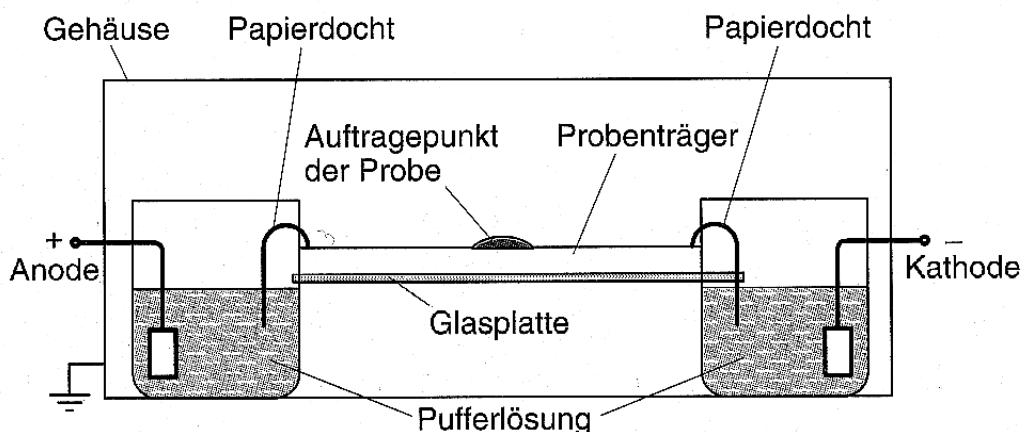


4. Elektrophoretischen Trennverfahren

Bei einer elektrophoretischen Trennung werden geladene Teilchen (meist Ionen) aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in einem elektrischen Feld getrennt. Die Trennung erfolgt dabei aufgrund der Ladung und Grösse der zu trennenden Ionen; es findet also im Prinzip *keine* Verteilung zwischen zwei Phasen statt womit sich diese Methoden grundlegend von den chromatographischen Trennungen unterscheiden.

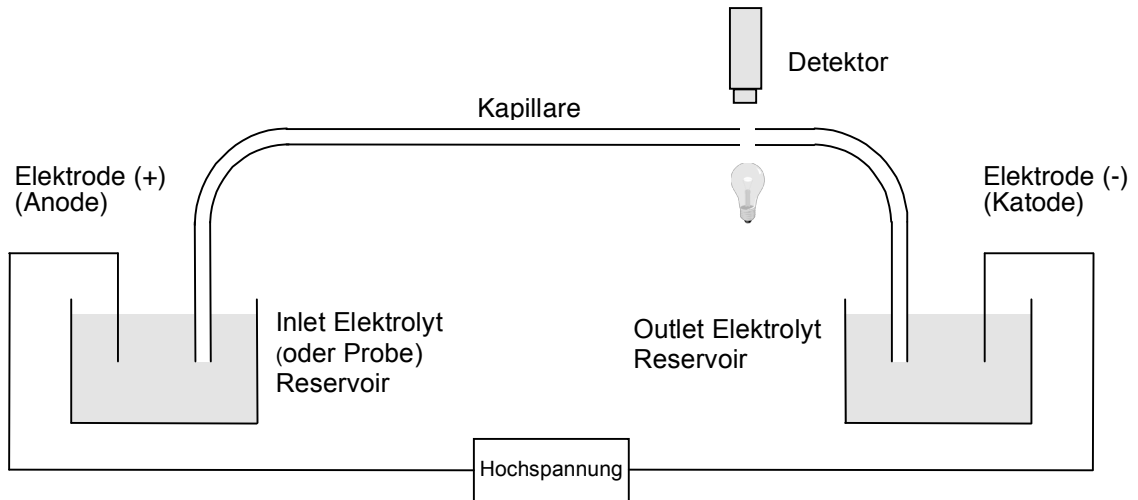
In ersten Anwendungen elektrophoretischer Trennverfahren wurden Glasplatten verwendet, die mit Gelen beschichtet sind. Der apparative Aufbau ist ähnlich wie bei Dünnschichtchromatographie:



Die Probe wird auf die mit Puffer getränkte Gelplatte aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung mit Hilfe von zwei Elektroden, die in die beiden Reservoirs getaucht sind, wandern die Analytione entsprechend ihrer Ladung und Grösse unterschiedlich schnell zu einer der beiden Elektroden und trennen sich dabei. Nach Ende der Entwicklungszeit wird die Lage der Analyten off-line detektiert.

Entscheidende Nachteile der Plattengelelektrophorese sind die relativ schwierige reproduzierbare Herstellung der Platten und die umständliche off-line Detektion. Dies führte in den 60er Jahren zur Entwicklung von elektrophoretischen Trennverfahren in Kapillaren: Kapillarelektrophorese (Capillary electrophoresis, CE).

4.1 Kapillarelektrophorese -Apparatur



- Kapillaren: Länge: 10-100cm, Innendurchmesser: 10-100 μ m, Material: fused silica
- Jedes Ende der Kapillare ist in ein Reservoir getaucht, die über Elektroden mit einer HV-Versorgung verbunden sind.
- Reservoirs und Kapillare sind mit Elektrolyt (Pufferlösung) gefüllt.
- Auftragen der Probe: das Inletreservoir wird mit einem Probenreservoir vertauscht. Durch einen kurzen Druck- oder Spannungspuls wird typischerweise 1-10nl Probe in die Kapillare injiziert.
- Nach Anlegen der Spannung wandern die Ionen Richtung Outlet-Elektrode
- Oft werden optische Methoden zur Detektion verwendet (UV, Fluoreszenz), wobei der Detektor meist katodenseitig platziert ist.

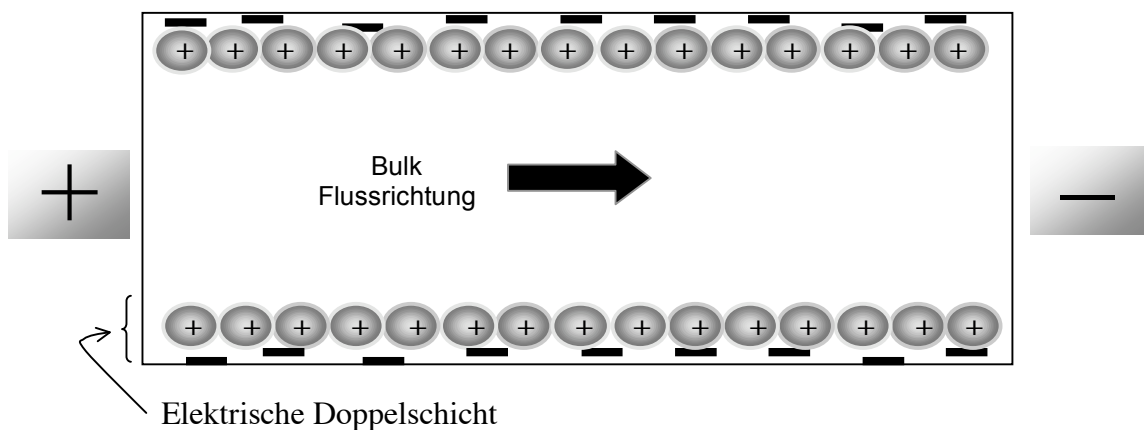
4.2 Elektrophoretische Beweglichkeit und Elektroosmotischer Fluss

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Ionen, das Trennprinzip der Elektrophorese, ist proportional zur elektrischen Kraft, welche die Ionen erfahren und indirekt proportional zum Reibungswiderstand durch das Puffermedium. Die elektrophoretische Beweglichkeit, μ_e , kann ausgedrückt werden durch

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r},$$

wobei q die Ladung des Ions ist, η die Viskosität des Puffermediums und r der Radius des Ions.

Zusätzlich zur elektrophoretischen Beweglichkeit der Analytionen tritt im elektrischen Feld auch ein elektroosmotischer Fluss (electroosmotic flow, EOF) in einer CE-Kapillare auf. Die Ursache dieses EOF liegt in der Beschaffenheit der Kapillarwände. Bei geeigneten Pufferbedingungen sind die Silanolgruppen ($pK \approx 5.3$) deprotoniert und demnach negativ geladen. Dies bewirkt, dass Kationen der Pufferlösung sich an die Kapillarwand anlagern und eine elektrische Doppelschicht bilden. Durch das an die Kapillare angelegte elektrische Feld, wandern die (hydratisierten) Kationen zur negativen Elektrode und bewirken dadurch eine Bewegung der gesamten Lösung in der Kapillare hin zur Katode.



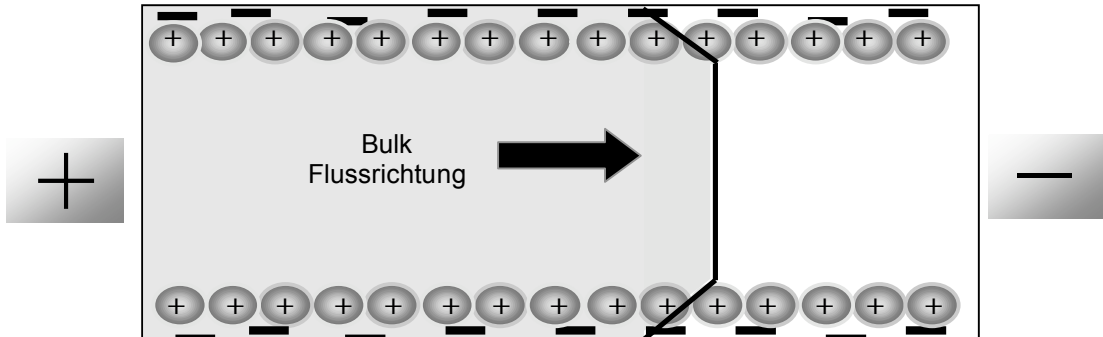
Der EOF, μ_{eof} , kann beschrieben werden als

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \zeta E}{4 \pi \eta},$$

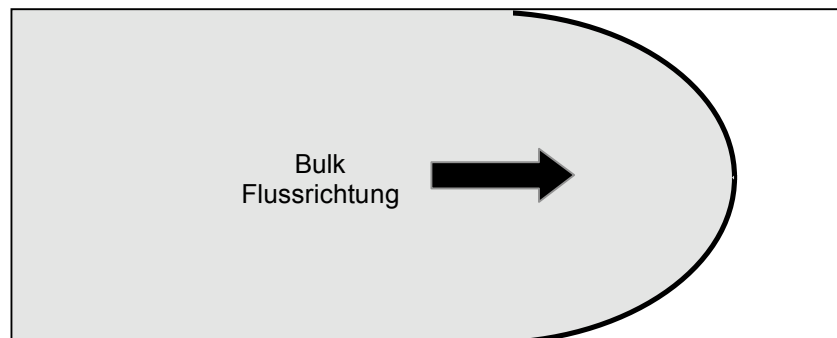
wobei ε die Dielektrizitätskonstante und η die Viskosität der Pufferlösung ist, E die elektrische Feldstärke und ζ das Zeta-Potential (in Volt), das die Abnahme der Ladungsdichte von der Kapillarwand zum Innern der Kapillare beschreibt.

Der EOF hat ein einzigartiges, beinahe flaches Flussprofil, wohingegen ein hydrostatisch verursachtes Flussprofil (wie in der HPLC üblich) parabolförmig ausgestaltet ist, das aufgrund von Reibungskräften an der Wand zustande kommt. Die Intensität des EOF hängt vor allem von Eigenschaften der Pufferlösung ab.

Flussprofil in der CE (elektrisches Potential):



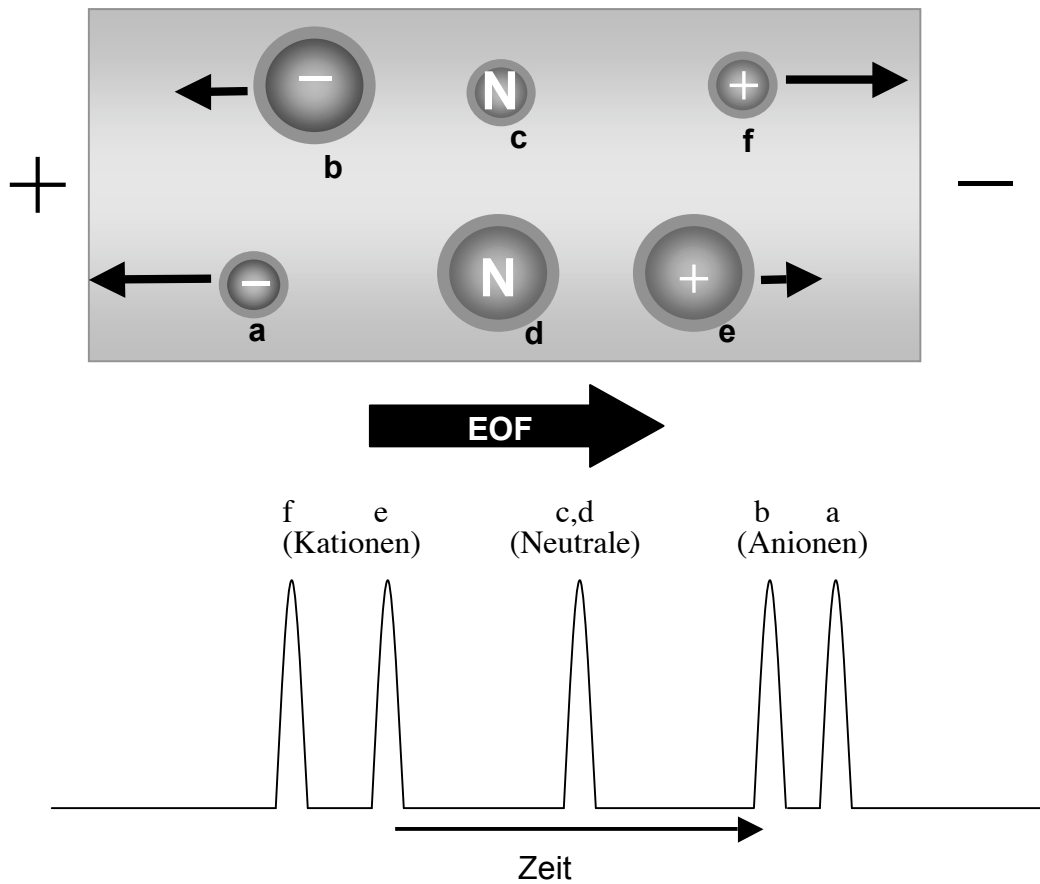
Flussprofil in der HPLC (hydrostatischer Druck):



Die gesamte beobachtete Bewegung, μ_{app} , eines Ions setzt sich zusammen aus der elektrophoretischen Beweglichkeit des Ions und dem elektroosmotischen Fluss (EOF) des Puffers.

$$\mu_{app} = \mu_e + \mu_{eof} = \frac{L_d}{t_M} E$$

Diese beobachtete Bewegung kann berechnet werden aus der Länge der Kapillare, L_d , der Migrationszeit vom Startpunkt zum Detektor, t_M , und der Stärke des elektrischen Feldes, E . Für die meisten Analyten gilt $\mu_e < \mu_{eof}$. Unter dieser Voraussetzung können sowohl Kationen als auch Anionen mit einem einzigen Detektor, platziert am Katoden-Ende der Kapillare, detektiert werden. Die Kationen wandern hierbei mit dem EOF und haben kurze Migrationszeiten, wogegen die Anionen gegen den EOF wandern und dementsprechend längere Migrationszeiten haben.



Sehr bewegliche Anionen (meist kleine anorganische Ionen wie Chlorid oder Bromid) deren μ_e -Wert grösser ist als der EOF, bewegen sich in die entgegengesetzte Richtung und können in der konventionellen Anordnung nicht detektiert werden.

Neutrale Analyten können in der klassischen Kapillarelektrophorese nicht getrennt werden.

Der grösste Faktor, der in der CE Bandenverbreiterung verursacht, ist die Longitudinal-Diffusion (siehe Diskussion der Van-Deemter-Gleichung). Die Anzahl theoretische Böden, N , wird hauptsächlich beeinflusst von der Länge der Kapillare, L_d , der Wanderungszeit, t_M , und des Diffusionskoeffizienten, D , des Analytions. Typischerweise werden Böden von 100'000 – 1'000'000 erreicht.

$$N_{\max} = \frac{L_d^2}{2Dt_M}$$

Die Auflösung von zwei Analyten, R , kann analog zu chromatographischen Methoden beschrieben werden, wobei $\Delta\mu$ die elektrophoretischen Mobilitätsunterschiede der Ionen und $\bar{\mu}_{app}$ die durchschnittliche beobachtete Bewegung der Ionen bezeichnet.

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}_{app}}$$

Möglichkeiten zur Veränderung des Elektroosmotischen Flusses

Parameter	Ergebnis	Kommentar
Elektrische Feldstärke	EOF ist proportional zur Feldstärke	Kleineres E → kleinere Auflösung, Effizienz
pH-Wert	EOF-Abnahme bei niedrigerem pH	Einfachste Methode zur Änderung des EOF
Puffer/Ionenstärke	Grössere Ionenstärke → Abnahme des Zetapotentials	
Temperatur	Viskositätsänderung um 2-3% pro °C	
Organische Lösungsmittel	Veränderung des Zetapotentials	
Tensid-Zusätze zum Puffer	Unterhalb der Mizellenbildungs-konzentration Adsorption an Kapillaroberfläche	Kationische Tenside: Abnahme oder Umkehrung des EOF Anionische Tenside: Zunahme des EOF
Hydrophobe Polymere	Adsorption an Kapillaroberfläche	Abnahme des EOF
Kovalente Beschichtung	Kovalente Beschichtung an Kapillaroberfläche	Vielzahl von Modifikationen des EOF möglich

4.3. Varianten der Elektrophorese

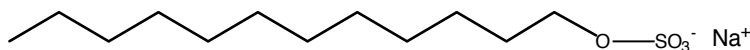
4.3.1 Kapillaronenelektrophorese

Es gibt verschieden Varianten der Kapillarelektrophorese, wobei Kapillaronenelektrophorese (CZE) die klassische und am weitesten verbreitete Methode ist. Mit CZE können kleine und mittelgrosse Ionen getrennt werden (z.B. Aminosäuren, Peptide). Es werden meist unmodifizierte Quarzkapillaren verwendet. Der Aufbau entspricht dem in Kapitel 4.1 beschriebenen System. Kationen und teilweise auch Anionen können getrennt werden.

4.3.2 Mizellar elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)

Einer der grössten Nachteile der klassischen Elektrophorese ist, dass neutrale Analyten nicht gemessen werden können. Mit der Entwicklung der MEKC in den 1980er Jahren wurde jedoch auch dies möglich. Bei der MEKC handelt es sich um eine Mischung aus elektrophoretischer und chromatographischer Trennung.

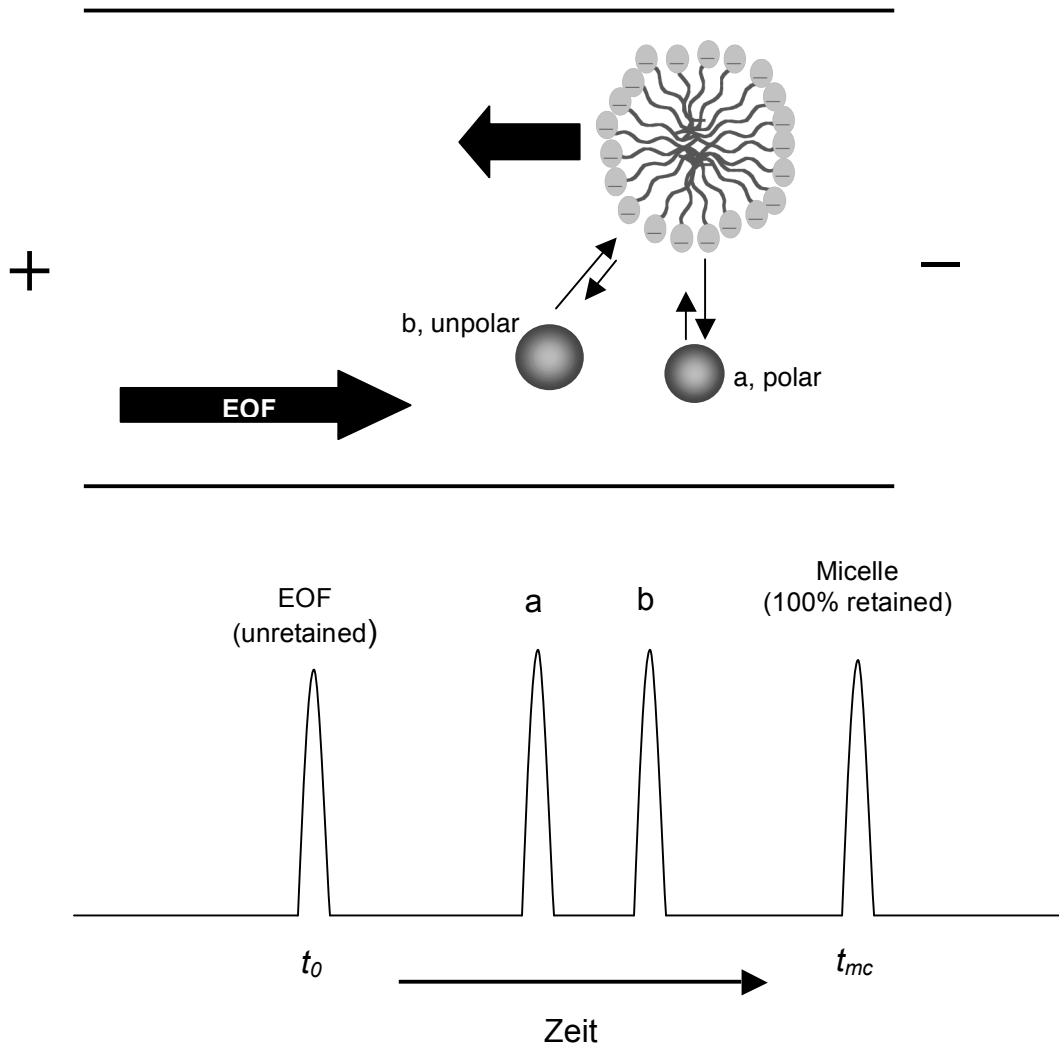
Die Trennung der neutralen Analyten erfolgt durch unterschiedliche Verteilung zwischen Pufferlösung und einer pseudo-stationären Phase. Diese stationäre Phase wird aus einer oberflächenaktiven Substanz gebildet (häufig wird Natriumdodecylsulfat verwendet), die der Pufferlösung zugegeben wird. Die Natriumdodecylsulfat-Moleküle aggregieren zu kugelförmigen Mizellen von 3-6nm Grösse, wobei der hydrophobe Anteil gegen das Innere der Mizelle zeigt und der hydrophile Rest gegen aussen. Natriumdodecylsulfat bildet bereits ab einer Konzentration von ca. 8mM Mizellen, die aus ca. 60 Molekülen bestehen.



Die Mizellen sind an der Oberfläche negativ geladen, wandern also in Richtung Anode, wenn eine Spannung an die Kapillare angelegt wird. Aufgrund des EOF werden aber auch die Mizellen langsam Richtung Kathode und zum Detektor geführt.

Eine sehr hydrophile neutrale Analyt-Substanz, die überhaupt nicht in Wechselwirkung mit den Mizellen tritt, wird mit dem EOF wandern und zur Zeit t_0 an Detektor ankommen. Im anderen Extremfall wird ein sehr hydrophober Analyt sich fast vollständig in den Mizellen aufhalten und dementsprechend zur gleichen Zeit, t_{mc} , detektiert werden wie die Mizellen selbst. Alle andern Analyten, die sich zwischen den Mizellen und der Pufferlösung verteilen, werden Migrationszeiten haben die zwischen t_0 und t_{mc} liegen. Dieses Zeitfenster (Retentionsfenster) definiert in der MEKC die Kapazität der Methode.

Der Grad der Verteilung der Analyten in die Mizellen kann wesentlich durch die Wahl der oberflächenaktiven Substanz beeinflusst werden, sowie durch deren Konzentration. Bei Natriumdodecylsulfat werden typischerweise Konzentrationen von 20-100mM eingesetzt. Ein grosser Vorteil der MEKC liegt in der einfachen Austauschbarkeit der pseudo-stationären Phase; wesentlich einfacher und billiger ist als bei HPLC-Säulen.



4.3.3 Kapillar-Gelelektrophorese (Capillary Gel Electrophoreses, CGE)

Die Trennung von grossen geladenen Molekülen, z.B. Proteine, ist mit CZE kaum möglich, da der Ladung/Masse Unterschied oft zu gering ist. Die meisten mit Gel gefüllten Kapillaren (oft Acrylamid-Gel) bewirken eine Trennung der Analyten aufgrund ihrer Grösse (ähnlich der SEC-Chromatographie). Zudem verringern die Gele die Diffusion der Analyten was sehr effiziente Trennungen erlaubt. Mit CGE werden hauptsächlich Proteine und DNA-Moleküle getrennt.

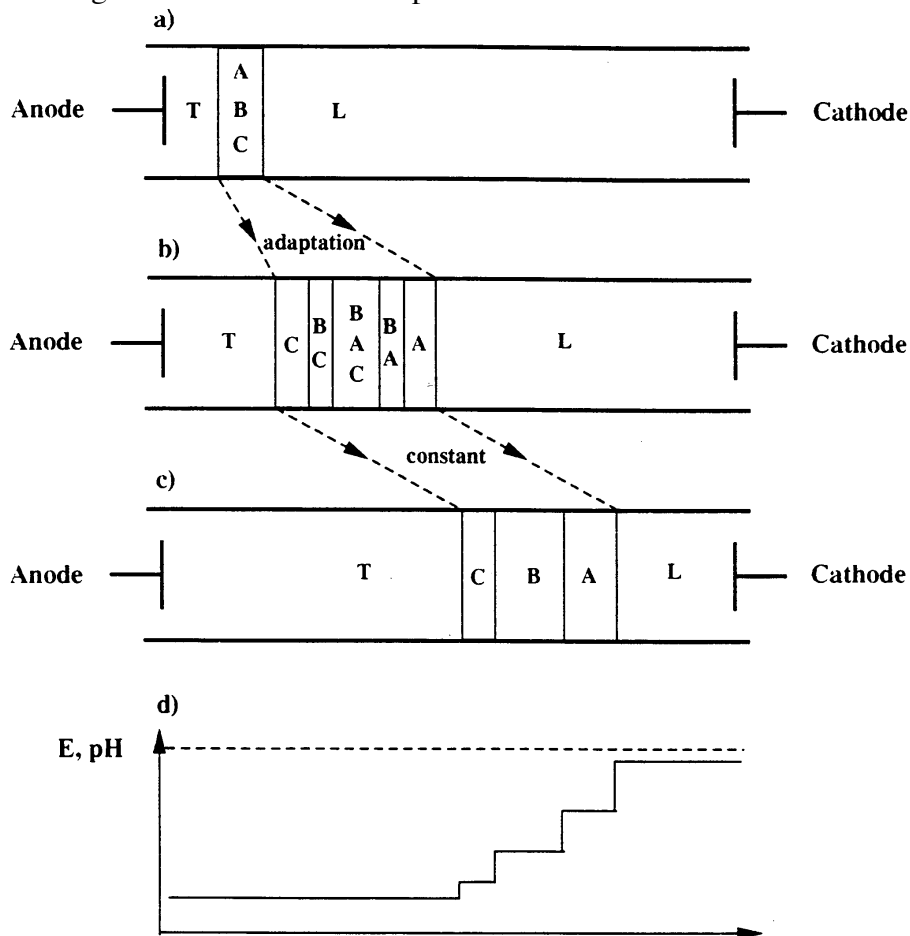
4.3.4 Isotachophorese

Bei der Isotachophorese wird das Probengemisch zwischen einem Leitelektrolyten (sog. Läufer L, z.B. Chlorid) und einem Endelektrolyten (sog. Verdränger T, z.B. Glycin) aufgetragen, wobei die Leitonen eine möglichst hohe und die Endionen eine möglichst niedrige elektrische Beweglichkeit aufweisen sollten. Unter diesen Voraussetzungen stellt sich ein stationärer Zustand ein, d. h. es bildet sich ein selbststabiles Trennmuster, wobei alle Elektrolytzonen (einzelne Komponenten, in der Reihenfolge abnehmender Beweglichkeit angeordnet) mit der gleichen Geschwindigkeit wandern.

Innerhalb einer Zone sind Elektrolytkonzentration und elektrische Feldstärke konstant. Die Konzentrationen der getrennten Komponenten sind im wesentlichen durch die Konzentration des Leitelektrolyten bestimmt und nehmen zwischen Leit- und Endelektrolyt ab.

Da sich in der Isotachophorese die Analyten in direkt hintereinander liegenden Zonen anordnen (und nicht in getrennten Peaks) ergeben sich Detektionsprobleme, so dass diese Methode nur selten angewendet wird.

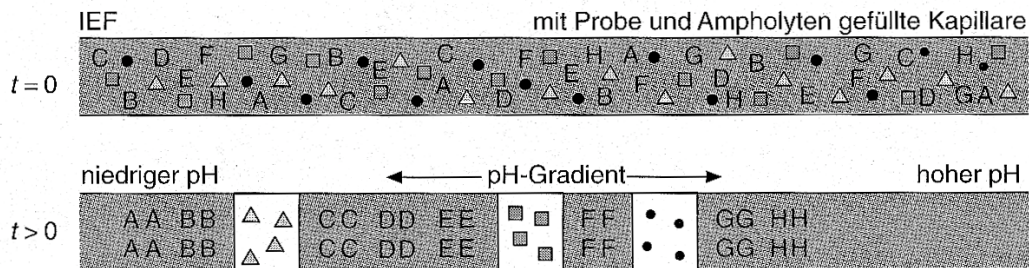
Trennungsablauf bei der Isotachophorese



4.3.5 Isoelektrische Fokussierung

Ein völlig anderes Trennprinzip liegt den elektrophoretischen Fokussierungsmethoden zugrunde. Bei der isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Elektrophorese in einem pH-Gradienten, der durch ein komplexes Puffergemisch (Trägerampholyte, meist Aminocarbonsäuremischungen mit unterschiedlichen Verhältnissen an Amino- und Säuregruppen) stabilisiert wird. Dabei nimmt der pH-Wert zwischen Anode und Kathode stetig und im Idealfall linear zu. Ampholyte der aufgetragenen Probe (i. a. Proteine) werden somit an jenen Stellen im pH-Gradienten angereichert, die dem isoelektrischen Punkt der betreffenden Komponenten entsprechen (maximale Häufigkeit von elektrisch neutralen Zwitterionen $H_3N^+ - X - COO^-$).

Die Methode wird hauptsächlich zur Trennung von Proteinen eingesetzt; die maximale Auflösung beträgt ca. 0.01 pH-Einheiten (Unterschied in den isoelektrischen Punkten). Die Detektion der getrennten Ampholyte erfolgt meist photometrisch (nach Anfärben) oder UV-spektrometrisch.



4.3.5 2-D PAGE (plattenelektrophoretische Methode)

Eine viel versprechende Methode zur Analyse von Polypeptidkomponenten in komplexen Proteingemischen oder DNA-Gemischen wurde in den 1970er Jahren eingeführt. Durch Erweiterung klassischer Elektrophoresetechniken auf zwei Dimensionen ergab sich eine enorme Verbesserung des Auflösungsvermögens. Das Probengemisch wird in der einen Richtung durch isoelektrische Fokussierung und anschliessend senkrecht dazu mittels SDS-PAGE getrennt (SDS: sodium dodecylsulfate, PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis). Da sich ohne weiteres Hunderte von Polypeptidkomponenten entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Molmasse trennen lassen, ist die 2-D-Elektrophorese für die Biochemie oder die klinische Chemie von ausserordentlicher Relevanz.

4.4. Detektoren

Für elektrophoretische Trennungen werden meist optische Detektionsmethoden verwendet, wie UV und Fluoreszenz. Es werden aber auch elektrochemische Detektoren und Massenspektrometrie eingesetzt.