



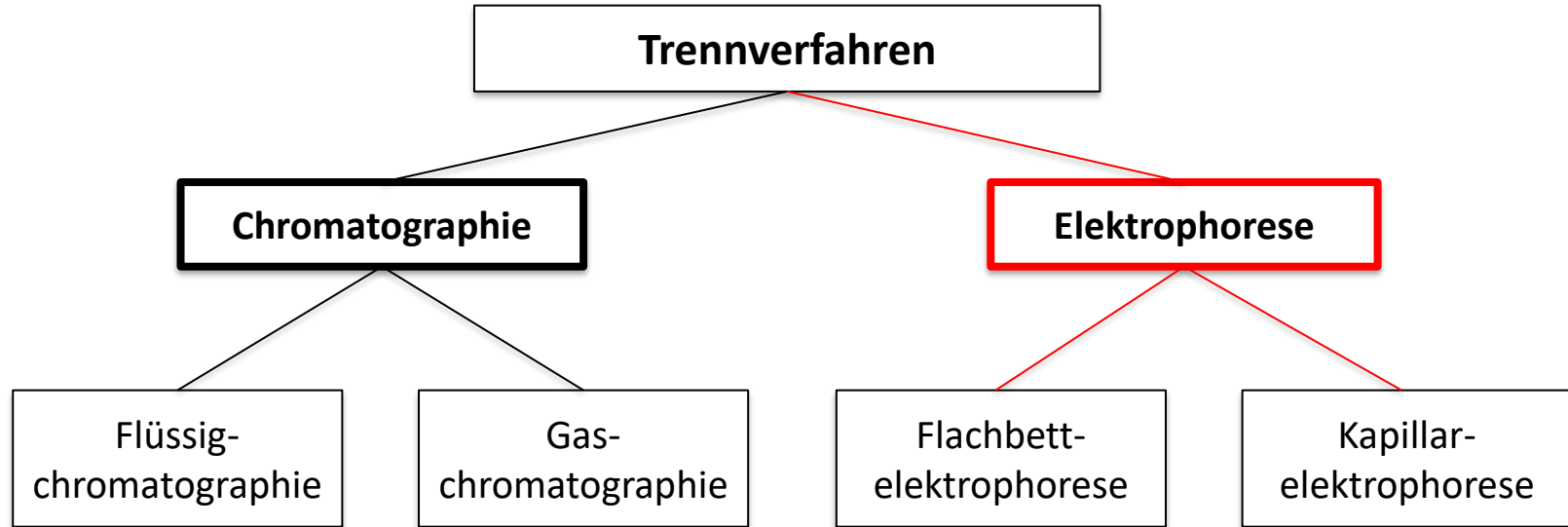
Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

Prof. Dr. Mircea Tric

SS 2026

Trennverfahren



Chromatographie beruht auf der **Wechselwirkung** von **Substanzen** zwischen einer **stationären / mobilen** Phase

Elektrophorese basiert auf der **Wanderung** von **geladenen** Analyten in einem **elektrischen Feld**

Elektrophoretische Trennverfahren

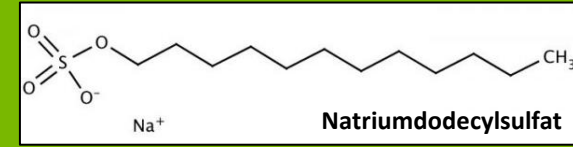
Elektrophoretische Trennverfahren

Trennung aufgrund unterschiedlicher **Mobilität** im **elektrischen Feld**

- SDS-PAGE
- Isoelektrische Fokussierung (IEF)
- Kapillarelektrophorese (CE)



SDS-PAGE

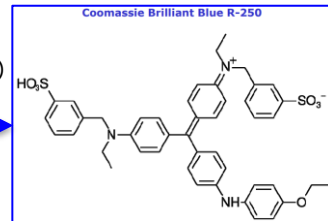


Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese)

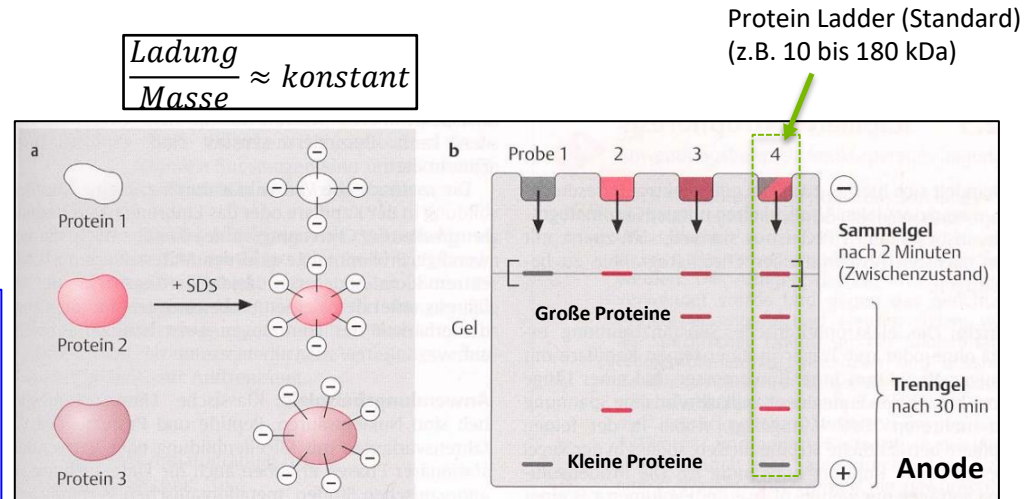
- SDS (anionisches Detergens) → **denaturiert** und überführt alle Proteine in eine **anionische Form**
- → alle Proteine haben das **gleiche Masse-zu-Ladungs-Verhältnis**
- **Wanderungsgeschwindigkeit** im Polyacrylamid-Gel (porös) **nur** von **Molekülmasse** abhängig (→ Eigenladung wird maskiert)

Anwendung: Protein & Nukleinsäuren (RNA/DNA)

- sehr einfach
- gute Auflösung
- gute Reproduzierbarkeit
- Dauer: 0,5 - 1,5 h
→ **Bandenverbreiterung** ☹️
- Coomassie-Färbung →
- NWG: 50 - 100 ng/Bande



$$\frac{\text{Ladung}}{\text{Masse}} \approx \text{konstant}$$



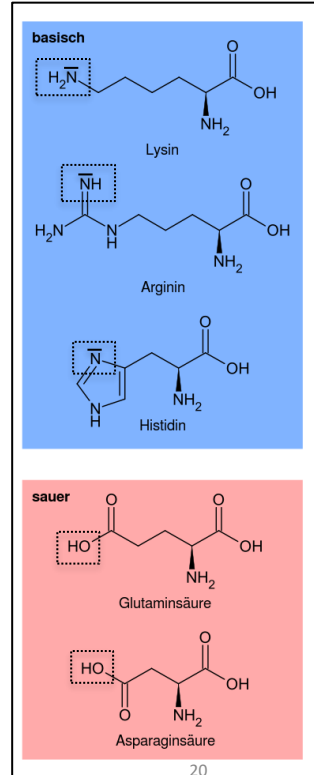
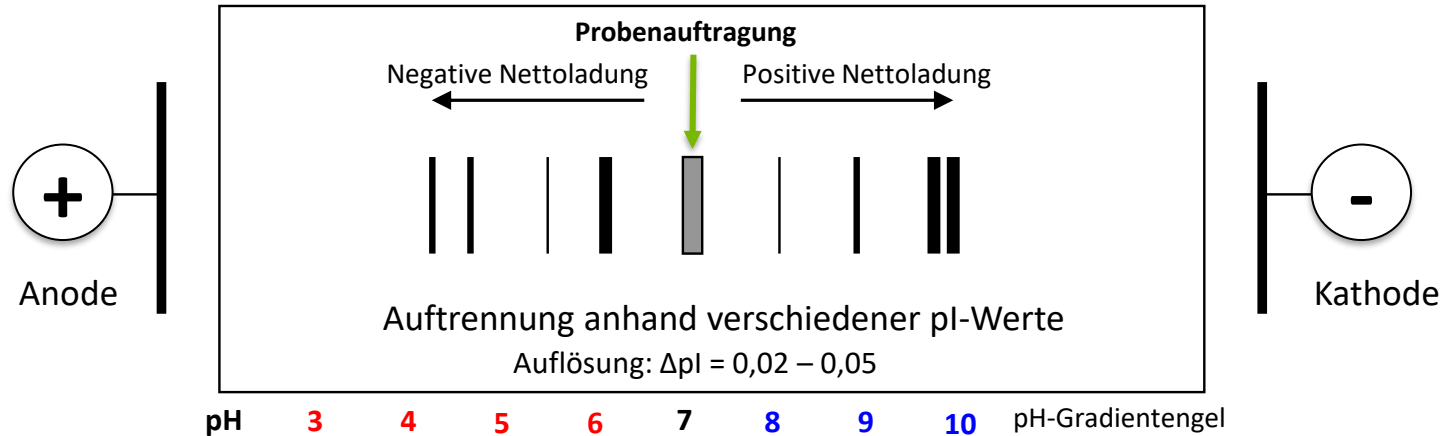
Feedback



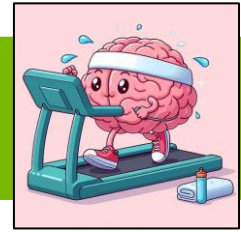
Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Isoelektrische Fokussierung (IEF):

- Die **Nettoladung** von Peptiden/Proteinen ist abhängig vom **pH-Wert**
- Proteine/Peptide wandern gemäß ihrer **Nettoladung** entweder zur Anode oder zur Kathode
- **Isoelektrischer Punkt (pI):** pH bei dem Proteine/Peptide nach außen **elektrisch neutral** sind
→ keine Wanderung mehr im elektrischen Feld → **Fokussierungseffekt**



Übung



Zeichnen Sie die Strukturformel von Glycin und Lysin für verschiedene pH-Werte

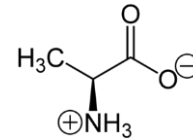


Isoelektrischer Punkt (IEP, pI)

Isoelektrische Punkte von Aminosäuren

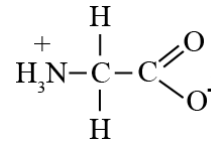
Für Aminosäuren ohne saure oder basische Seitenkette berechnet sich der isoelektrische Punkt gemäß:

$$pI = \frac{pK_{S1}(COOH) + pK_{S2}(NH_3^+)}{2}$$



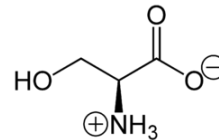
Alanin

pH = pI = 6,1



Glycin

pH = pI = 5,96



Serin

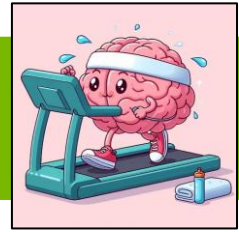
pH = pI = 5,68

Aminosäure

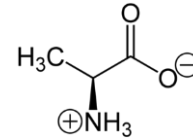
IEP

Alanin	6,1
Arginin	10,76
Asparagin	5,41
Asparaginsäure	2,85
Cystein	5,05
Glutamin	5,65
Glutaminsäure	3,22
Glycin	5,96
Histidin	7,47
Isoleucin	5,94
Leucin	5,98
Lysin	9,59
Methionin	5,74
Phenylalanin	5,84
Prolin	6,3
Serin	5,68
Threonin	5,60
Tryptophan	5,64
Tyrosin	5,66
Valin	5,96

Übung

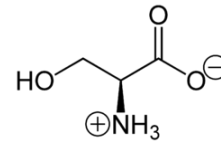


Warum ist der pI-Wert von Serin kleiner als der pI-Wert von Alanin?



Alanin

pH = pI = 6,1



Serin

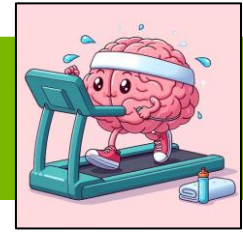
pH = pI = 5,68

Aminosäure

Alanin	6,1
Arginin	10,76
Asparagin	5,41
Asparaginsäure	2,85
Cystein	5,05
Glutamin	5,65
Glutaminsäure	3,22
Glycin	5,96
Histidin	7,47
Isoleucin	5,94
Leucin	5,98
Lysin	9,59
Methionin	5,74
Phenylalanin	5,84
Prolin	6,3
Serin	5,68
Threonin	5,60
Tryptophan	5,64
Tyrosin	5,66
Valin	5,96

Kapillarelektrophorese

Wovon hängt die elektrophoretische Mobilität μ im E-Feld ab?



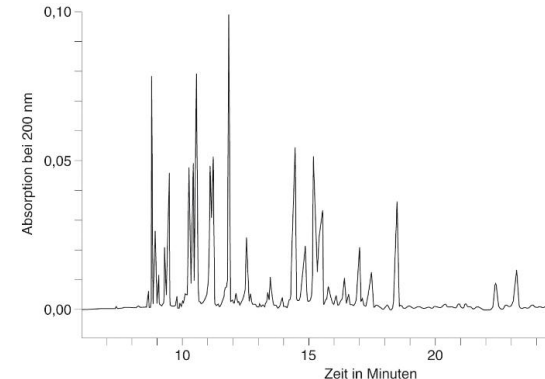
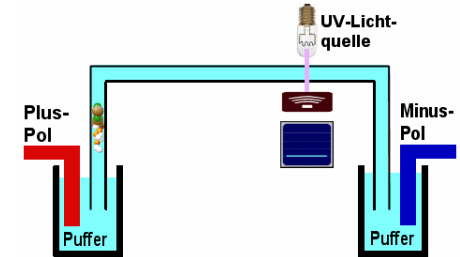
Kapillar-Zonen-Elektrophorese (CZE)

Elektrophoretische Trennung in einer **Kapillare** (Länge ≤ 1 m, $\varnothing \leq 100$ μm)

- **Spannung** (\rightarrow **elektrisches Feld**) zwischen zwei wässrigen Pufferlösungen (10-30 kV)
- Trennung beruht auf Unterschieden in der **elektrophoretischen Mobilität**
- **Positive, neutrale und negative** Analyten wandern zur **Kathode** (Minus-Pol)
 \rightarrow Ursache dafür ist der elektroosmotische Fluss (**EOF**)

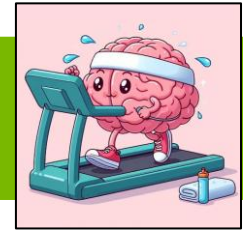
Detektion

- Meist im **UV** (**Lambert-Beersches Gesetz**)
- **Elektropherogramm** (Absorbanz über die Migrationszeit)



Mobilität im elektrischen Feld

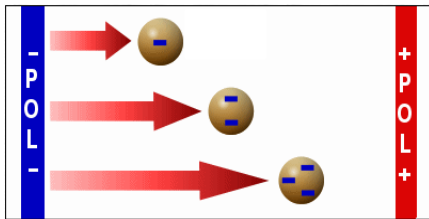
Warum ist die Mobilität von I⁻-Ionen höher als von Cl⁻-Ionen?



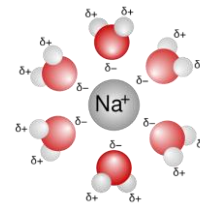
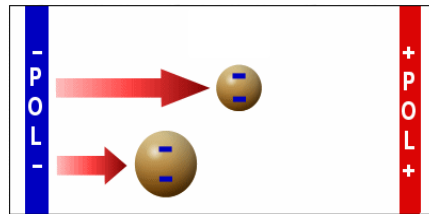
Mobilität von Ionen im elektrischen Feld:

Die Ionenbeweglichkeit (**Mobilität**) ist die **Endgeschwindigkeit**, die ein Teilchen in einem elektrischen Feld von 1 V/m erreicht.

Je größer die **Ladung**,
desto **schneller** die
Wanderung



Je **kleiner** das Teilchen, desto
schneller die Wanderung



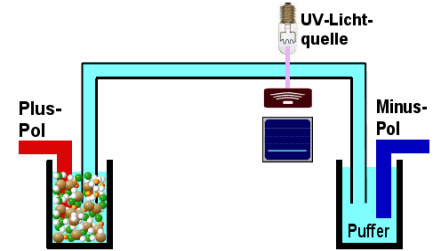
Elektrophoretische Mobilität
in Wasser bei 25 °C

Ion	Beweglichkeit [m ² /(s·V)]
H ⁺	36,3 · 10 ⁻⁸
OH ⁻	20,5 · 10 ⁻⁸
I ⁻	7,96 · 10 ⁻⁸
Cl ⁻	7,91 · 10 ⁻⁸
F ⁻	5,7 · 10 ⁻⁸
CH ₃ COO ⁻	4,2 · 10 ⁻⁸

Kapillarelektrophorese

Probeninjektion

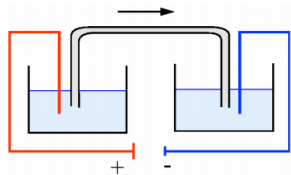
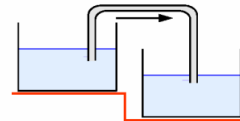
- Der Pufferbehälter wird kurzzeitig durch das Probengefäß ersetzt
- 10-20 nL Probe wird in eine Kapillare injiziert



Hydrodynamische Injektion



Hydrostatische Injektion



Elektrokinetische Injektion

Kurzzeitiges Anlegen einer Spannung → erzeugt E-Feld

→ Problem: Jeder Analyt hat eine andere Mobilität

→ **Diskriminierung** von Anionen mit hoher Ladungsdichte

Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Quarzkapillaren (fused silica)

Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Werts:

- SiOH_2^+ bei $\text{pH} < 2,5$
- SiOH bei $\text{pH} = 2,5$
- SiO^- bei $\text{pH} > 2,5$

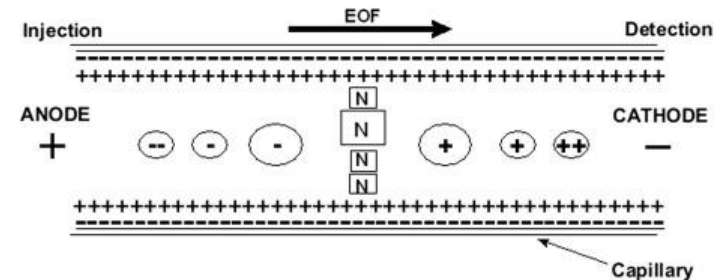
Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Elektrolytlösung hat ein pH-Wert im Bereich **pH 4 - 10**

→ **negativ geladene Kapillarwand**

→ **Kationen** lagern sich an (→ **Helmholtz-Schicht**)

→ Helmholtz-Schicht wandert zur **Kathode (Minuspol)** und nimmt darüberliegende Schichten mit



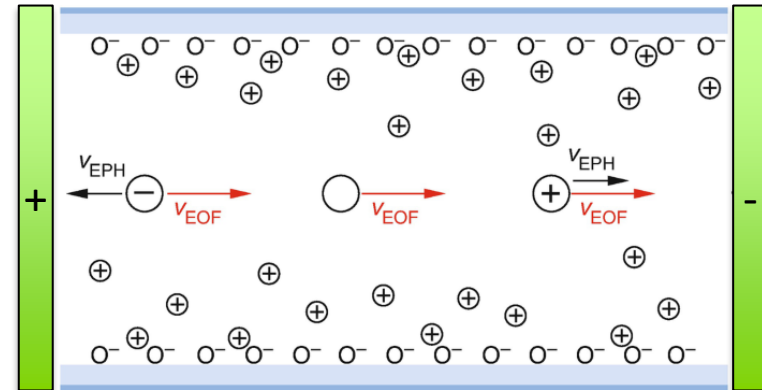
Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Gesamt-Mobilität:

- **Neutrale Teilchen** wandern mit der gleichen Geschwindigkeit mit dem EOF mit (**keine Trennung**)
- **Kationen** wandern **schneller** als EOF \rightarrow der zur Kathode gerichtete EOF verstärkt die Geschwindigkeit
- **Anionen** wandern **langsamer** als EOF \rightarrow da negative Ladung für eine Kraft gegen den EOF sorgt

EOF nimmt zu, wenn:

- der **pH-Wert steigt** (\rightarrow mehr Silanolgruppen deprotoniert)
- die **Ionenstärke sinkt** (\rightarrow geringere Abschirmung der Ladungen)



Schmitt-Kopplin, P., Scriba, G.K.E. (2022). Kapillarelektrophorese. In: Kurreck, J., Engels, J.W., Lottspeich, F. (eds) Bioanalytik. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.

Gesamtmobilität = EOF + EPH

EOF Elektroosmotische Mobilität u_{eo}

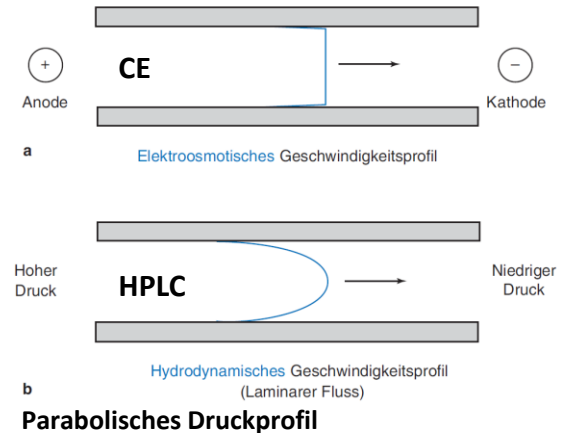
EPH Elektrophoretische Mobilität u_{ep}

Kapillarelektrophorese vs Chromatographie

Höhere Effizienz der CE im Vergleich zur GC und HPLC

- Gleichmäßiges **Flussprofil** → geringere Bandenverbreiterung
- **Schnelle** Trennung (~15 min) → geringere Längsdiffusion (B-Term)
- Es findet **kein Massentransfer** statt zwischen der mobile und festen Phase statt (C-Term = 0)
- Keine unterschiedlichen Weglängen (A-Term = 0)
- Aber, **hoher Stromfluss** ($U = 10\text{-}30\text{ kV}$) → Joulesche **Wärme** → Temperaturprofil führt zu unterschiedlichen Viskositäten → **Bandenverbreiterung**
- Dünne Kapillare lässt sich jedoch sehr gut **kühlen!**

Plug-Flow



Lehrbuch der Quantitativen Analyse, D. Harris

Kapillarelektrophorese vs Chromatographie

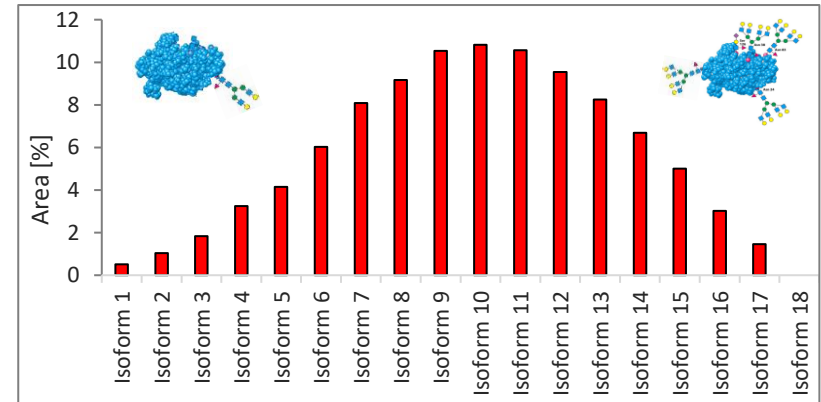
Vergleich CE, GC und HPLC

- CE: höhere Anzahl theoretischer Böden ($N = 1.000.000$)
- **CE** insbesondere für **geladene Bioanalyten** geeignet
- **GC** für ungeladene, **thermisch stabile** und **volatile Analyten** (sonst **HPLC** → geringste Trennleistung)



Anwendung der Kapillarelektrophorese (CE)

- Trennung von Proteinen
- Trennung von Glykan-Isoformen
- Trennung von DNA-Fragmenten (z.B. für die DNA-Sequenzierung)



Wichtiger Hinweis

Dieses Skript ist als unterstützende Lernhilfe nur zum persönlichen Gebrauch von Studierenden des Studienganges Biotechnologie (Bachelor) an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf freigegeben.

Jede unbefugte Vervielfältigung und **Verbreitung**, sei es in Papierform oder in elektronischer Form, ist urheberrechtlich **verboten**.

