

## Kapitel 5: Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. In der Analytischen Chemie ist Elektrophorese ein Oberbegriff für verschiedene Trenntechniken, welche **ionische Substanzen in einem elektrischen Feld gemäss ihrer Ladung und Grösse trennen**. In der klassischen Variante – der **Gel-Elektrophorese** – erfolgt die Trennung ähnlich wie in der DC bzw. TLC auf einem planaren Medium. Die modernere Form (erst seit etwa 1988 kommerziell erhältlich) ist die **Kapillarelektrophorese** (*capillary electrophoresis* = CE), bei der die Trennung in einer dünnen Kapillare erfolgt, deren beide Enden mit einer Anode bzw. Kathode kontaktiert sind.

Elektrophoretische Trennverfahren zählen im Allgemeinen **nicht zur Chromatographie**. In Kapitel 2.2 haben wir gelernt, dass folgende Punkte vorhanden bzw. erfüllt sein müssen, damit eine Technik eine Chromatographie ist:

- Trenntechnik
- Zwei nicht mischbare Phasen
- Eine mobile und eine stationäre Phase
- Trennung beruht auf der Verteilung von Substanzen zwischen den Phasen
- Kontinuierliche Abfolge von Gleichgewichtseinstellungen

Bei der Elektrophorese handelt es sich zwar um eine Trenntechnik, bei der wir es oft auch mit einer bewegten (mobilen) Phase, wie z.B. einer Pufferlösung, und einer unbewegten (stationären) Phase z.B. in Form der Kapillarwand in der CE zu tun haben. Die Trennung beruht aber nicht auf der Verteilung zwischen zwei Phasen und damit auch nicht auf Verteilungsgleichgewichten, die sich zwischen zwei Phasen einstellen. Die Analyten verbleiben vielmehr in einer Phase (z.B. gelöst in einer Pufferlösung), wandern in einem angelegten elektrischen Feld entsprechend ihrer Ladung zur Anode („+“- Pol) oder Kathode („-“-Pol) und werden so getrennt. Eine Variante der CE, die Mizellare Elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) bildet eine Ausnahme. Sie ist eine chromatographische Technik, da hier die Trennung auf der Analytverteilung zwischen zwei Phasen (Pufferlösung und Mizellen) beruht.

Da die Elektrophorese im Allgemeinen keine Chromatographie ist, beruht die Trennung nicht auf der unterschiedlichen Retention (also dem unterschiedlichen „Zurückhalten“ der Analyten durch das Zusammenspiel von mobiler und stationärer Phase) der Analyten, sondern auf der unterschiedlichen Wanderung (Migration) der Analyten im elektrischen Feld. Deshalb benutzt man in der CE den Begriff **Migrationszeit** statt Retentionszeit, und anstelle von Chromatogramm sagt man **Elektropherogramm**.

Elektrophorese eignet sich zur **Trennung geladener Moleküle**. Die Moleküle müssen also Ionen sein oder zumindest beim pH-Wert der eingesetzten Pufferlösung durch Protonierung oder Deprotonierung in einer ionischen Form (positiv oder negativ geladen) vorliegen. Die Gel-Elektrophorese wird zur Trennung grosser Moleküle eingesetzt und ist in der Proteinanalytik sowie bei der Trennung von DNA-Fragmenten von grosser Bedeutung. Die CE hat ihr Hauptanwendungsgebiet bei kleinen Molekülen und kann sowohl anorganische Ionen als auch geladene organische Moleküle (z.B. Aminosäuren und Peptide) trennen. Zu den **Vorteilen** zählen oft kürzere Analysenzeiten als bei der HPLC sowie eine höhere Resistenz gegenüber

Matrixbestandteilen, welche die stationäre Phase der HPLC schädigen könnten. Bei der Elektrophorese ist die stationäre Phase ja nicht an der Trennung beteiligt und chemisch relativ inert. Zu den **Nachteilen** zählt die Beschränkung auf geladene Analyten sowie die eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Wanderstrecken in der Gel-Elektrophorese sowie der Migrationszeiten in der CE. Bei komplexen Proben empfiehlt sich das Aufstocken der Probe mit bekannten Standardsubstanzen (Zugabe einer Reinsubstanz, die als Analyt in der Probe vermutet wird). So können Peaks, die im Vergleich zur nicht aufgestockten Probe in ihrer Intensität zunehmen einer bestimmten Substanz zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Vorlesung werden wir uns auf die wichtigsten elektrophoretischen Trennverfahren beschränken und zwei Varianten der Gel-Elektrophorese sowie zwei Varianten der CE kennenlernen.

## 5.1 Gel-Elektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese erfolgt die Trennung in einem meist frisch hergestellten Gel. Die Vorläufersubstanzen für das Gel (Monomere oder gelöste Oligo- und Polymere) lösen sich meist beim Erhitzen in Wasser. Die Lösung wird in ein Gefäß gegossen, wo sie abkühlt und sich durch Quervernetzen von Polymersträngen ein festes Gel bildet. Wasser bzw. eine Pufferlösung kann sich im Gel bewegen, wobei die flüssigkeitsgefüllten Gelporen einen definierten Widerstand für die Analyten darstellen. Dadurch werden Substanzen sowohl nach ihrer Ladung (bestimmt die Wanderung in Richtung Kathode oder Anode) als auch nach ihrer Grösse getrennt.

Bei der Herstellung des Gels (beim „Giessen“ des Gels) können mit einem sogenannten Gelkamm schlitzförmige Taschen an einem Ende in das Gel eingebaut werden, in welche die Proben pipettiert werden. Wie bei der DC bzw. TLC kann man mehrere Proben parallel laufen lassen. Eine Spur ist hier meist für ein Standardgemisch, also eine Probe mit einem Gemisch von Molekülen mit bekanntem Molekulargewicht, reserviert. Nach dem Giessen werden die Proben in die Taschen pipettiert und zwischen beiden Enden des Gels eine definierte elektrische Spannung angelegt. Die Analyten wandern entsprechend ihrer Ladung in Richtung einer Elektrode und trennen sich aufgrund unterschiedlicher Ladung und Grösse. Abbildung 5.1 zeigt eine einfache Apparatur für die Gel-Elektrophorese.

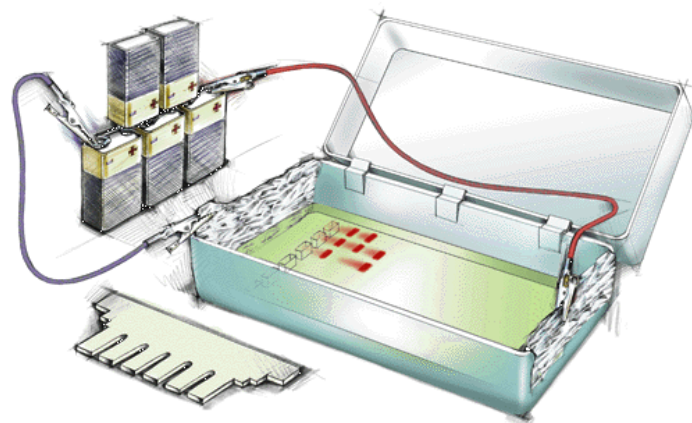


Abb. 5.1: Einfache Gel-Elektrophorese-Apparatur.

### 5.1.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Ein häufig eingesetztes Gel besteht aus Polyacrylamid, folgende Erklärungen treffen aber auch auf andere Gelbildner, wie z.B. Agarose, zu. **Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) trennt Makromoleküle aufgrund von Unterschieden in Ladung, Molekulargewicht und Faltung.** Die Ladung der Moleküle bewirkt die Wanderung im elektrischen Feld, und das Gel beeinträchtigt grosse Moleküle stärker bei ihrem Transport als kleine. Wichtig bei der Molekülgrösse ist die Querschnittsfläche des Moleküls senkrecht zur Strömungsrichtung (Stirnfläche oder Spantfläche genannt), welche den Strömungswiderstand bestimmt. Anders ausgedrückt leistet ein Molekül mit einem bestimmten Molekulargewicht im gefalteten Zustand (kleines Volumen, kleine Stirnfläche) einen geringeren Strömungswiderstand als im denaturierten, entfalteten Zustand. Es ist also nicht das Molekulargewicht alleine, welches die Trennung beeinflusst, es ist vielmehr das Volumen bzw. die Spantfläche und der damit verbundene hydrodynamische Durchmesser. Zusätzlich dazu beeinflusst die Ladung des Analyten seine Wanderstrecke im Gel. Aus diesem Grund besteht bei der PAGE kein einfacher Zusammenhang zwischen Wanderstrecke und Molekulargewicht. Man behilft sich meist mit dem Vergleich mit Reinsubstanzen, die man als Standard bei der Trennung mitlaufen lässt.

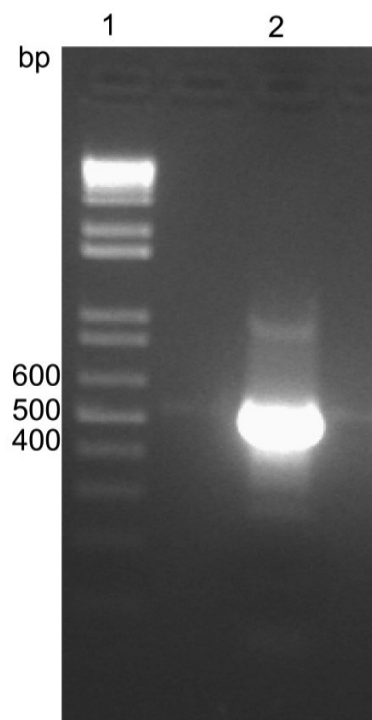


Abb. 5.2:  
PAGE-Trennung von DNA-Fragmenten, die mittels PCR  
vervielfältigt wurden.

(1) Gemisch bekannter DNA-Fragmente mit Banden im  
Abstand von 100 Basenpaaren (bp) als Standard.

(2) Probe mit einem PCR-amplifizierten Fragment mit  
522 bp.

Eine bekannte Anwendung der PAGE ist die **Trennung von DNA-Fragmenten** (siehe Abbildung 5.2). Damit verbunden ist die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR), welche gesuchte Fragmente einer DNA gezielt in ihrer Menge vervielfältigen kann. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden auf einem Gel getrennt und anschliessend mit Ethidiumbromid angefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich unabhängig von der Sequenz in alle DNA-Stränge ein und macht sie durch UV-Anregung bei  $\lambda = 254$  nm detektierbar. Solche **chemische Anfärbemethoden** sind die weitaus am häufigsten angewandten Detektionsmethoden in der Gel-Elektrophorese. Als Standards lässt man bekannte DNA-Fragmente mitlaufen und kann durch Vergleich der Wanderstrecken herausfinden, ob in der Probe ein be-

stimmter Gen-Abschnitt vorhanden ist. Dies hat Anwendungen vom sogenannten genetischen Fingerabdruck bis zum Nachweis gentechnisch manipulierter Lebensmittel.

### 5.1.2 SDS-PAGE

Wie oben erwähnt, ist der Nachteil der einfachen, sogenannten nativen PAGE, dass zwischen Molekulargewicht und Wanderstrecke kein einfacher Zusammenhang besteht. Die Moleküle werden sowohl nach Ladung als auch nach hydrodynamischem Durchmesser getrennt, wodurch ein Molekül mit einem bestimmten Molekulargewicht je nach Ladungs- und Faltungszustand unterschiedliche elektrophoretische Wanderstrecken aufweisen kann. Abhilfe schafft die SDS-PAGE, bei der Makromoleküle (meist **Proteine**) **nur aufgrund ihres Molekulargewichts getrennt** werden.

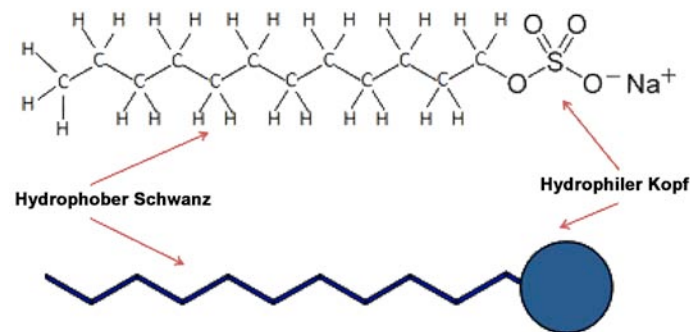


Abb. 5.3: Struktur und prinzipieller Aufbau des Tensids Natriumdodecylsulfat (SDS) mit einem hydrophilen (polaren) Kopf und einem hydrophoben (apolaren) Schwanz.

SDS steht hier für das Tensid **Natriumdodecylsulfat**  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  (*sodium dodecyl sulfate* = SDS, auch Natriumlaurylsulfat genannt). Wie die meisten Tenside besteht das Molekül aus einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Schwanz, wie Abbildung 5.3 zeigt. Ab einer bestimmten kritischen Konzentration bilden Tenside in wässriger Lösung **Mizellen** (siehe Abbildung 5.4). Das sind kugelförmige Aggregate von Tensiden mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern. Die Tenside organisieren sich in der Form zu Aggregaten, dass die hydrophilen Teile nach aussen, zum Wasser hin zeigen, und die hydrophoben Teile nach innen über nicht-kovalente, hydrophobe Wechselwirkungen (van-der-Waals-Wechselwirkungen) aneinander binden. Auf diese Weise schirmen die hydrophilen Köpfe die hydrophoben Teile vom Wasser ab.

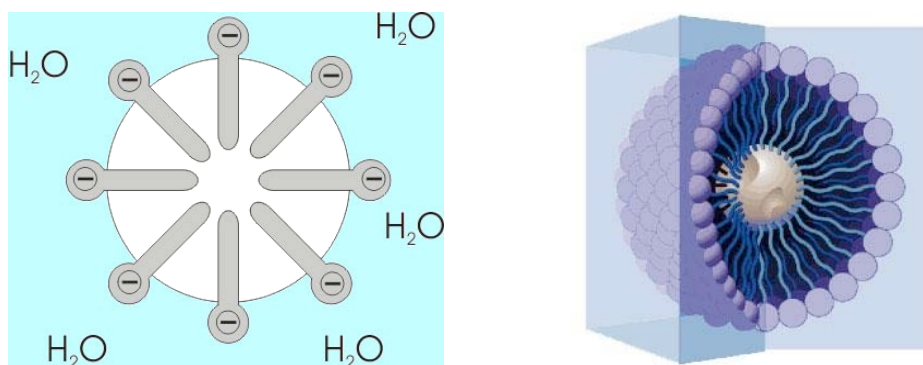


Abb. 5.4: Prinzipieller Aufbau einer Mizelle (links) und Schnitt durch den dreidimensionalen Aufbau einer Mizelle mit einem hydrophoben Teilchen in der Mitte.

Auf der Bildung von Mizellen beruht die Wirkung der waschaktiven Substanzen – eben der Tenside – in Wasch- und Reinigungsmitteln. Wie in Abbildung 5.4 (rechts) gezeigt, werden hydrophobe Schmutzteilchen in der Mitte der Mizelle eingeschlossen und aufgrund der hydrophilen Kopfgruppen aussen auf der Mizelle wasserlöslich gemacht.

SDS wird Proteinproben vor der Analyse zugesetzt. Das Tensid **denaturiert Proteine**, sodass alle im ungefähr gleich stark ungefalteten Zustand vorliegen. Ausserdem bindet der hydrophobe Teil an die Proteine und erzeugt damit einen **negativ geladenen Komplex**. Da sehr viele SDS-Moleküle an ein Protein binden können, spielt die Eigenladung des Proteins keine Rolle mehr. Die Anzahl der SDS-Moleküle pro Eiweissmolekül hängt nur von der Grösse des Proteins ab. Aus diesen Gründen erfolgt die Trennung nicht mehr gleichzeitig nach Ladung, Masse und Faltung, sondern **nur noch aufgrund des Molekulargewichts**. Als Molekulargewichtsstandards lässt man meist eine Mischung von Proteinen bekannter Grösse mitlaufen (siehe Abbildung 5.5).

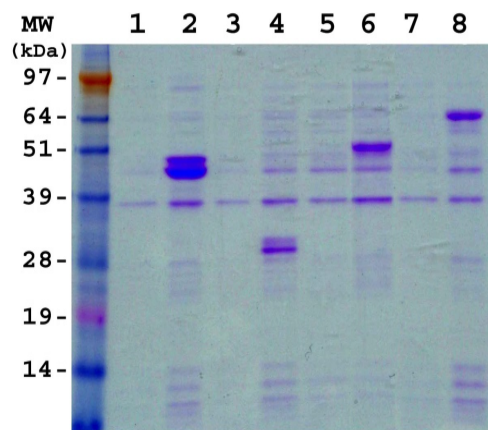


Abb. 5.5:  
SDS-PAGE-Trennung von Proteinen (1-8). Die linke Spur stellt die Trennung eines Standardgemisches verschiedener Proteine mit bekannter Molekülmasse (14–97 kDa) dar.

Die Gel-Elektrophorese (z.B. PAGE und SDS-PAGE) ist vor allem in biochemischen Labors weit verbreitet und wird, wie die Beispiele zeigen, in den Bereichen DNA- und Proteinanalytik eingesetzt. Nachteilig ist, dass die Analyten nicht direkt detektiert werden können, sondern (wie in der DC bzw. TLC) aufwändig angefärbt werden müssen. Ausserdem sind das Giessen der Gele und die Wanderung der Analyten nicht exakt reproduzierbar, weshalb man immer Standards mitlaufen lassen muss. Auch die Erwärmung des Gels während der Trennung spielt eine Rolle. Eine hohe angelegte Spannung bewirkt zwar eine bessere Trenneffizienz und kürzere Analysenzeiten, erhitzt aber auch die Pufferlösung und damit das Gel (Joulsche Erwärmung). Dadurch kann es zu Konvektion in der Pufferlösung kommen, wodurch bereits angetrennte Substanzen wieder vermischt werden können.

## 5.2 Kapillarelektrophorese (CE)

Bei der **Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis = CE)** erfolgt die elektrophoretische Trennung in einer dünnen, langen Kapillare. Der Kapillarinendurchmesser liegt im Bereich von 10–100  $\mu\text{m}$ , die Länge bei 30–100 cm. Aufgrund des günstigen Oberfläche/Volumen-Verhältnisses kann die Joulsche Wärme effizient abgeführt werden. Rückvermischung durch Konvektion spielt hier daher selbst im Bereich mehrerer Kilovolt Betriebsspannung keine Rolle. Typische in der CE einge-

setzte Netzteile liefern Spannungen im Bereich von +30 bis –30 kV. Ähnlich wie in der säulenbasierten Chromatographie (z.B. HPLC) lässt sich die CE mit Detektoren kombinieren, welche kontinuierlich die Analyten erfassen, welche die Kapillare verlassen. Das Anfärben zur Auswertung des Messergebnisses wie in der Gel-Elektrophorese entfällt also. Die CE wird in den meisten Fällen zur Trennung **kleiner, geladener Moleküle sowie anorganischer Ionen** eingesetzt. Wir konzentrieren uns hier auf die beiden wichtigsten Varianten: die **Kapillarzonenelektrophorese (capillary zone electrophoresis = CZE)** und die **Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)**.

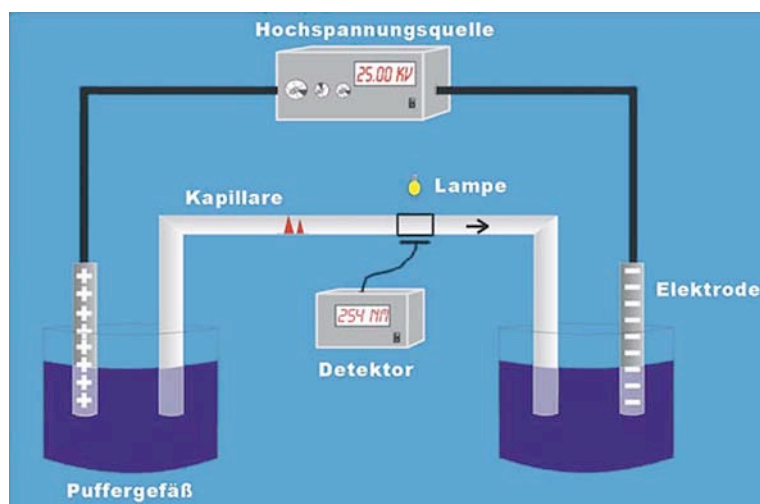


Abb. 5.6: Aufbau einer CE-Anlage.

Für die Detektion kommen im Prinzip die **optischen Detektoren** zum Einsatz, die man auch aus der HPLC kennt. Von Vorteil ist hier, dass die Kapillaren aus Quarz bestehen, welches sowohl sichtbares Licht als auch UV-Strahlung durchlässt. Man kann also direkt in der Kapillare, nahe am kathodenseitigen Ende detektieren. Es ist lediglich erforderlich, an der Detektionsstelle die Schutzschicht zu entfernen, welche wie bei GC-Kapillarsäulen die Quarzkapillare umgibt (siehe Abschnitt 4.1.2). Beim UV/VIS-Detektor wird an einer Seite der Kapillare also eine Deuterium- oder Wolframhalogenlampe angebracht und die transmittierte Strahlung auf der gegenüberliegenden Seite der Kapillare detektiert. Nachteilig ist hier der geringe Innendurchmesser der Kapillaren, welcher zu geringen Schichtdicken und damit geringen Empfindlichkeiten führt (siehe Abschnitt 3.4.1). Höhere Empfindlichkeiten erzielt man, wie auch in der HPLC, mit Fluoreszenzdetektion, wobei sich aber auch hier die geringe Schichtdicke negativ auswirkt (siehe Abschnitt 3.4.4). Generell erzielt man in der CE daher **geringere Empfindlichkeiten als in der HPLC**.

## 5.2.1 Theoretische Grundlagen der CE

### • Grundlegende Formeln

Die **elektrische Kraft**  $F_E$ , die ein elektrisches Feld auf ein geladenes Teilchen (z.B. ein gelöstes Ion) ausübt, ist definiert durch die Ladung des Teilchens  $z$  (z.B. +1, +2, –1 oder –2), die Elementarladung  $e = 1.602 \cdot 10^{-19}$  C und die elektrische Feldstärke  $E$ :

$$F_E = z \cdot e \cdot E \quad (5.1)$$

Die **elektrische Feldstärke**  $E$  ist gegeben durch den Quotienten aus angelegter Spannung  $U$  und Kapillarlänge  $L$ :

$$E = \frac{U}{L} \quad (5.2)$$

Der elektrischen Kraft ist der **Strömungswiderstand (bzw. die Reibungskraft  $F_R$ )** entgegengerichtet, welchem das wandernde Teilchen ausgesetzt ist:

$$F_R = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (5.3)$$

Hier ist  $\eta$  die Viskosität der Lösung,  $r$  der hydrodynamische Durchmesser des geladenen Teilchens und  $v$  seine Wanderungsgeschwindigkeit. Im Gleichgewicht sind beide Kräfte gleich gross und einander entgegengesetzt:

$$F_E = -F_R \quad (5.4)$$

Dadurch ergibt sich für die **Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  des Ions**:

$$v = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (5.5)$$

Da  $v$  noch von der elektrischen Feldstärke und damit von Spannung und Kapillarlänge abhängt, teilt man  $v$  durch  $E$ , um auf eine geräteunabhängige Grösse zu kommen. Den Quotienten aus Wanderungsgeschwindigkeit und elektrischer Feldstärke nennt man **elektrophoretische Mobilität  $\mu_{EP}$** .

$$\mu_{EP} = \frac{v}{E} = \frac{e}{6\pi} \cdot \frac{1}{\eta} \cdot \frac{z}{r} \quad (5.6)$$

Wie durch die Schreibweise angedeutet, hängt die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{EP}$  von drei Faktoren ab: einer Konstanten sowie je einem Faktor, der von Eigenschaften der Pufferlösung ( $1/\eta$ ) bzw. des Analytens abhängt ( $z/r$ ). Die Analytione werden also **gemäss ihrem Verhältnis aus Ionenladung und Ionengrösse getrennt**.

- **Der elektroosmotische Fluss (EOF)**

**Beim Anlegen einer Spannung bewegen sich nicht nur die Analytione, sondern auch die Pufferlösung durch die Kapillare.** Diese fliesst von der Anode zur Kathode, was man als **elektroosmotischen Fluss (EOF)** bezeichnet. Die Kapillarwand besteht meist aus Quarz ( $\text{SiO}_2$ ). Wie wir bereits bei der Betrachtung der stationären Kieselgel-Phasen in der HPLC gesehen haben (siehe Abschnitt 3.3.4), trägt  $\text{SiO}_2$  OH-Gruppen an der Oberfläche, welche abhängig vom pH-Wert deprotoniert vorliegen können. Dadurch (und aufgrund anderer Effekte) ist die Kapillarinnenwand negativ geladen. Aufgrundedessen lagern sich Kationen der Pufferlösung an die Kapillarwand an. Wird eine Spannung angelegt, bewegen sich diese – wie auch die Analyt-Kationen – gemäss Gleichung (5.6) in Richtung Kathode. Da jedes Ion von Lösungsmittelmolekülen umgeben ist und die Kapillare sehr eng ist (also die Kapillarwände nahe beieinander liegen), nehmen die Puffer-Kationen die Flüssigkeit mit, wodurch ein Fluss in Richtung der Kathode entsteht.



In der CE wandern also nicht einfach Analyt-Kationen zur Kathode und Analyt-Anionen zur Anode. In diesem Fall könnte man nur Anionen oder Kationen trennen, da man jeweils den Detektor am entsprechenden Ende der Kapillare anbringen müsste. Es ist vielmehr so, dass **Kationen schneller als der EOF, ungeladene Teilchen mit dem EOF (alle ungeladenen Moleküle eluieren gemeinsam in einem Peak) und Anionen entgegen dem EOF wandern**. Ist die Wandergeschwindigkeit eines Anions langsamer als der EOF, resultiert eine Nettogeschwindigkeit in Richtung der Kathode, weshalb es den dort angebrachten Detektor erreicht und erfasst werden kann. Nur zu schnell wandernde Anionen (schneller als EOF) verlassen die Säule an der Anodenseite und entziehen sich der Analyse. Aufgrund des EOF in Kathodenrichtung wird der Detektor kathodenseitig angebracht, was die **gleichzeitige Analyse von Kationen und einigen Anionen** ermöglicht. Ungeladene Moleküle verhalten sich als Inertsubstanz und werden ungetrennt mit dem EOF durch die Kapillare transportiert.

## 5.2.2 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die **Kapillarzonenelektrophorese (capillary zone electrophoresis = CZE)** ist die am häufigsten eingesetzte Variante der CE. Sie basiert auf der Trennung ionischer Analyten gemäss ihrer Ladung und Grösse bzw. ihrem  $z/r$ -Verhältnis (entsprechend Gleichung (5.6)), wobei Kationen schneller als der EOF, ungeladene Moleküle ungetrennt mit dem EOF und Anionen entgegen dem EOF wandern. Anionen, die langsamer als der EOF wandern, erreichen wie auch die Kationen den kathodenseitig angebrachten Detektor. Die theoretischen Grundlagen der CZE wurden im vorhergehenden Abschnitt 5.2.1 beschrieben.

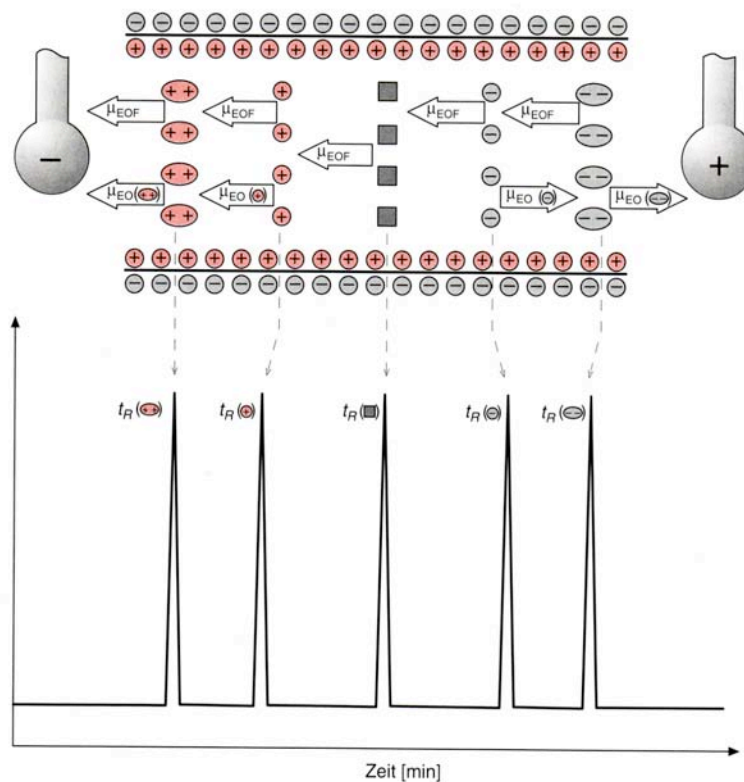


Abb. 5.7: Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese (CZE).

Wie Abbildung 5.7 zeigt, ist die Kapillarwand negativ geladen, wodurch sich positiv geladene Ionen des Puffers nahe an der Wand aufhalten und den elektrosmotischen



Fluss (EOF) in Richtung der Kathode bewirken. Kationen bewegen sich schneller als (bis gleich schnell wie) der EOF in Richtung Kathode, wobei mehrfach geladene Ionen schneller als einfach geladene wandern. Neutrale Moleküle (als Quadrate dargestellt) wandern ungetrennt mit dem EOF mit, und Anionen wandern gegen den EOF in Richtung Anode, wobei langsam wandernde Anionen wegen des EOF trotzdem den kathodenseitig angebrachten Detektor erreichen. Den Detektor erreichen also erst Kationen mit grossem  $z/r$ -Verhältnis (siehe Gleichung (5.6)) gefolgt von Kationen mit kleinem  $z/r$ -Verhältnis, Neutralteilchen und schliesslich langsam wandernde Anionen.

### 5.2.3 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Wie erwähnt, bildet die **Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)** eine Ausnahme im Bereich der CE. Im Gegensatz zu anderen elektrophoretischen Trennverfahren ist die MEKC eine Chromatographie, da sie auf der unterschiedlichen Verteilung der Analyten auf zwei Phasen beruht. Die MEKC ist eine Art der Chromatographie, welche man in einer CE-Apparatur (mit einer herkömmlichen CE-Kapillare) durchführen kann und im Gegensatz zur CZE auf ungeladene Analyten anwendbar ist. Daneben können aber auch ionische Substanzen getrennt werden.

Die MEKC unterscheidet von der CZE, dass der Pufferlösung eine ausreichende Menge an **Tensiden** zugesetzt werden. Ein häufig eingesetztes Tensid ist das in Abbildung 5.3 gezeigte Natriumdodecylsulfat (SDS), welches aus einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe und einem unpolaren, hydrophoben Schwanz besteht und ab einer bestimmten kritischen Konzentration Lösung **Mizellen** bildet (siehe Abbildung 5.4).

Betrachten wir nun die Eigenschaften, welche die MEKC zur **Chromatographie** machen. Die Pufferlösung, welche sich aufgrund des EOF durch die Kapillare bewegt, stellt die **mobile Phase** dar. Die zweite Phase ist durch die Mizellen gegeben. Diese wandern zwar auch, da sie sich wie langsam wandernde Anionen in der CZE verhalten, bewegen sich aber langsamer als der EOF in Richtung Kathode. Man spricht hier daher statt von einer stationären, von einer **pseudo-stationären Phase**. Die Trennung beruht nun darauf, dass sich Analyten entsprechend ihrer Polarität **zwischen der mobilen und pseudo-stationären Phase verteilen**. Unpolare Moleküle halten sich überwiegend im hydrophoben Inneren der Mizellen auf und werden deshalb retendiert, wogegen polare Moleküle vor allem in der Pufferlösung verbleiben und schneller eluiert werden (siehe Abbildung 5.8). Das entspricht dem Grundprinzip der Umkehrphasen-LC, wodurch klar wird, dass die MEKC zu Recht als Chromatographie bezeichnet wird.

Die Bewegung der Analyten durch die Kapillare beruht hier also nicht (ausschliesslich) auf ihrer Eigenladung. Vielmehr wandert die Pufferlösung (mobile Phase) aufgrund des EOF in Richtung Kathode, die langsamere Bewegung der Mizellen (pseudo-stationäre Phase) beruht auf ihrer negativen Oberflächenladung (Wanderung in Richtung Kathode) und ihrer Grösse (geringere Geschwindigkeit als EOF). Sind neben ungeladenen Analyten auch Ionen in der Probe vorhanden, so wandern diese natürlich gemäss ihrer Ladung entweder in Richtung Kathode oder Anode.

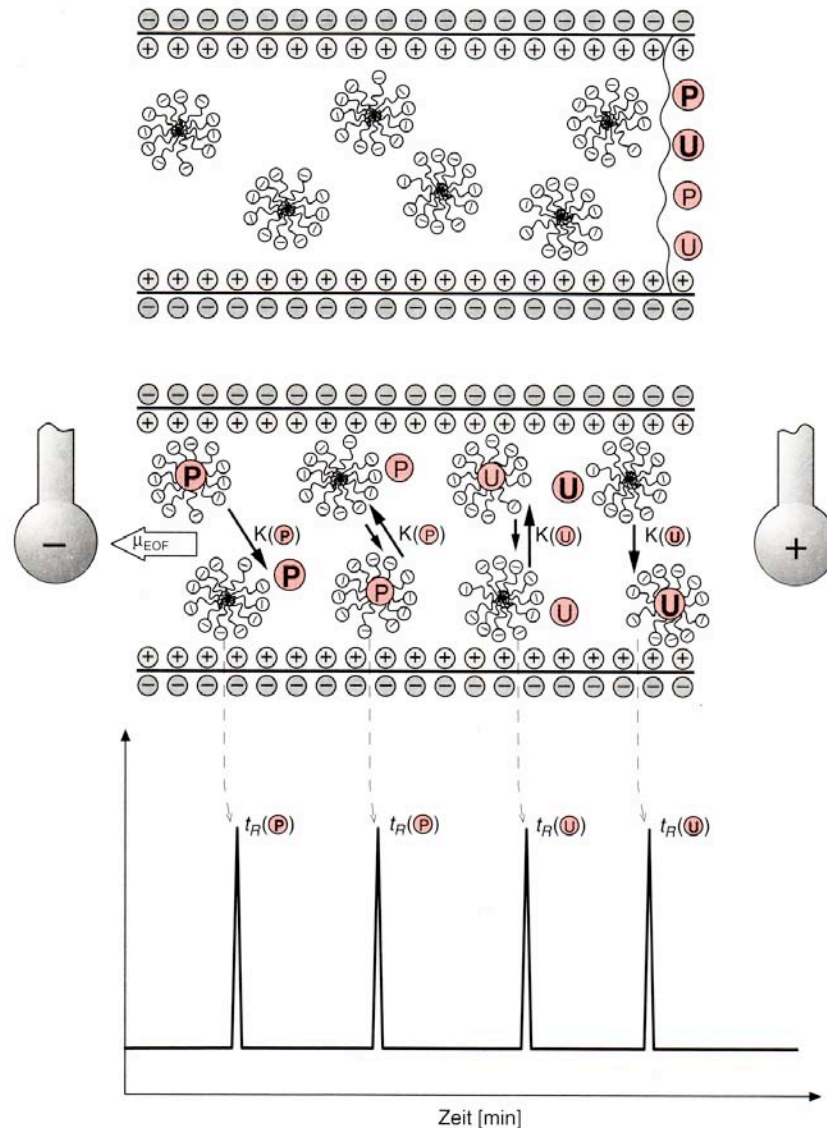


Abb. 5.8: *Prinzip der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC).*  
 Oben: *Anfänglich befindet sich reine Pufferlösung mit Mizellen in der Kapillare, in welche anodenseitig Analyten injiziert werden (P = sehr polare Analyten, P = polare Analyten, U = unpolare Analyten, U = sehr unpolare Analyten).*  
 Unten: *Die Analyten verteilen sich entsprechend ihrer Polarität zwischen Pufferlösung (mobile Phase) und Mizellen (pseudo-stationäre Phase), wodurch letztendlich polare vor unpolaren Analyten eluieren.*

Im Gegensatz zur CZE lässt sich die MEKC also auch auf **ungeladene Analyten** anwenden, was ihren grossen Vorteil gegenüber der „klassischen Variante“ der CE darstellt. Da die Analyten **nach absteigender Polarität** (polare eluieren vor unpolaren Substanzen) **getrennt** werden, kann man sie durchaus mit der RP-HPLC vergleichen. Der Vorteil der MEKC gegenüber der HPLC liegt in häufig deutlich schmalere Peaks und kürzeren Analysenzeiten, zu den Nachteilen zählt die bereits angesprochene schwierige Reproduzierbarkeit der Migrations- bzw. Retentionszeiten in der CE allgemein.