



Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

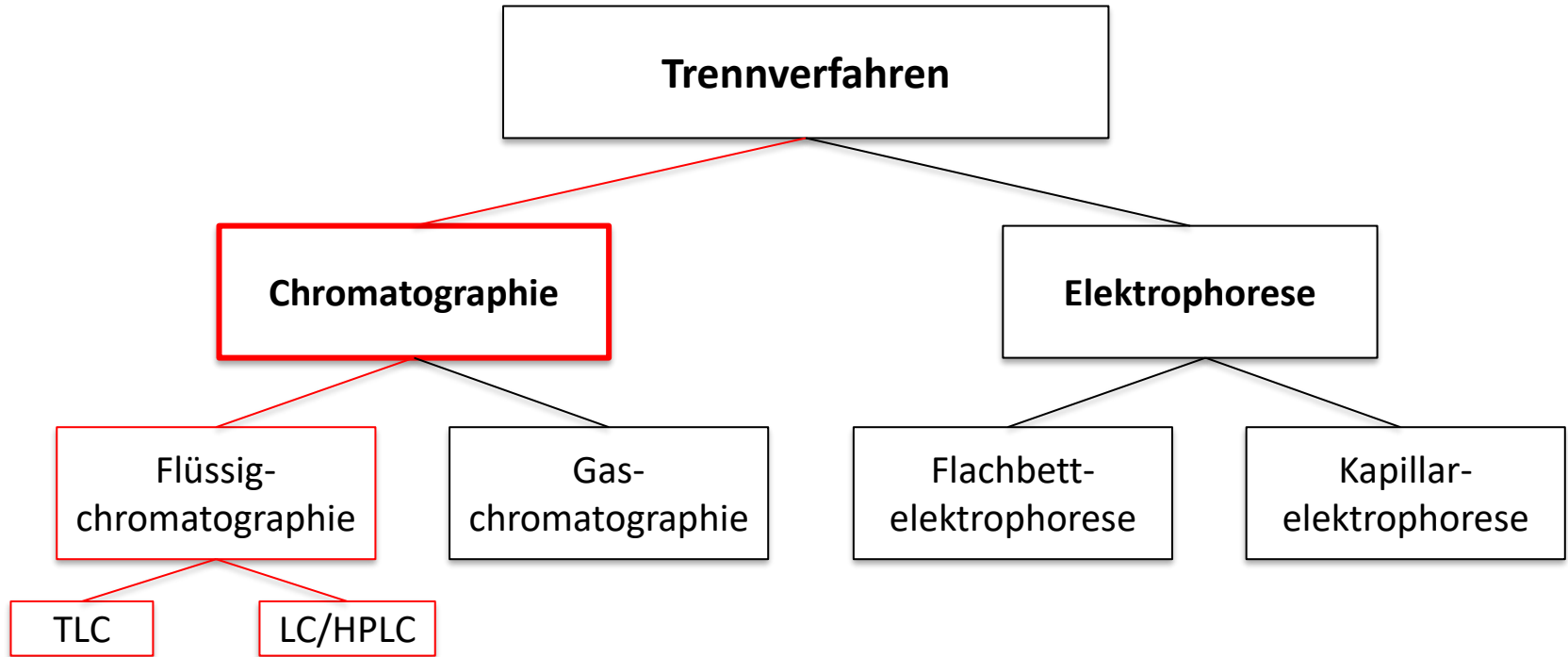
Prof. Dr. Mircea Tric

SS 2026

Chromatographie

Verfahren zur Trennung von Substanzen auf Grund ihrer unterschiedlichen Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase

Trennverfahren

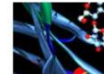


Anwendungsgebiete der Chromatographie

Chromatographie ist integraler Bestandteil fast aller modernen **Produktions-, Forschungs- und Entwicklungsbereiche!**

Chromatographiearten:

- Adsorptions-Chromatographie
- Verteilungs-Chromatographie
- Gelfiltration
- Affinitäts-Chromatographie
- Ionen(austausch)-Chromatographie



Biopharma



Proteomics



Lebensmittel
und
Landwirtschaft



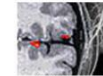
Geochemie



Umwelt



Pharma



Klinische
Forschung



Forensik



Metabolomics

***Forensik:**

Wissenschaftliche und technische Arbeitsgebiete, in denen *kriminelle Handlungen* systematisch untersucht werden.

Selektivität und Spezifität

Selektives Verfahren (Selektivität)

Ein Verfahren ist dann selektiv, wenn es in der Lage ist, eine **bestimmte Gruppe** von Stoffen aus einem komplexen **Gemisch** bevorzugt zu trennen oder zu erfassen.

Klassisch Selektive Verfahren **trennen** Stoffgemische aufgrund **physikalischer** oder **chemischer** Unterschiede, identifizieren sie aber nicht immer zu 100 % eindeutig (z.B. gleiche Retentionszeiten).

z.B. chromatographische Verfahren wie **GC**, **HPLC** und **Elektrophorese**

Spezifisches Verfahren (Spezifität)

Ein Verfahren ist spezifisch, wenn es **nur** einen **einzig** Stoff (eine bestimmte chemische Verbindung) aus einem Gemisch identifizieren oder trennen kann, ungeachtet dessen, welche anderen Stoffe vorhanden sind.

Es gibt theoretisch **keine Störungen** durch andere Stoffe (z.B. MS, NMR, FT-IR, ELISA).

In der Analytik nutzt man **gekoppelte Systeme**. Dadurch wird ein **selektives Trennverfahren** durch ein **spezifisches Detektionsverfahren** ergänzt: z.B. GC-MS, LC-MS/MS

Was ist Chromatographie?

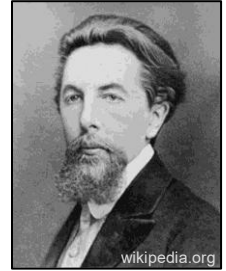
Chromatographie:

Analytische **Methode**, um **Substanzgemische** in die **Einzelkomponenten** aufzutrennen und zu bestimmen.

Auftrennung eines Stoffgemisches durch unterschiedliche **Verteilung** seiner Einzelbestandteile **zwischen** einer **stationären** und einer **mobilen Phase**.

Historische Entwicklung

- 1901 Entwicklung der Säulenchromatographie (Trennung eines **Blattfarbstoffgemisches** mit Hilfe einer CaCO_3 -gefüllten Glassäule)
- 1950er Entwicklung der Gaschromatographie (**GC**)
- 1960er Entwicklung der High Performance Liquid Chromatography (**HPLC**)
- 1965 Einzug der Dünnschichtchromatographie in die chemische Analytik



Mikhail Tswett



Säulenchromatographie (Trennung nach Polarität)

Terminologie

Die Probe wird in einer **mobile Phase** gelöst und danach durch eine **stationäre Phase** bewegt.

Stationäre Phase:

Ruhende Phase (**Feststoff** oder **hochviskose Flüssigkeit**), die in der Trennsäule als **Trägermaterial** dient

Mobile Phase:

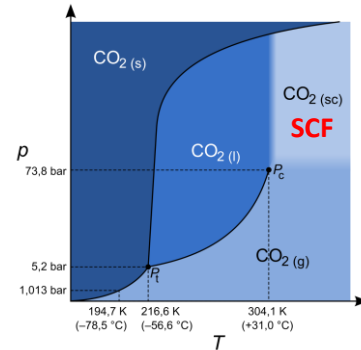
Lösungsmittel (**Flüssigkeit, Gas, superkritisches Fluid**), das sich durch die Säule bewegt.

→ **Transport** des zu trennenden Gemisches

Eluieren = mobile Phase passiert die Säule



SCF **superkritisches Fluid**



Trennprinzip

Chromatographie:

Stofftrennung zwischen einer ruhenden (**stationären**) und einer sich bewegenden (**mobilen**) Phase → **unterschiedliche Wechselwirkungen**

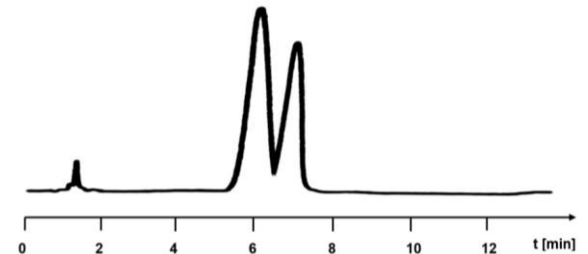
Trennvorgang:

Permanente **Gleichgewichtseinstellungen** der zu trennenden Komponenten zwischen der **stationären** und der **mobilen Phase**

Komponenten, die von der **stationären Phase** stark zurückgehalten (**retardiert**) werden bewegen sich nur langsam mit der mobilen Phase weiter

→ Trennung aufgrund von **Mobilitätsunterschieden**

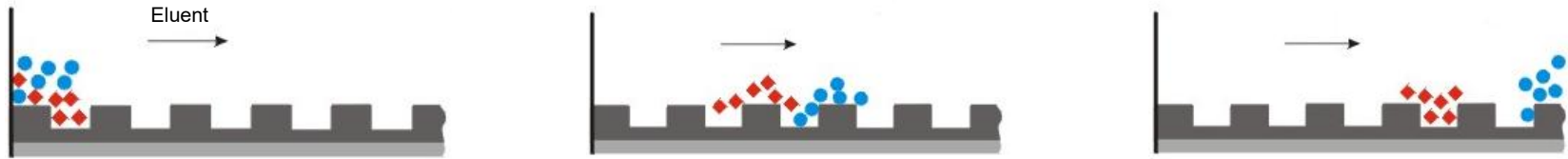
Es war einmal...



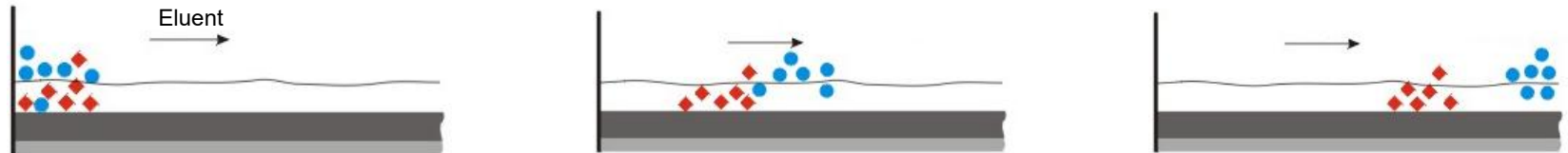
Adsorption / Verteilung

Je nach **Art** der stationären Phase:

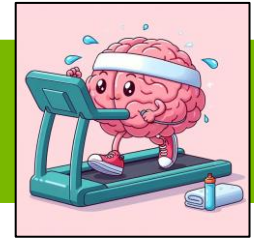
- **Adsorption:** Trennung durch **Wechselwirkung** der **Analyten** mit einer **festen stationären Phase**



- **Verteilung:** Trennung durch **Wechselwirkung** der **Analyten** mit einer **flüssigen stationären Phase**



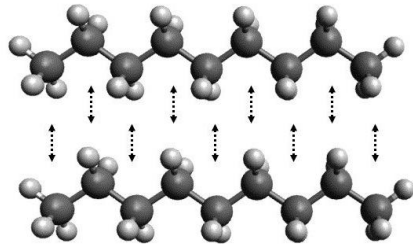
Intermolekulare Wechselwirkungen



Van-der-Waals-Kräfte sind **schwache Wechselwirkungen** zwischen Molekülen

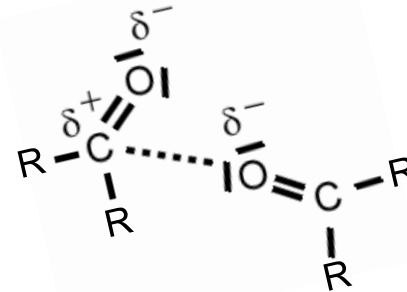
- a) Dispersionskräfte
- b) Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (bei polaren Verbindungen)

a) Dispersionskräfte



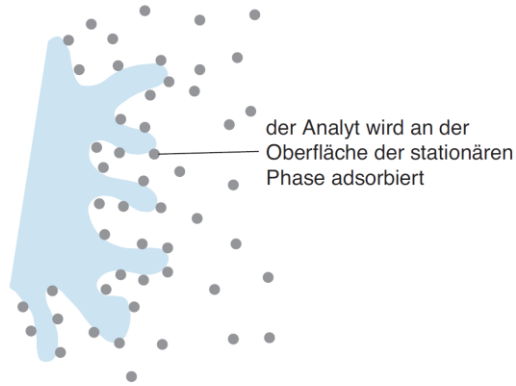
Unpolare Moleküle
(Wechselwirkung zwischen
induzierten Dipolen)

b) Dipol-Dipol-Anziehung



Polare Moleküle
(Wechselwirkung zwischen Dipolen)

Adsorptions-Chromatographie



Adsorptionschromatographie

Lehrbuch der Quantitativen Analyse

Adsorptions-Chromatographie:

Anlagerung eines in der **mobilen Phase** gelösten Stoffes (**Adsorbat**) an eine **feste stationäre Phase** (Adsorbens)

⇒ Je **polarer** ein **Molekül**, desto **stärker** die **Adsorption** an einer **polaren stationären Phase**

⇒ Die **sterische Struktur** und die **Temperatur** beeinflussen die Adsorption!

Wirkende Kräfte bei der Adsorption:

- Dispersionskräfte (induzierte Dipole)
- Dipol-Dipol-Wechselwirkung (permanente Dipole)
- H-Brücken
- π -Komplexbindungen (Koordinationsbindung)

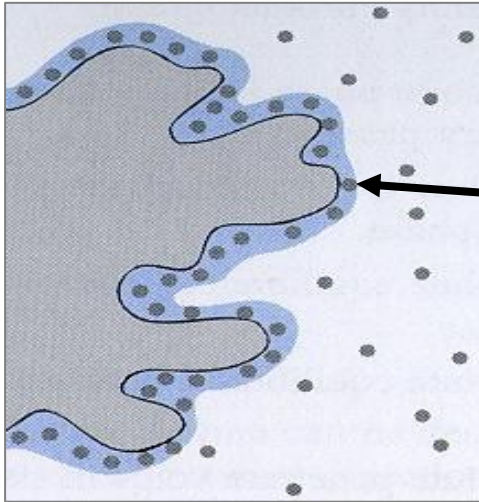


A**bs**orption



A**d**sorption

Verteilungs-Chromatographie



Verteilungs-Chromatographie:

Teilchen in der stationären Phase gelöst!

Die stationäre Phase besteht aus einem viskosen Flüssigkeitsfilm (**Umkehrphasen, z.B. C-18 Säule**)

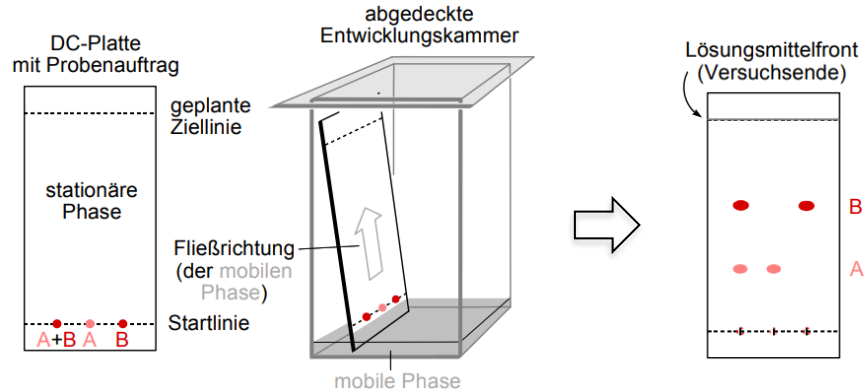
Verteilung der Probe zwischen zwei flüssigen Phasen aufgrund unterschiedlicher **Löslichkeit**

Harris; fig. 16-2, p. 295

Planarchromatographie

Synonyme Planarchromatographie:

- Dünnschichtchromatographie (DC)
- Thin Layer Chromatography (TLC)
- High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)



Entwicklungskammer

Stationäre Phase

Fluoreszenz?



DC-Platten mit stationärer Phase

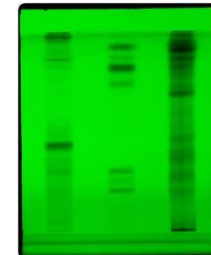
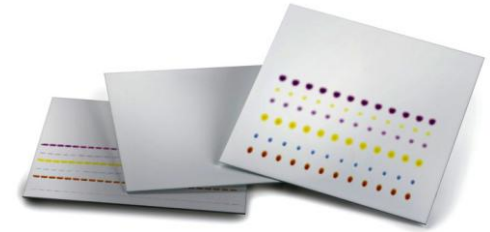
Dünne (0,2 mm) **stationäre Schicht** auf eine **Trägerplatte** aus Glas, Aluminium oder Kunststoff

- **Kieselgel** (amorphe, poröse Form von SiO_2) → zu 90 % verwendet!
- Aluminiumoxid (Al_2O_3)
- Polyamide (Kunststoffe)
- Cellulose

Häufig: Beschichtung mit **UV-Indikator**

⇒ Zinksilikat, aktiviert durch Mangan (F_{254})

⇒ Na-Hydroxypyrensulfonsäure (F_{366})



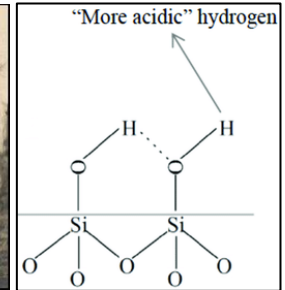
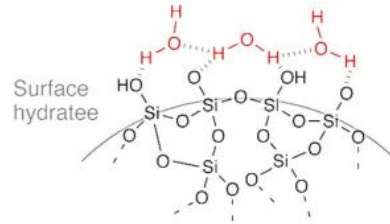
Stationäre Phase

Kieselgel (Silicagel)

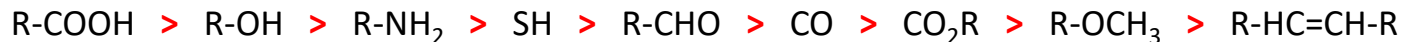
- poröses, amorphes Siliziumdioxid
- große innere Oberfläche
- Einsatz im 1.WK zur Bindung von Dämpfen und Gasen
- leicht sauer (pks ≈ 5)
- stark polar (Silanolgruppen bilden H-Brücken)
- stark hygroskopisch (Trocknungsmittel für Exsikkator)

Achtung: **Wasser** führt durch **Adsorption** zur **Desaktivierung** der Oberflächenstruktur!

- NP-DC geeignet für **mäßig polare Analyten**, die in organischen LM löslich sind (RP-DC für polare Stoffe)



Adsorptionsfähigkeit von funktionellen Gruppen an das Kieselgel:



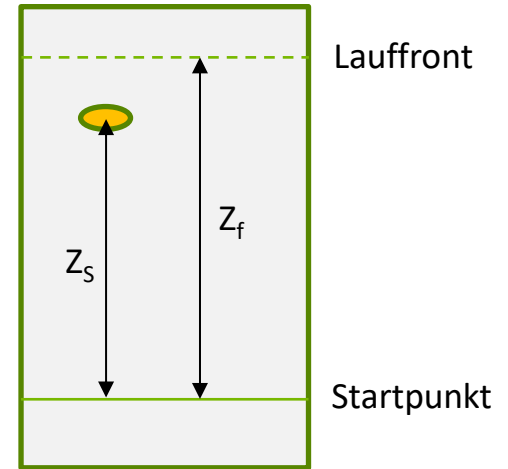
Retentionsfaktor R_f

Retentionsfaktor R_f als Retentionsparameter zur Charakterisierung einer Substanz:

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_f} \Rightarrow R_f \text{ ist immer } \leq 1$$

Z_s Laufstrecke Probenfleck ab Start

Z_f Laufstrecke Fließmittelfront ab Start



Wahl der mobilen Phase

Elutrope Reihe → **Ordnung nach Polarität**

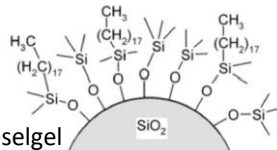
Fähigkeit einen **adsorbierten Stoff** von einer stationären Phase zu lösen (→ Elutionskraft)

Silicagel:

Polarität des LM ↑ → **Elutionskraft** ↑
→ **Geschwindigkeit der Elution** ↑

Umkehrphasenchromatographie (z.B. RP-18)

→ umgekehrte Reihenfolge der elutropen Reihe



C18-alkyliertes Kieselgel

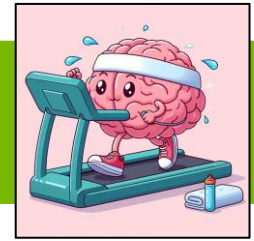
Adsorbens: **Silicagel** bzw. Al_2O_3

Solvent	Eluent strength	Solvent	Eluent strength
Fluoroalkane	-0.25	Tetrahydrofuran	0.45
<i>n</i> -Pentane	0.00	2-Butanon	0.51
<i>i</i> -Octane	0.01	Acetone	0.56
<i>n</i> -Decane	0.04	Dioxane	0.56
Cyclohexane	0.04	Ethyl acetate	0.58
Carbon disulfide	0.15	1-Pentanol	0.61
Carbon tetrachloride	0.18	Dimethyl sulfoxide	0.62
1-Chloropentane	0.26	Nitromethane	0.64
<i>i</i> -Propyl ether	0.28	Acetonitril	0.65
Toluene	0.29	Pyridine	0.71
Chlorobenzene	0.30	2-Propanol	0.82
Benzene	0.32	Ethanol	0.88
Diethyl ether	0.38	Methanol	0.95
Chloroform	0.40	1,2-Ethandiol	1.11
Dichlormethane	0.42	Acetic acid	Large

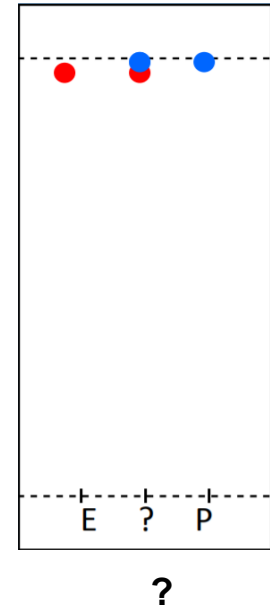
Pentan definiert als 0.00

Harris; table 17-2, page 320

Wahl der mobilen Phase



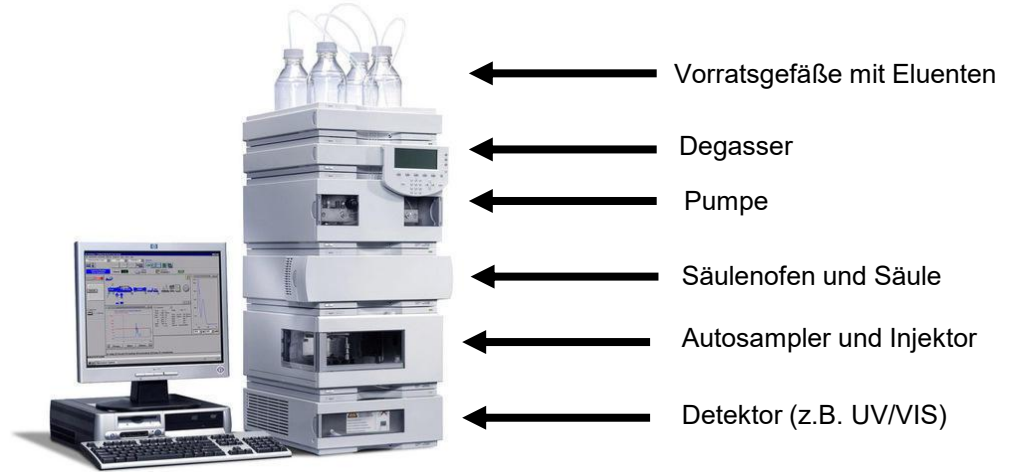
Abstimmung der mobiler Phase für **Normalphasen**:



Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

H High
P Performance/Pressure
L Liquid
C Chromatography

Die Entwicklung der HPLC brachte wesentliche Fortschritte bezüglich der Schnelligkeit, Selektivität, Reproduzierbarkeit, Automatisierbarkeit und des Auflösungsvermögens

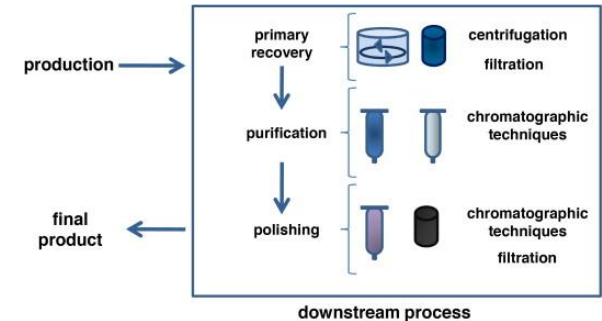


Preis je nach Ausstattung: 30 000 - 150 000 €

Rolle der Chromatographie im Downstream Processing

Rolle der Chromatographie im Downstream Processing

Die **Chromatographie** ist das **zentrale Verfahren** in der **Feinreinigung** (Polishing), insbesondere bei der Herstellung von **Biopharmazeutika** wie monoklonalen Antikörpern, *rekombinanten Proteinen* oder Nukleinsäuren. Sie ermöglicht eine **hochselektive Trennung** basierend auf spezifischen physikochemischen Eigenschaften des Zielmoleküls.



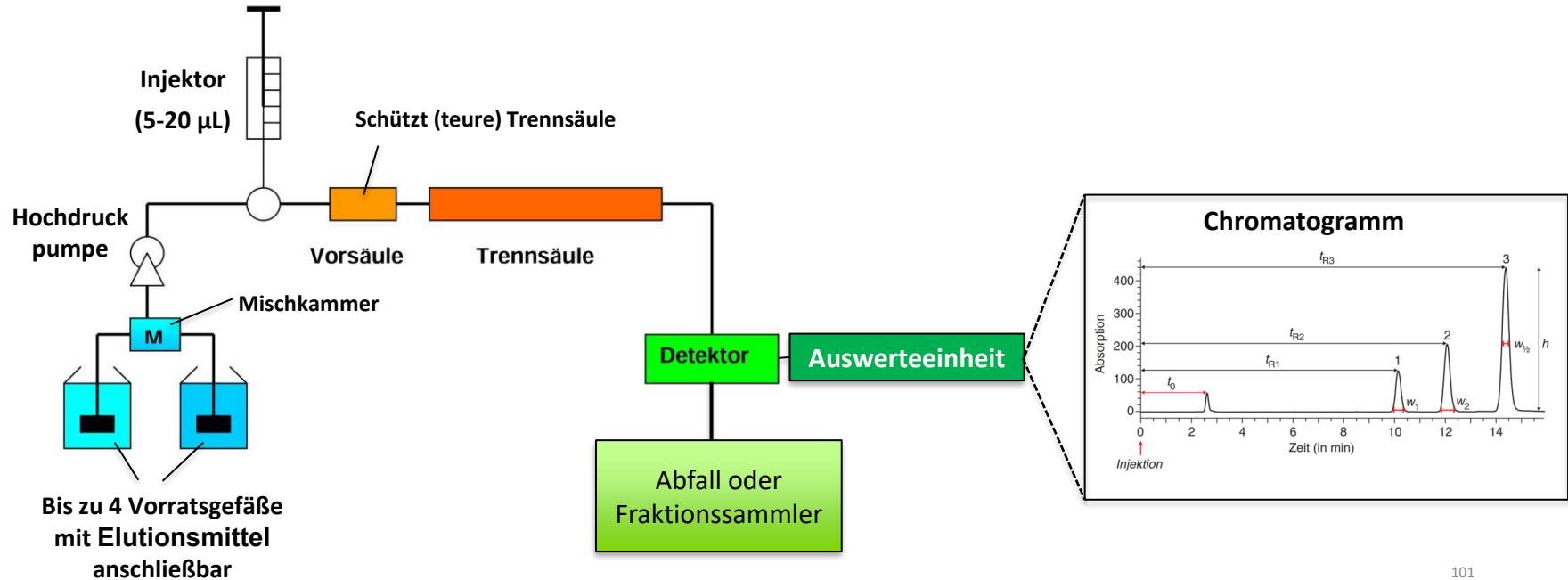
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.008>

Wichtige Chromatographiearten im Downstream Processing sind:

- **Ionenaustauschchromatographie (IEX):** Trennt nach Ladung
- **Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC):** Nutzt hydrophobe Oberflächeninteraktionen
- **Größenausschlusschromatographie (SEC):** Trennt nach Molekülgröße
- **Affinitätschromatographie (AC):** Höchste Selektivität (z.B. Antikörper-Antigen, Substrat-Enzym)

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Chromatograph (ermöglicht Transport der mobilen Phase, Probenaufgabe und Detektion)



Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

HPLC

- **Trennung** flüssiger Substanzgemische in einzelne Komponenten
- **Identifizierung** der Komponenten anhand der Retentionszeit
- **Quantifizierung** der Komponenten (durch Vergleich mit **internen/externen Standards**)

Typisches Einsatzgebiet:

- **Schwer** bzw. nicht-flüchtige Substanzen (flüchtige Substanzen → **Gaschromatographie**)
- **Thermisch instabile**, leicht zersetzbare Substanzen
- Mittelpolare – **polare** oder ionische Verbindungen (da hohe Siedepunkte)
- Substanzen mit rel. **hohem Molekulargewicht** (MW > 500 u)

Chromatogramm

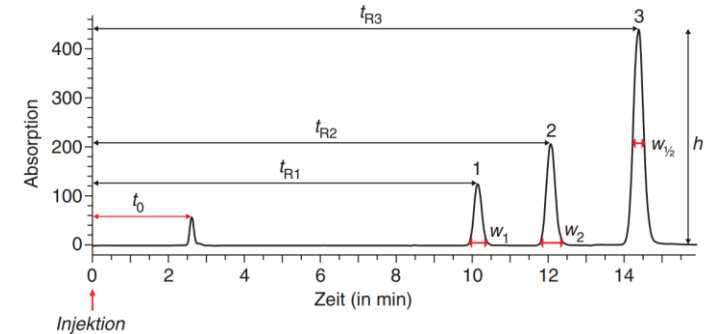
Retentionszeit (t_R): Verweildauer einer Substanz im chromatographischen Trennsystem

Qualitative Information:

Stoffe lassen sich anhand des Vergleichs von Retentionszeiten t_R identifizieren (**Stoffcharakteristikum**)

Quantitative Information:

Peakflächen und **Peakhöhen** sind proportional zur **Konzentration** des Analyten



Chromatogramm

Chromatogramm

Retentionszeit (t_R): Verweildauer einer Substanz im chromatographischen Trennsystem

$$t_R = t_0 + t'_R$$

t_0 : Totzeit

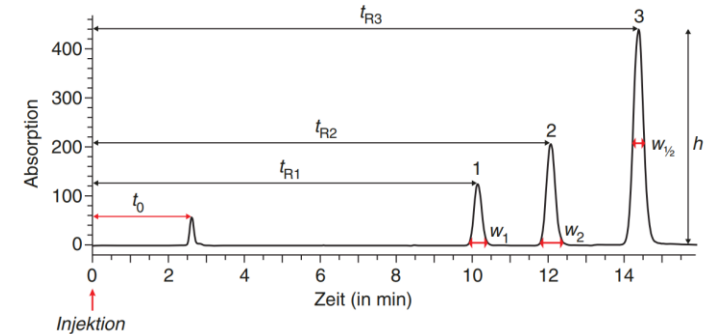
t'_R : Nettoretentionszeit

Totzeit t_0 :

Zeit die eine **nicht retardierte Komponente** benötigt, um das chromatographische System zu durchlaufen

→ Zeit von der Injektion bis zur Detektion

→ Keine chromatographische Wechselwirkung



Chromatogramm

Chromatogramm

Retentionszeit (t_R): Verweildauer einer Substanz im chromatographischen Trennsystem

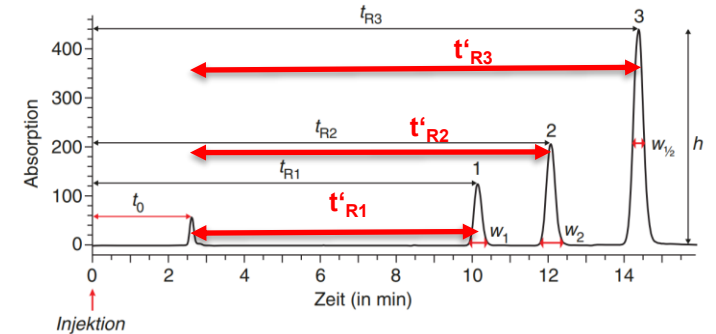
$$t_R = t_0 + t'_R$$

t_0 : Totzeit

t'_R : Nettoretentionszeit

Nettoretentionszeit t'_R :

Zeit, die ein Analyt tatsächlich „in der stationären Phase“ verbringt



Chromatogramm

Strömungsgeschwindigkeit

Die **Strömungsgeschwindigkeit** kann entweder als **Volumengeschwindigkeit F (cm³/min)** oder als **lineare Geschwindigkeit u (cm/s)** angegeben werden.

Lineargeschwindigkeit u:

Geschwindigkeit der mobilen Phase durch die Säule

$$u = \frac{\text{Säulenlänge}}{\text{Zeit}} = \frac{L}{t_m}$$

t_m Durchflusszeit (Totzeit der Säule)

u lineare Strömungsgeschwindigkeit des Eluenten [cm/min]

L Säulenlänge

Praxis: Die Lineargeschwindigkeit der mobilen Phase beträgt ca. **6 cm/min** (für eine Trennsäule mit 4,6 mm Innendurchmesser, bei einer Fließgeschwindigkeit von **1 mL/min**).

Verteilungskoeffizient

Verteilungskoeffizient K:

→ beschreibt das **Verhältnis**, in dem sich ein gegebener **Stoff** zwischen **zwei nicht** mischbaren **Phasen verteilt**

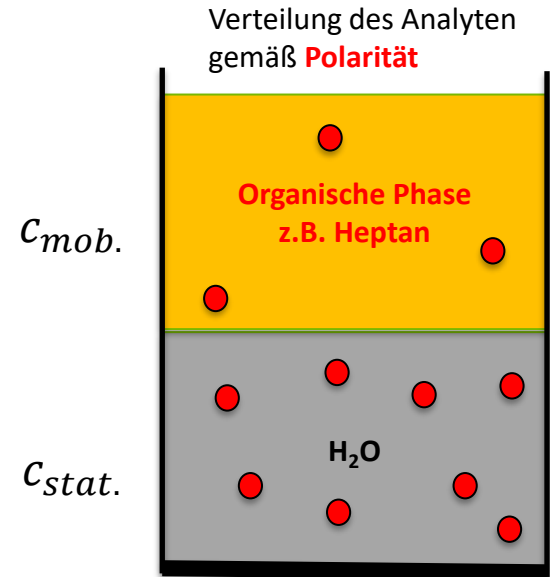
→ Nicht direkt zugänglich

Retentionsfaktor k (früher Kapazitätsfaktor):

→ Aus Chromatogramm bestimmbar!

$$K = \frac{c_{stat.}}{c_{mob.}}$$

$$k = \frac{n_{stat.}}{n_{mob.}}$$



Chromatogramm

Retentionsfaktor k

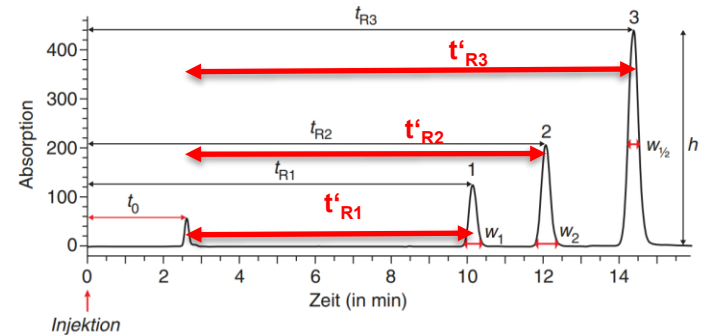
Verhältnis der **Aufenthaltszeiten** eines Probenmoleküls in der **stationären** und **mobilen** Phase

Der Retentionsfaktor kann **aus dem Chromatogramm berechnet** werden:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

t_0 Totzeit
 t_R Retentionszeit
 t'_R Nettoretentionszeit

$$k = \frac{n_{stat.}}{n_{mob.}}$$



Chromatogramm

- Beschreibt (ähnlich zur Retentionszeit) die **Wanderungsgeschwindigkeit** einer Substanz
- **Je länger** eine Komponente auf der Säule verweilt, **desto größer** ist der Retentionsfaktor

Retentionsfaktor k

Retentionsfaktor k:

- Besser geeignet als die Retentionszeit, da **unabhängig** von der **Säulendimension** und **Fließgeschwindigkeit**
- Ändert sich nur, wenn Parameter verändert werden, die die Wechselwirkungen beeinflussen (**stat./mobile Phase, Temperatur**)
- Um zwei Analyten voneinander trennen zu können, müssen sie unterschiedliche Retentionsfaktoren aufweisen
- $k = 0$, wenn $t_R = t_0 \rightarrow$ Analyt hält sich nicht in der stationären Phase auf
- $k = \infty$ bedeutet eine **irreversible Adsorption** des Analyten an die Säule
- $k > 10$: Lange Elutionszeit \rightarrow **Peakverbreiterung** durch Dispersionseffekte im chromatographischen System
- Ideale k-Werte 1-10

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

Retentionsfaktor k

Zusammenhang zwischen Verteilungskoeffizient K und Retentionsfaktor k:

$$K = \frac{c_{stat}}{c_{mob.}} = \frac{n_{stat.} \cdot V_{mob.}}{n_{mob.} \cdot V_{stat.}} = k \cdot \frac{V_{mob.}}{V_{stat.}}$$

$c_{stat} = \frac{n_{stat}}{V_{stat.}}$

$k = \frac{n_{stat}}{n_{mob.}}$

$c_{mob} = \frac{n_{mob}}{V_{mob}}$

\Leftrightarrow

$$k = K \cdot \frac{V_{stat.}}{V_{mob.}}$$

$$k \sim V_{stat.}$$

K Verteilungskoeffizient

k Retentionsfaktor

Relative Retention α

Relative Retention α :

- Beschreibt die **relative Retention** zweier **benachbarter Peaks** zueinander
- **Maß** für die **Selektivität** eines chromatographischen Systems für einen bestimmten Analyten

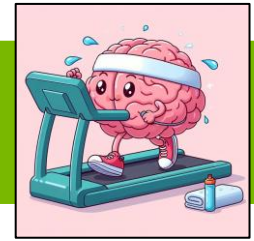
$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

t_R Retentionszeit
 t'_R Nettoretentionszeit
 t_0 Durchflusszeit (Totzeit)
 k Retentionsfaktor
 K Verteilungskoeffizient

- Reihenfolge der Peaks wird so gewählt, dass $\alpha \geq 1$ ist
- Bei $\alpha = 1$ **koeluierten** zwei Substanzen \rightarrow gleiche Retentionszeit
- Optimale Werte: > 1 bis 10
- **Keine Aussage** über die **Güte** der Trennung!
 - \rightarrow Peakform wird nicht berücksichtigt
 - \rightarrow hierfür wird die **Auflösung R** verwendet

Selektivität und Trennleistung

Warum ist die Trennleistung für die Detektion relevant?

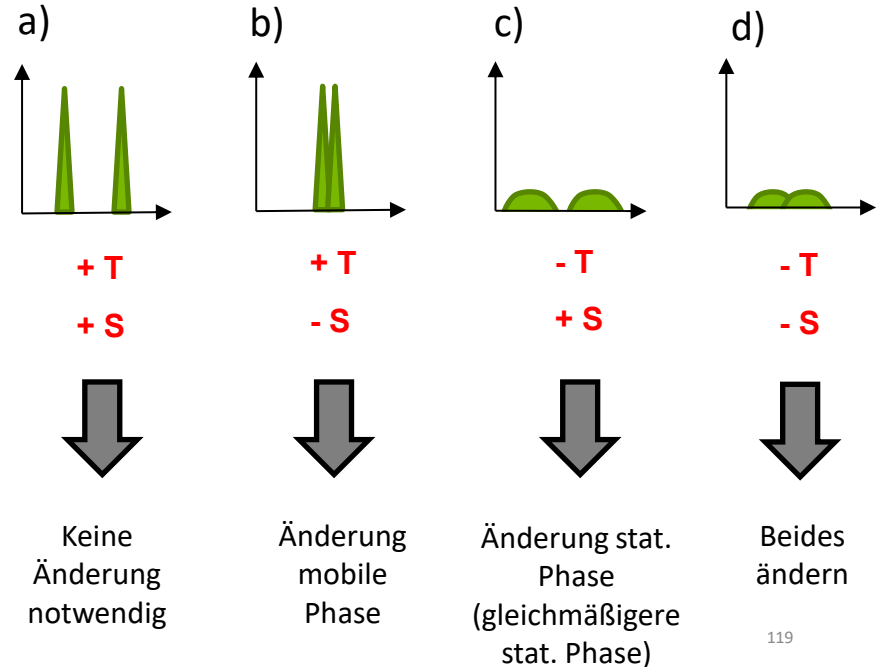


In die **Auflösung** fließt sowohl die **Selektivität** als auch die **Trennleistung** ein

- Die **Trennleistung** ist gut, wenn **scharfe Peaks**
- Die **Selektivität** ist gut, wenn **Peaks getrennt**

Selektiv:

Beschreibt die Fähigkeit eines chromatographischen Systems, zwei Analyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionsfaktoren (k_1 und k_2) zu trennen.



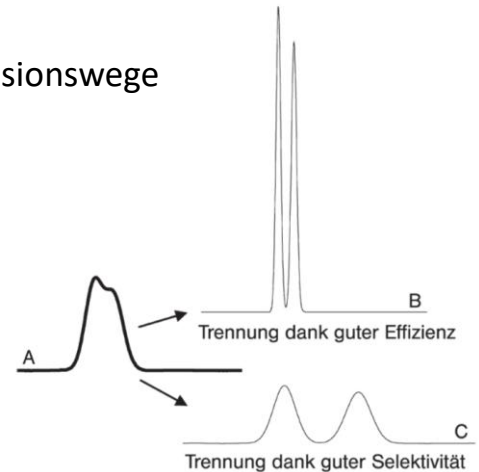
Korn- und Porencharakteristik

Trennleistung (Effizienz):

- Je **schmäler** die **Peaks** desto größer die **Trennleistung**
- **Kleinere Partikel** vergrößern die "wirksame" Oberfläche und verkürzen die Diffusionswege → höhere Trennleistung
- Engere Korngrößenverteilung → höhere Trennleistung

Selektivität:

- Je größer der **Abstand** zwischen zwei Peaks, desto größer die **Selektivität**
- Chemische Beschaffenheit der Oberfläche (Polarität) beeinflusst die Selektivität



Qualität einer Trennung

Auflösung R:

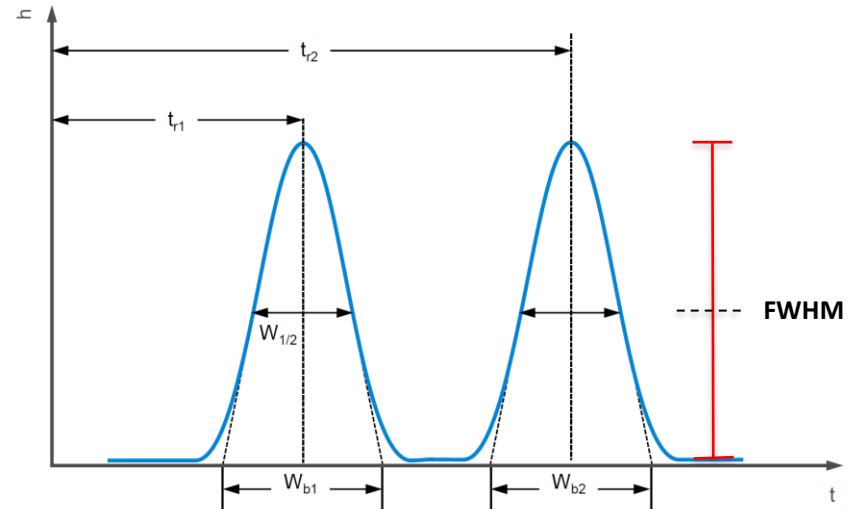
Maß für die **Qualität** einer **Trennung**

$$R = 2 \cdot \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{w_{b,2} + w_{b,1}}$$

w_b : Peakbreite an der Basis
(Schnittpunkt der Wendetangenten mit der Basislinie)
(Für Gaußpeaks entspricht es näherungsweise 4σ)

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{w_{h,2} + w_{h,1}}$$

w_h : Peakbreite auf halber Peakhöhe
(FWHM = Full Width at Half Maximum)



Lehrbuch der Quantitativen Analyse

Chromatographische Auflösung

R = 1,0:

Peaks **nicht vollständig getrennt** (2% Flächenüberlappung)
Erlaubt noch angemessene Quantifizierung (geringer Fehler)

R = 1,25:

Ausreichende Trennung für **quantitative Analyse**
(ohne EDV-Nachbearbeitung des Chromatogramms)

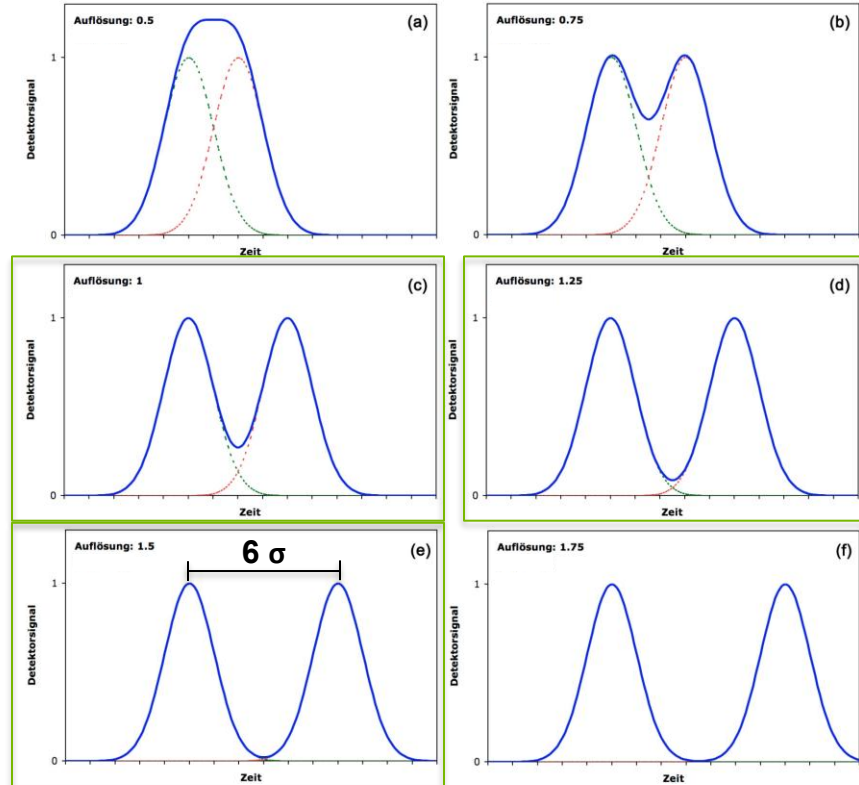
R = 1,5: (6 σ)

Peaks vollständig getrennt = **Basislinientrennung**

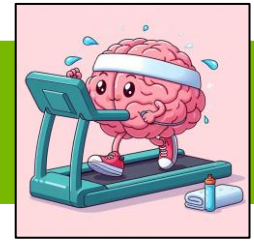
R > 1,5:

Überoptimiertes System

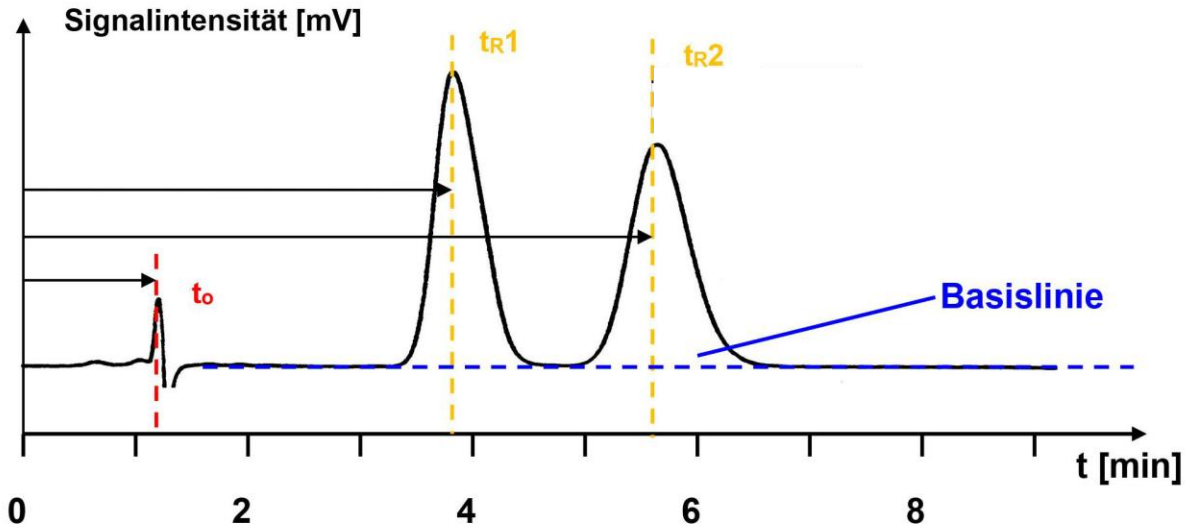
→ sehr gutes Trennergebnis, aber zu **lange Analysenzeiten!**



Übung



Übung: Berechnen Sie die Auflösung:



$$R = 2 \cdot \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{W_{b,1} + W_{b,2}}$$

W_b : Peakbreite an der Basis

$$R = 1,18 \cdot \frac{t_{r,2} - t_{r,1}}{W_{h,2} + W_{h,1}}$$

W_h : Peakbreite auf halber Peakhöhe
(FWHM = Full Width at Half Maximum)

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**.

