

12. Schülerpraktikum 2014

Am 04., 05. und 06. März absolvierten

ca. **50 Schüler**

aus den ostsächsischen Gymnasien
das diesjährige **BioAnalytik-Praktikum**



Ein besonderer Dank gilt den Organisatoren und Betreuern der BioAnalytik-Praktika: **Herrn Andreas Fritz, Herrn Harald Schiepe, Frau Ines Vogel, Frau Monika Opitz und Frau Friedgard Haaser!**

12. Schülerpraktikum, Bioanalytik, 2014

1. Einführung

Das Bioanalytik-Praktikum ist in diesem Jahr auf die Trennmethoden **Elektrophorese** und **Flüssigchromatographie** fokussiert.

In der **Elektrophorese** werden sogenannte Flachbettverfahren („slab gel“) praktiziert – die **SDS-PAGE (s. Punkt 2.1)** und die **CAF (2.2)**. Ziel ist die Trennung von Proteinen verschiedener Größe (Molekulargewichte) in Polyacrylamid-Gelen (PAG) und von Serumproteinen mittels Celluloseacetatfolien (CAF).

Die **Flüssigchromatographie** beinhaltet die **HPLC** (high-performance liquid chromatography) und die **TLC** (thin layer chromatography).

Mit dieser Trenntechnik – auch als DC (Dünnschichtchromatographie) bezeichnet – sollen einerseits Lebensmittelfarbstoffe (**DC-1, s. Punkt 3.1**) und andererseits Azo-Farbstoffe (**DC-2, 3.2**) getrennt werden.

In der HPLC werden Säulen zur chromatographischen Trennung von Wirkstoffen z.B. in Kaffee- und Cola-Produkten (Coffein, **HPLC-1, 3.3**) oder von Zuckern und EtOH in alkoholischen Getränken (Wein, Alcopops, **HPLC-2, 3.4**) eingesetzt.

2. Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von geladenen Analyten (Ionen, Proteine, Teilchen) im elektrischen Feld, wobei sich die Analyte in wässriger Lösung (Puffer-Lösungen) befinden. Die elektrophoretische Trennung erfolgt innerhalb stabilisierender Medien wie Gele oder Folien.

„**Elektro**“: Anlegen einer Spannung; **-phor** (gr.) bedeutet „tragen“.

In Abbildung 1 und 2 ist die Wanderung von Ionen in einem elektrischen Feld schematisch dargestellt. Machen Sie sich mit diesen Prinzipien vertraut!

Abbildung 1

Was ist **Elektro**-phorese: Trennprinzipien

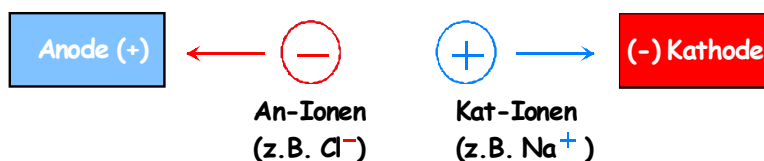
(Wanderung von geladenen Analyten im elektrischen Feld)

Anode (+): positiv geladener Pol (*An-genehm ist positiv!*)

Kathode (-): negativ geladener Pol (*Kat-astrophe ist negativ!*)

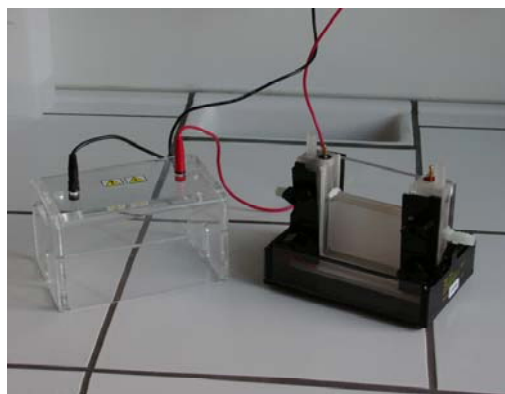
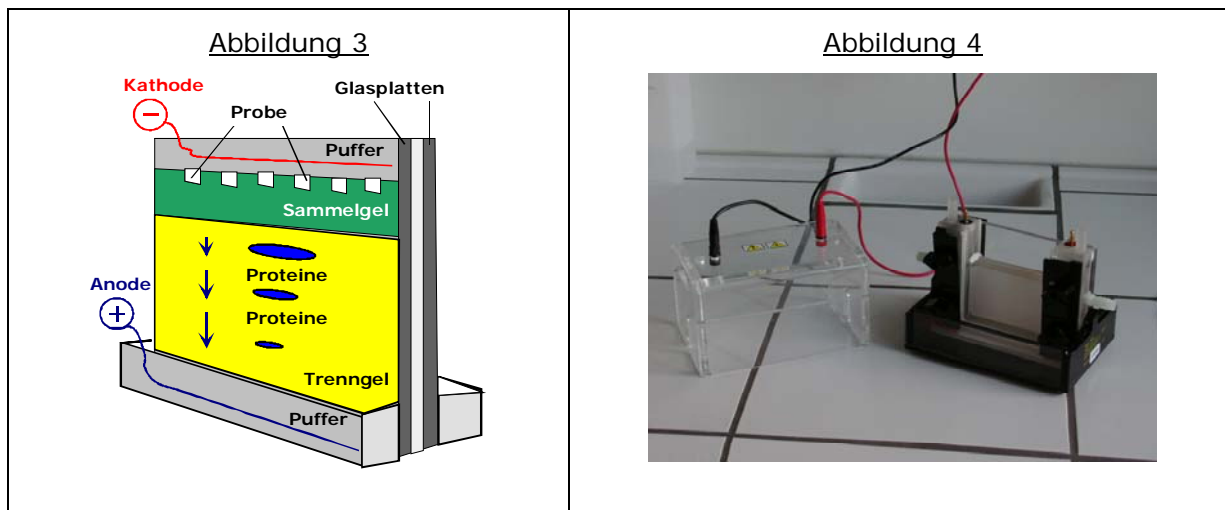
Abbildung 2

Wanderung der Ionen zu den entgegengesetzt geladenen Polen



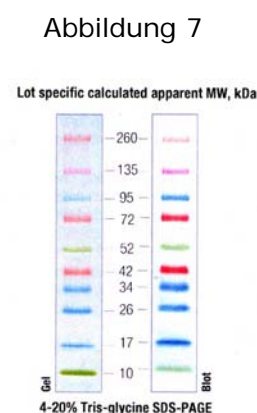
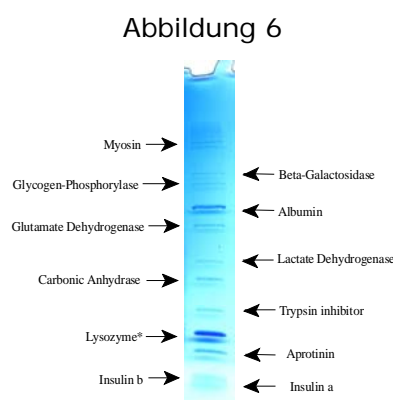
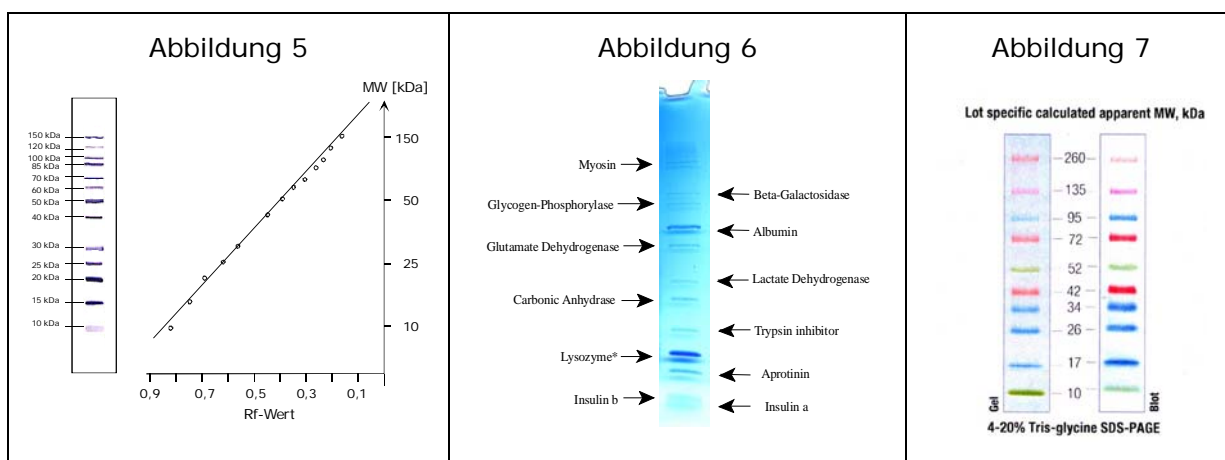
2.1 SDS-PAGE

Bei dieser Trenntechnik werden Polyacrylamidgele eingesetzt. Kleine Proteine wandern schneller im elektrischen Feld als hochmolekulare Proteine. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen dies schematisch bzw. das SDS-PAGE-Equipment.



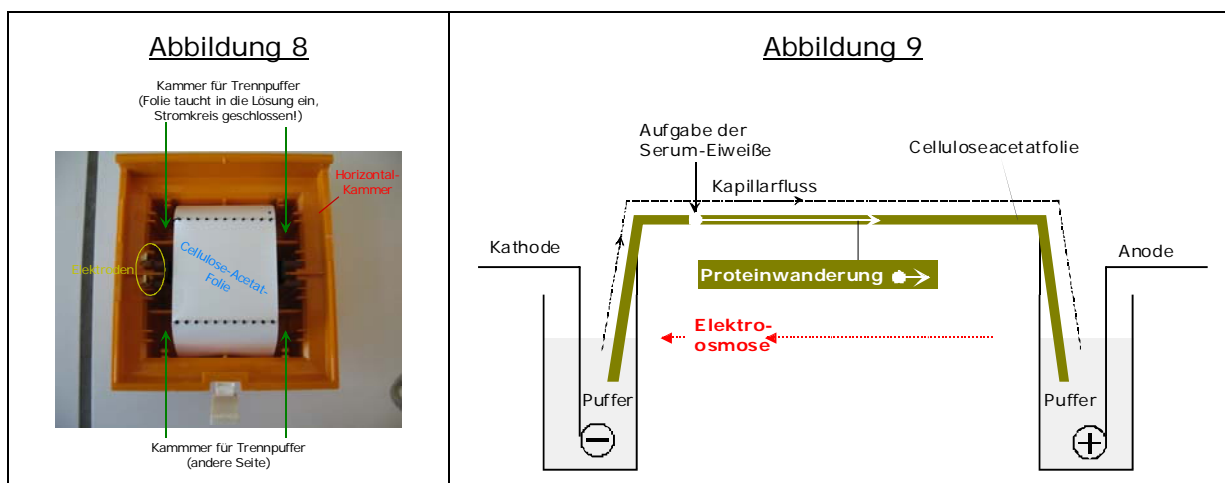
Die Proteine werden zuvor durch Erwärmen und Zugabe von Dithiothreitol (DTT) denaturiert. SDS (sodium dodecyl sulfate) wird dem Trennpuffer zugesetzt und bewirkt, dass die Proteine weiterhin im denaturierten Zustand verbleiben. Diese „lineare Streckung“ der Proteine (Primärstruktur) ist eine Grundvoraussetzung, damit eine lineare Abhängigkeit zwischen den Molekulargewichten der Proteine und ihren Wanderungstrecken (R_f -Werten) im Gel besteht. Aus derartigen Kurven, die mit Hilfe von Standardproteinen bekannter Molekulargewichte und der Messung ihrer entsprechenden R_f -Werte erstellt werden, können die Molekulargewichte unbekannter Proteine bestimmt werden (Abb. 5). Meist werden die Proteinbanden im Polyacrylamidgel nach der Trennung mit Farbstoffen wie Coomassie blue angefärbt bzw. „visualisiert“ (Abb. 6).

Im Praktikumsversuch erfolgt der Einsatz farbiger Proteine (siehe Abb. 7), da Färbung und Entfärbung der Gele relativ lange dauern.



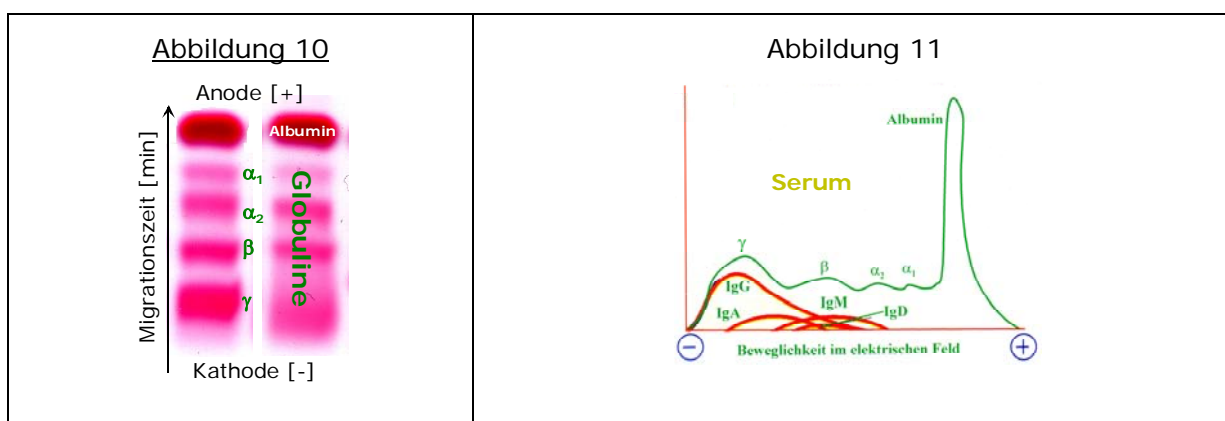
2.2 CAF

In der **Celluloseacetat-Folien(CAF)**-Elektrophorese werden als Trennmedien Folien eingesetzt (s. Abb. 8), die – wie der Name sagt – aus acetylierter Cellulose bestehen. Die Folien werden mit einem basischen Puffer (Trennpuffer) getränkt, damit die Proteine unter dem Einfluss des elektrischen Feldes in der Folie wandern (migrieren) können. Die Folienenden tauchen in entsprechende Vorratsgefäße (Kammern der Apparatur, s. Abb. 9) ein, die mit dem Trennpuffer gefüllt sind. Damit ist der „Stromkreis“ geschlossen. Die Aufgabe der Proteine (Abb. 9) erfolgt mit einem Applikator. Nach Anlegen der Spannung beginnen die Proteine in Richtung Anode zu wandern. Diese Richtung ist vorgegeben, da die Proteine im basischen Puffermilieu negativ geladen sind bzw. als Anionen vorliegen.



Als biologische Proteinmischungen werden Blutseren in der CAF-Elektrophorese eingesetzt. Die Hauptkomponenten dieser Serum-Eiweiße sind Albumin und die α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline. Diese unterscheiden sich in ihren prozentualen Anteilen bei Vergleich von normalen (gesunden) und pathologischen Blutseren. Hier werden die in den Folien getrennten Proteinbanden mit dem roten Farbstoff Ponceau R angefärbt (Abb. 10). Das linke Elektropherogramm zeigt ein pathologisches Bluterum – die γ -Globulin-Bande ist verstärkt. Dies zeigt die Abbildung 11 im linken Teil.

Diese Darstellungsweise (Abb. 11) ist ein sogenanntes „Densitogramm“. Die roten Banden (Abb. 10) wurden gescannt und in Form von Peaks aufgezeichnet. Je intensiver die Rotfärbung ist, desto größer ist der Peak - wie es das Beispiel Albumin zeigt.

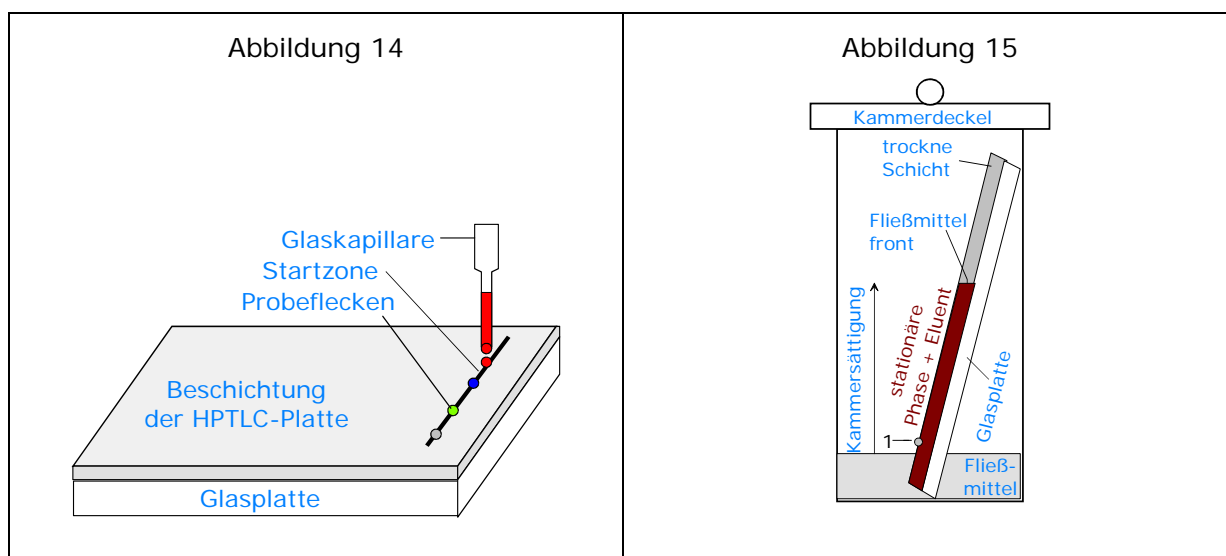


3. Flüssigchromatographie

In der Flüssigchromatographie erfolgt die Trennung auf Grund unterschiedlicher Wechselwirkungen der Analyte zwischen einer mobilen (Eluent) und einer stationären Phase. Diese besteht meist aus Silicagel und befindet sich in Säulen (HPLC) oder auf Folien bzw. auf Glasplatten (TLC). Zur Elution dienen organische oder auch wässrige mobile Phasen.

3.1 DC-1

Die DC (Dünnschichtchromatographie, TLC: **T**hin **L**ayer **C**hromatography, HPTLC steht für besonders große Leistungsfähigkeit: **HP** – **H**igh **P**erformance) ist eine – apparativ gesehen – einfache Trenntechnik, die in vertikaler (Abb. 15) oder horizontaler Richtung (Abb. 19) praktiziert wird. Meist kommen mit polarem Silicagel (stationäre Phase) beschichtete Glasplatten zum Einsatz. Die mobilen Phasen (auch als Eluenten oder Trennflüssigkeiten bezeichnet) können sowohl polar als auch unpolar sein. Sie durchströmen auf Grund von Kapillarkräften das Silicagel-Bett und „transportieren“ dabei die Analyte innerhalb der DC-Platte. Dies erfolgt in Abhängigkeit der Wechselwirkungen mit der stationären und mobilen Phase. Für eher unpolare (lipophile) Analyte können z.B. Toluol eingesetzt werden; für mittel- und polare Probestandteile dienen wässrige Lösungen, die z.B. aus Mischungen von Methanol, Wasser, Essigsäure bestehen.



Im Praktikumsversuch „DC-1“ sollen Lebensmittelfarbstoffe, die auch in Faserstiften enthalten sind, getrennt werden.

Der Probenauftrag (s. Abb. 14, 16 und 17) auf eine Silicagelplatte (10 cm x 10 cm) erfolgt direkt mit dem Stift (siehe aber auch Arbeitsplananleitung!).

Als mobile Phase dient ein Gemisch bestehend aus destilliertem Wasser, Methanol, Essigsäure und Ethylacetat. Die genaue Zusammensetzung variiert und wird im Praktikum festgelegt!

Stellen Sie in den TLV-Versuchen fest, ob eine aufgegebene LM-Farbe aus nur einer oder mehreren Farbkomponenten besteht!

Soweit es möglich und sinnvoll ist, sollen auch R_f -Werte bestimmt werden (siehe Abb. 22, Formel 1).

Abbildung 16



Abbildung 17



Abbildung 18



Abbildung 19



3.2 DC-2

Im Praktikumsversuch „DC-2“ sollen Azofarbstoffe aus einer komplexen „schwarzen“ Matrix getrennt werden. Auch hier kommen Glasplatten mit Silicagel der Größe 10 x 10 cm zum Einsatz. Eluiert wird jedoch mit dem unpolaren Toluol.

Die Probenaufgabe erfolgt „automatisiert“. Mittels Linomat (Abb. 20) werden die Proben auf die DC-Platte strichförmig aufgetragen – mit gleicher Strichlänge und identischen Abständen zwischen den „Startstrichen“, aber mit exakt unterschiedlichen Auftragsvolumina (1,0; 2,0 ...5,0 μ l).

Die Auswertung der DC-Platten kann über eine PC-gesteuerten Scanner erfolgen (Abb. 21).

Abbildung 20



Abbildung 21



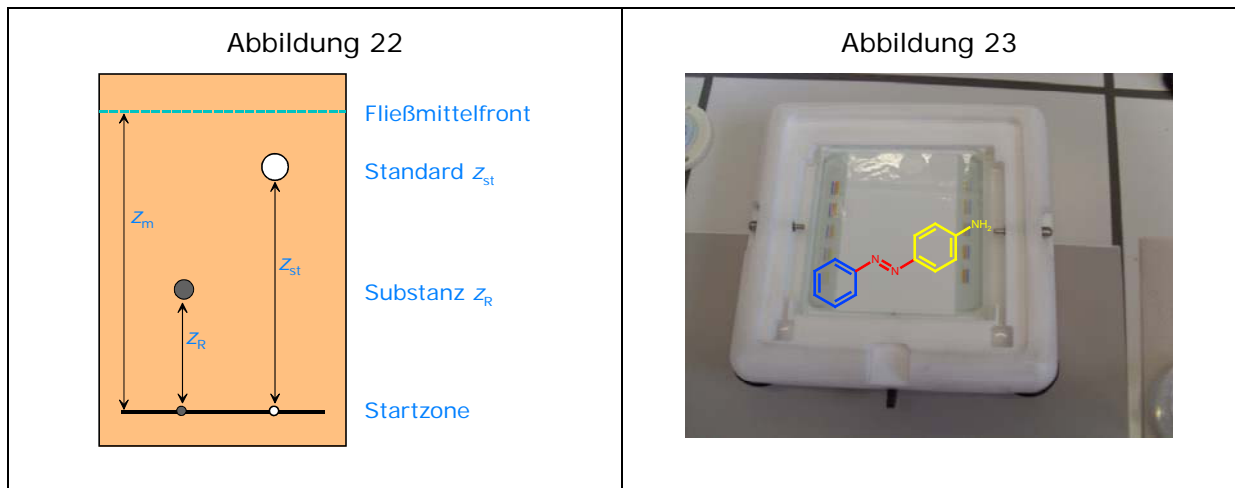
Innerhalb der Auswertung von TLC-Chromatogrammen dient der Retentionsfaktor (R_f) als qualitatives Maß, der auch als Verzögerungsfaktor bezeichnet wird.

Er ist als das Verhältnis der Wanderungsstrecke des Analyten, z_R , zur Wanderungsstrecke der mobilen Phase (z_M) definiert (siehe Abbildung 22 und Gleichungen 1).

Zur Erzielung besserer Reproduzierbarkeiten in der Dünnschichtchromatographie wurde ein Retentionsfaktor (R_{st}), eingeführt, der sich auf eine Standardsubstanz (z_{st}) bezieht (siehe Gleichung 2 – ist jedoch hier nicht Bestandteil der Praktikumsversuche).

$$R_f = \frac{z_R}{z_M} \quad (1)$$

$$R_{st} = \frac{z_R}{z_{st}} \quad (2)$$

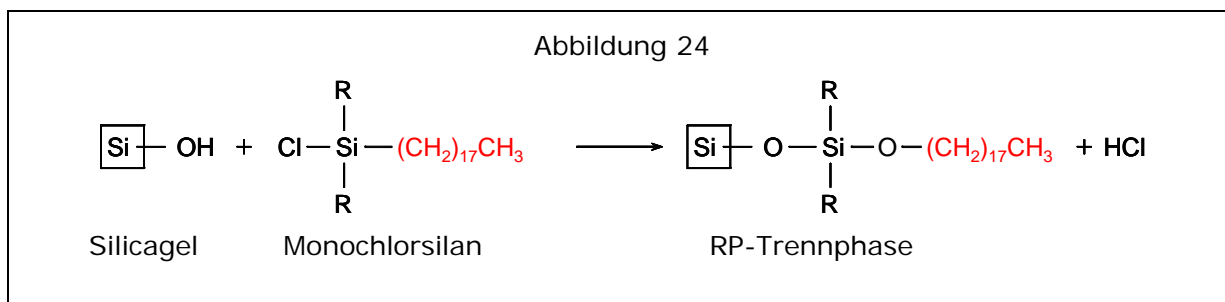


Notizen

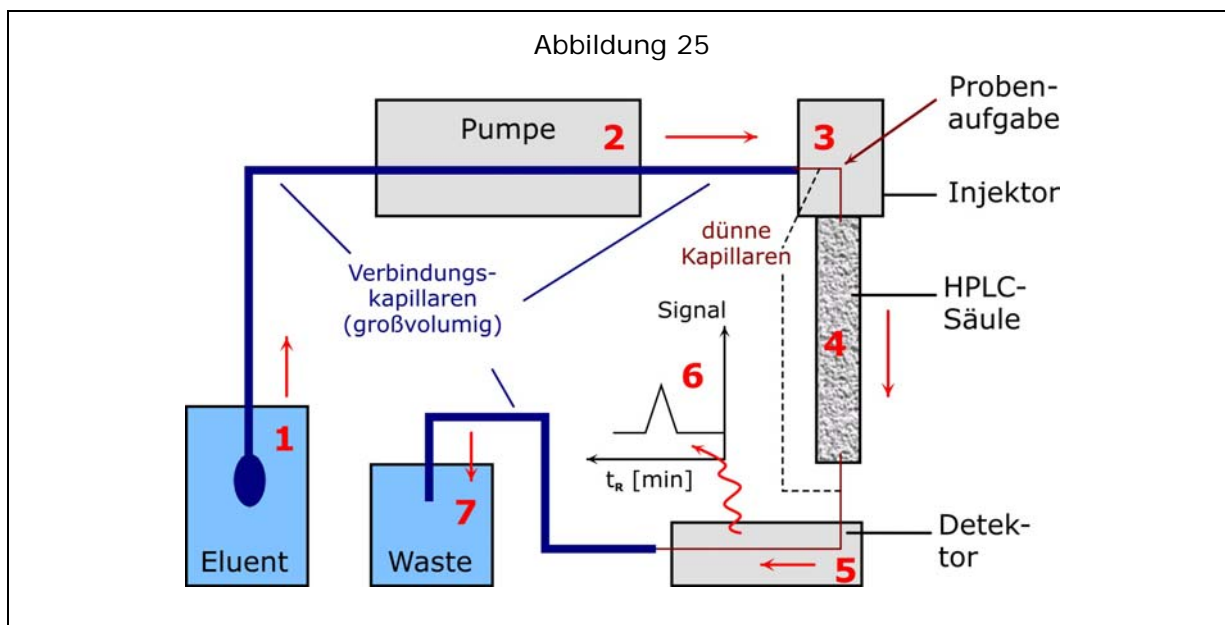
3.3 HPLC-1

HPLC (**H**igh-**P**erformance **L**iquid **C**hromatography) ist eine umfassend angewandte und hoch effiziente Analysenmethode, mit der ca. 80 % aller bekannten (organischen) Verbindungen analysiert werden können.

Herzstück einer HPLC-Apparatur sind Trennsäulen mit kleiner Dimension (z.B. 30 mm Länge x 2 mm innerer Durchmesser, 100 mm x 3 mm i.D. oder 150 mm x 4 mm i.D.), die mit sehr kleinen Partikeln („Kügelchen“) enger Korngrößenverteilung um 3 µm oder um 5 µm unter hohem Druck gefüllt worden sind.

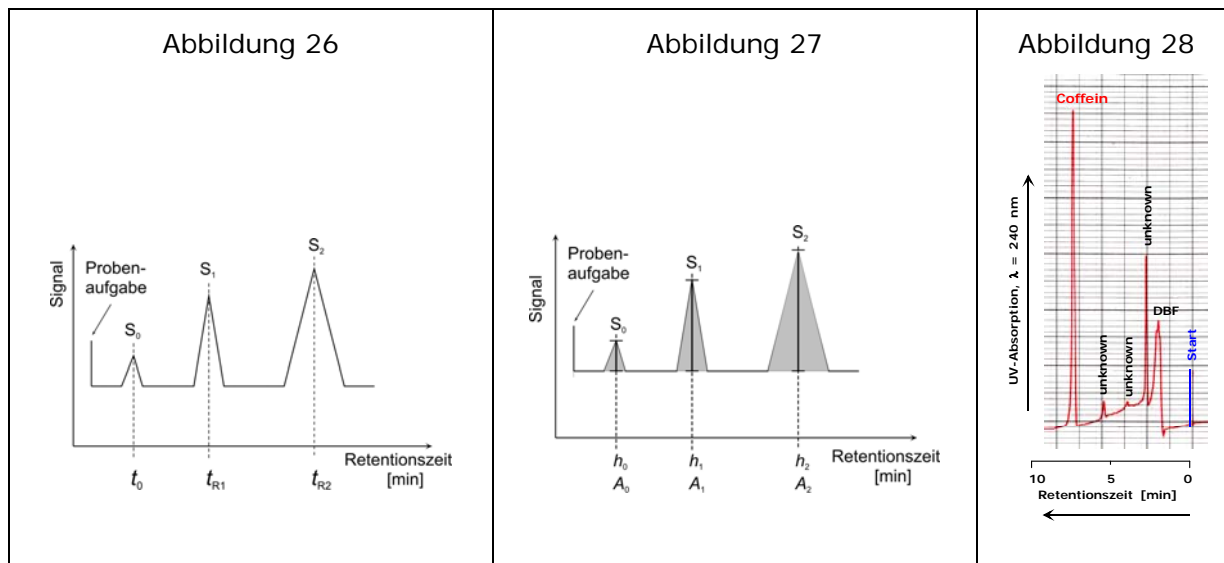


Meist werden sogenannte RP-Materialien (**R**eversed-**P**hase) als stationäre Phasen eingesetzt (Abb. 24). Für ihre Herstellung wird polares Silicagel mit Monochlorsilanen chemisch modifiziert. Dabei entsteht eine sehr stabile Si-O-Si-Bindung, die mit Octadecylketten gekoppelt ist. Diese verleihen der stationären Phase (RP-18) einen unpolaren (hydrophoben) Charakter. Als mobile Phasen dienen hier polare Eluenten wie Methanol-/Wassergemische.



Wie aus dem Ablaufschema einer HPLC-Anlage (Abb. 25) hervorgeht, wird der Eluent (1) mittels einer Hochdruckpumpe (2) zum Injektor (3) gefördert. Dort erfolgt das Applizieren der Probe – sie besteht aus Matrix und Analyt/en – auf die HPLC-Säule (4). Hier werden die Substanzen aufgetrennt. Im anschließenden Detektor (5) passieren sie eine Mikrodurchflussküvette und werden danach in Form eines Chromatogramms (6) aufgezeichnet. Der Flüssigkeitsstrom wird in ein Abfallgefäß (7) geleitet.

Das Chromatogramm liefert uns qualitative und quantitative Aussagen über die getrennten Einzelsubstanzen.



Ein qualitatives Maß ist die Retentionszeit t_R (Abb. 26). Unter den gewählten apparativen Bedingungen (Säule, mobile Phase, Flussrate u.a.) ist sie für eine Substanz charakteristisch – in Abbildung 28 für Coffein bei 7 Minuten und 32 s. Werden die Bedingungen geändert, erhalten wir andere Zeiten, so dass die Retentionszeiten schwer zu standardisieren sind.

Eine Quantifizierung der Einzelsubstanzen erfolgt über die Höhen oder Flächen der Peaks. Weiterhin sind definierte Standardsubstanzen bekannter Konzentration erforderlich.

$$\frac{c_{\text{Probe}}}{A(h)_{\text{Probe}}} = \frac{c_{\text{Test}}}{A(h)_{\text{Test}}} \quad (3)$$

Nach dem „Dreisatz“ verhält sich die Konzentration der Substanz in der Probe (c_{Probe}) zu ihrer Fläche oder Höhe genauso wie die Konzentration der Substanz im Test zu deren Fläche bzw. Höhe. Unbekannt ist dabei c_{Probe} !

Mit dieser Trenntechnik soll Coffein in verschiedenen Kaffee- und Cola-Getränken analysiert werden. Entsprechende Anleitungen und Arbeitsvorschriften erhalten Sie im Praktikum.

3.4 HPLC-2

Neben der RP-HPLC wurden weitere Trennsysteme – „Kombinationen“ von stationärer und mobiler Phase – entwickelt. Auch ionische Wechselwirkungen (Ionenaustausch-Chromatographie) führen z.B. zur Trennung von Analyten wie Chlorid (Cl^-), Nitrat (NO_3^-) und Fluorid (F^-). Oder es wird das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ bei der Trennung von Antigen (AG) und Antikörper (AK) innerhalb der Affinitätschromatographie ausgenutzt.

Im Praktikum wird die sogenannte Ligandenaustausch-Chromatographie zur Trennung von Zuckern und Alkohol eingesetzt.

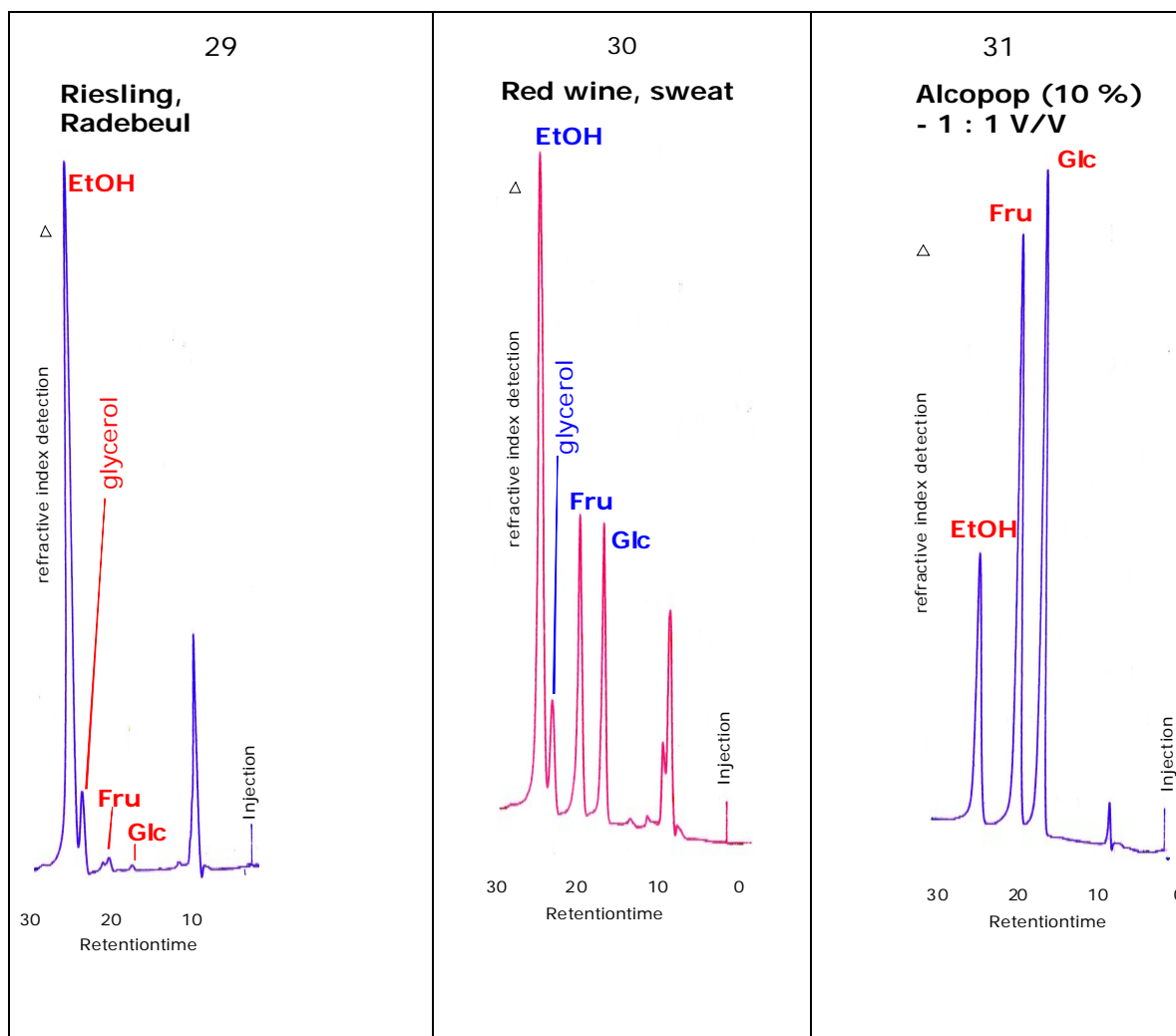
Das Equipment ist auch eine HPLC-Anlage (Abb. 24) und die Chromatogrammauswertung erfolgt wie in Abb. 25. und 26 dargestellt.

Unterschiede sind, dass die HPLC-Säule spezielle Polymerpartikel als stationäre Phase enthält, die sehr selektive Trenneigenschaften („Ligandenaustausch“) für Zucker aufweist. Die Methode ist sehr ökologisch, da keine Organika, sondern nur reines Wasser als mobile Phase eingesetzt wird. Die Registrierung der Peaks erfolgt mit einem sogenannten RI-Detektor (**R**efractive **I**ndex). Basis ist nicht die Messung der UV-Absorption (siehe Coffein-Versuch), sondern die Ermittlung von Brechungsindizes.

Die folgenden Abbildungen erhalten die Ergebnisse für 3 verschiedene Getränke – was fällt Ihnen beim Vergleich der Chromatogramme auf?

Sie können auch gern per Mail Rückfragen stellen!

Weitere Informationen, Anleitungen und Arbeitsvorschriften erhalten Sie im Bioanalytik-Praktikum.



Notizen: _____
