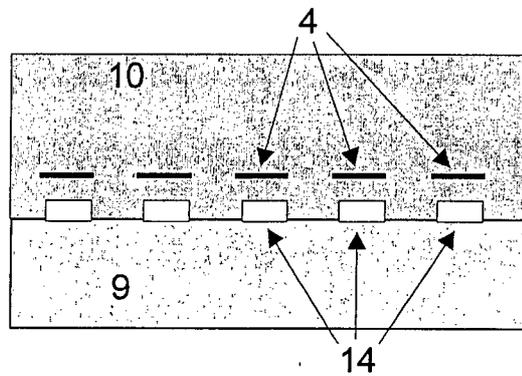


Abbildung 4

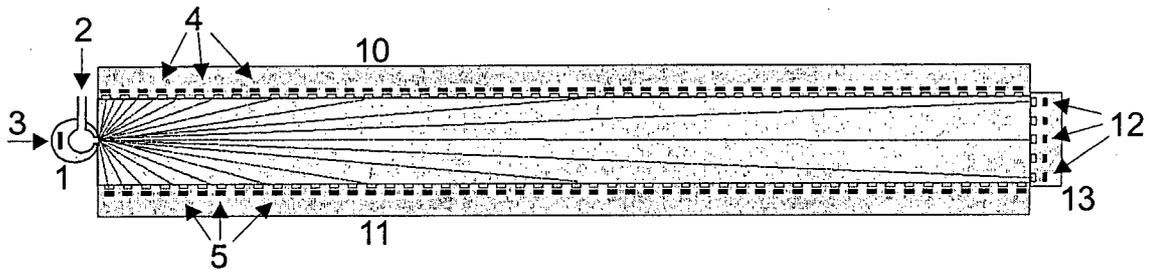


Abbildung 5

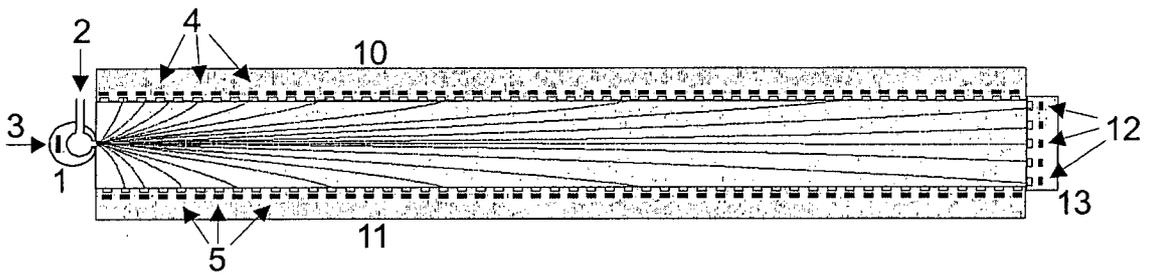


Abbildung 6

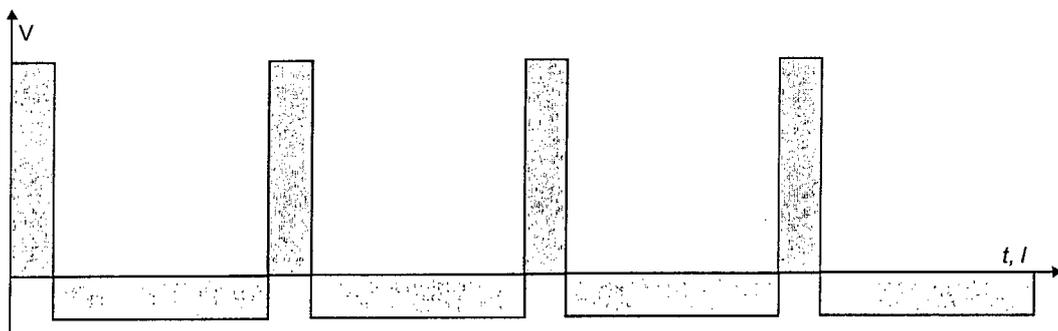


Abbildung 7