



# Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

Prof. Dr. Mircea Tric

SS 2026

# Proteinanalytik

## Trennstrategien in der Proteinanalytik

Proteine werden basierend auf ihren **spezifischen Eigenschaften** getrennt.

Die Trennung erfolgt nach folgenden Kriterien:

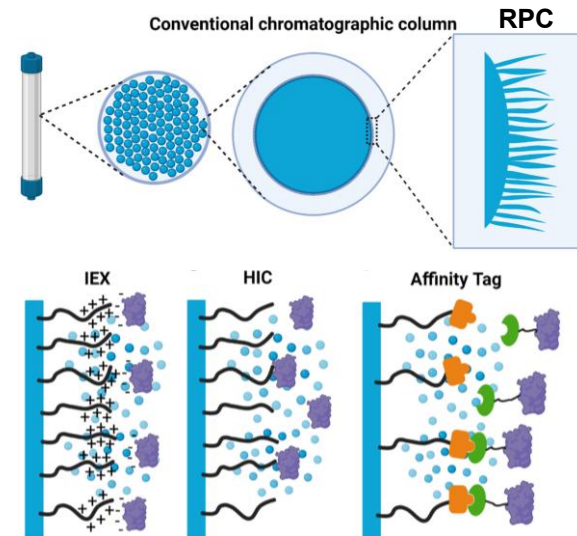
- Hydrophobizität/Polarität: (z. B. Reversed-Phase-Chromatographie, HILIC)
- Ladung: (z. B. Ionenaustauschchromatographie, Isoelektrische Fokussierung)
- Größe/Molekulargewicht: (z. B. Gel-Permeations-Chromatographie, SDS-PAGE)
- Affinität: (z. B. Bindung an spezifische Antikörper oder Liganden)

# Proteinanalytik

Da Peptide und Proteine meistens ausgehend von **komplexen biologischen** Mischungen analysiert werden, sind für ihre Trennung meist **mehrere** chromatographische Schritte notwendig (**multidimensionale HPLC**)

## HPLC-Methoden

- Normalphasen-Chromatographie (**NPC**)
- Reversed-Phase-Chromatographie (**RPC**, meistgenutzte Methode in der Peptid- / Proteinanalyse)
- Ausschlusschromatographie (**SEC**)
- Hydrophile Interaktions-Chromatographie (**HILIC**)
- Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (**HIC**)
- Ionenaustausch-Chromatographie (**IEX**)
- Affinitäts-Chromatographie (**AC**)



# Proteinanalytik

## Wahl der chromatographischen Methode in der Proteinanalytik

- Physiko-chemischen Charakteristika der zu analysierenden Peptide / Proteine

→ **Primär- und Sekundärstruktur** (Sequenz und lokale räumliche Anordnung)

- **Polarität (HILIC, RPC, HIC)**
- **Ladung (IEX)**

→ **Tertiärstruktur** (Faltung)

- **Größe**

Tab. 11.2 Chromatographische Trennmethode für Peptide und Proteine

Trennmethode	Abkürzung	Ausgenutzte Moleküleigenschaft
Ausschlusschromatographie	SEC oder GPC	Größe, hydrodynamisches Volumen
Reversed-Phase-Chromatographie	RPC	Hydrophobizität
Normalphase-Chromatographie	NPC	Polarität
hydrophile Interaktionschromatographie	HILIC	Hydrophilizität
Aqueous-Normalphase-Chromatographie	ANPC	Hydrophilizität
hydrophobe Interaktionschromatographie	HIC	Hydrophobizität
Anionenaustauschchromatographie	AEX	negative Ladung
Kationenaustauschchromatographie	CEX	positive Ladung
Affinitätschromatographie	AC	Biospezifität
Metallchelatchromatographie	IMAC	Komplexierung
Immuno-Affinitätschromatographie	IAC	Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen

# Normalphase (NPC) vs Umkehrphase (RPC)

## Normalphasen-Chromatographie (NPC):

- **Stationäre Phase:** polarer als die mobile Phase
- **Mobile Phase:** eher unpolare (z.B. Hexan/Ethylacetat)
- Elutionsreihenfolge: Unpolare Stoffe zuerst
- Elutionskraft nimmt mit der Polarität der mobilen Phase zu
- **Lipidanalytik** (die meisten anderen Bioanalyten sind in **unpolaren** Lösungsmitteln nicht löslich → RPC oder HILIC)

## Umkehrphasen-Chromatographie (RPC):

- **Stationäre Phase:** unpolar
- **Mobile Phase:** polar (z.B. Wasser/Methanol ; Wasser/Acetonitril)
- Elutionsreihenfolge: Polare Stoffe zuerst
- Elutionskraft nimmt mit **sinkender** Polarität der mobilen Phase zu
- Für **polare** und **unpolare Analyten** einsetzbar (Goldstandard für die **Proteinanalyse**)

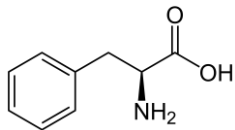
# Chromatographische Trennung von Peptiden/Proteinen

## Proteinanalytik mittels RP-Chromatographie (RPC)

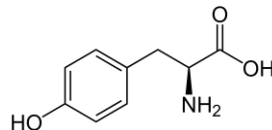
Die **AS-Sequenz** beeinflusst die Wahl des Eluenten bzw. Gradienten

Der Retentionsfaktor kann mit Hilfe der Tabelle abgeschätzt werden.

Je **positiver** der Zahlenwert für die relative **Hydrophobizität** desto **hydrophober** die Aminosäure



Phenylalanin  
(Phe)



Tyrosin (Tyr)

Tab. 11.1 Eigenschaften der häufigsten L- $\alpha$ -Aminosäuren und der terminalen Gruppen

Drei-Buchstaben-Abkürzung	Ein-Buchstaben-Symbol	Monoisotopische Masse (amu)	Partialspezifisches Volumen <sup>1</sup> (in Å <sup>3</sup> )	Verfügbare Oberfläche <sup>2</sup> (in Å <sup>2</sup> )	pK <sub>s</sub> der Seitenketten <sup>3</sup> bzw. Termini <sup>4</sup>	Relative Hydrophobizität <sup>5</sup>
Ala	A	71,03711	88,6	115		0,06
Arg	R	156,10111	173,4	225	12,48	-0,85
Asn	N	114,04293	117,7	160		0,25
Asp	D	115,02694	111,1	150	3,9	-0,20
Cys	C	103,00919	108,5	135	8,37	0,49
Gln	Q	128,05858	143,9	180		0,31
Glu	E	129,04259	138,4	190	4,07	-0,10
Gly	G	57,02146	60,1	75		0,21
His	H	137,05891	153,2	195	6,04	-2,24
Ile	I	113,08406	166,7	175		3,48
Leu	L	113,08406	166,7	170		3,50
Lys	K	128,09496	168,6	200	10,54	-1,62
Met	M	131,04048	162,9	185		0,21
Phe	F	147,06841	189,9	210		4,80
Pro	P	97,05276	122,7	145		0,71
Ser	S	87,03203	89,0	115		-0,62
Thr	T	101,04768	116,1	140		0,65
Trp	W	186,07931	227,8	255		2,29
Tyr	Y	163,06333	193,6	230	10,46	1,89
Val	V	99,06841	140,0	155		1,59
$\alpha$ -Amino					7,7-9,2	
$\alpha$ -Carboxy					2,75-3	

# Umkehrphasenchromatographie

## Reversed Phase Chromatographie (RPC):

- **Methode der Wahl** für biotechnologische Problemstellungen (**Proteinanalytik**)
- Trennung der Analyten nach ihrer relativen **Hydrophobizität**
- **mobile Phase: Puffer** mit **polarem organischem** Lösungsmittelanteil (Methanol, Acetonitril, Propanol, THF)  
→ Anteil org. Lösungsmittel wird während der Elution kontinuierlich erhöht

## Typische Modifikationen der Säulen-Oberfläche:

- C 4-Alkyl („Butyl“) → RP-4
- C 8-Alkyl („Octyl“) → RP-8, OS (Octasilan)
- C18-Alkyl („Octadecyl“) → RP-18, ODS (Octadecylsilan) (am häufigsten verwendet)
- Phenyl-Gruppen

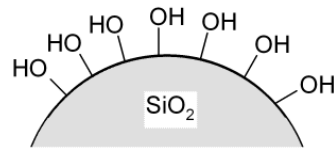
Mit zunehmender **Kettenlänge** wird die stationäre Phase unpolarer

→ Phaseneigenschaften können „**maßgeschneidert**“ werden

# Derivatisierung

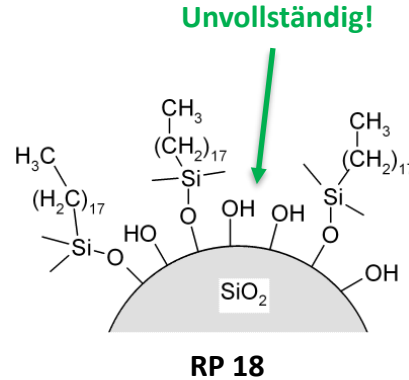
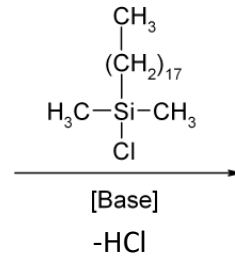
## Funktionalisierung der Silanolgruppen des Silicagels:

→ Je länger die C-Kette, desto unpolarer ist die Oberfläche!



Kieselgel, unmodifiziert

### Silylierung mit Chlorsilanen



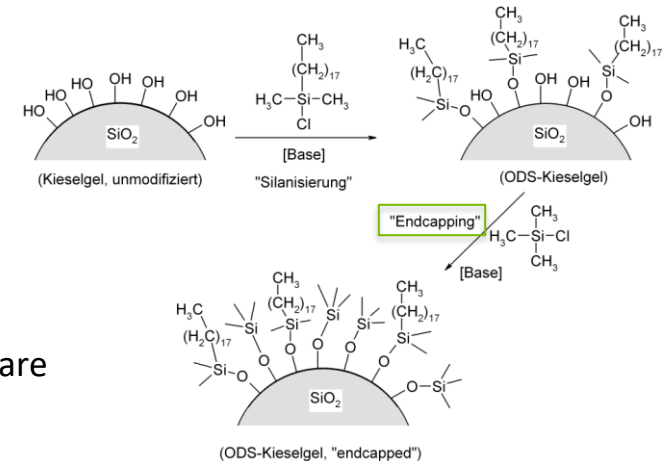
# Endcapping

## Problem:

- Silylierung ist nicht vollständig → wegen **Sterik** nur ca. 50 % mit Alkylgruppen (C18) besetzt
- **OH-Gruppen** bleiben erhalten und wirken bei kleinen Analytmolekülen weiterhin als **polare Wechselwirkungsstellen** → beeinflussen die Chromatographie

## Endcapping:

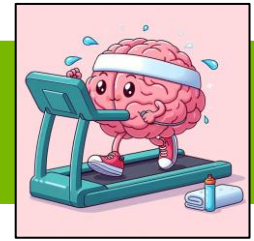
- Umwandlung der verbleibenden polaren Gruppen in unpolare **Silylether** durch **Trimethylchlorsilan (TMCS)**
  - Verbessert die Selektivität
  - Schützt vor irreversibler Adsorption
  - Verbessert pH-Beständigkeit von RP-Phasen (pH 1-12)



Octadecyldimethylsilyl-Gruppen

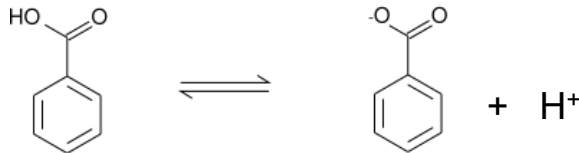
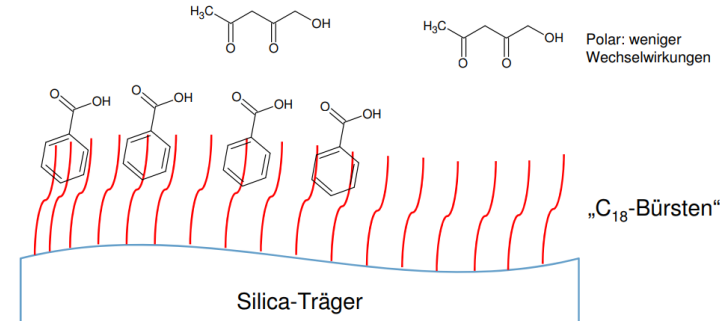
# Umkehrphasenchromatographie

Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase beruhen auf?



## RP-18-Säule:

- Starke **Wechselwirkung** mit **unpolaren Analyten**
- Trennung aufgrund von Unterschieden in der **Hydrophobizität** der Analyten
- Mobile Phase ist polar (z.B. Puffer)
- Einfluss des **pH-Werts** auf die Hydrophobizität der mobilen Phase ist zu beachten!



# Umkehrphasenchromatographie

## Trennmechanismus RPC:

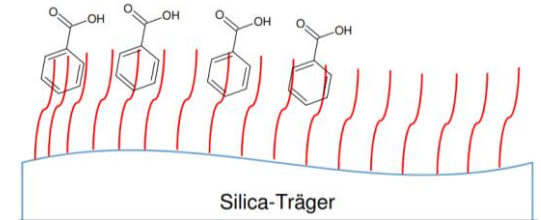
### **Kombination** aus **Adsorption** und **Verteilung**

Additive (z.B. **Ameisensäure**) eingesetzt, um den pH-Wert niedrig zu halten

- Kontrolle der **Ionisierung** der Analyten
  - freistehende **Silanolgruppen** bleiben protoniert
- **schärfere/symmetrischere Peaks**

## Verteilungsmodell:

- Oberfläche der stationären Phase verhält sich wie eine **flüssige stationäre Phase**
- Substanzmoleküle von unpolaren Alkylresten umgeben („gelöst“)
- Mit **zunehmender Alkylkettenlänge** der RP-Phase steigt der **Verteilungscharakter** der Trennung
- Mit abnehmender Kettenlänge dominiert der Adsorptionsmechanismus



# Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

## Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

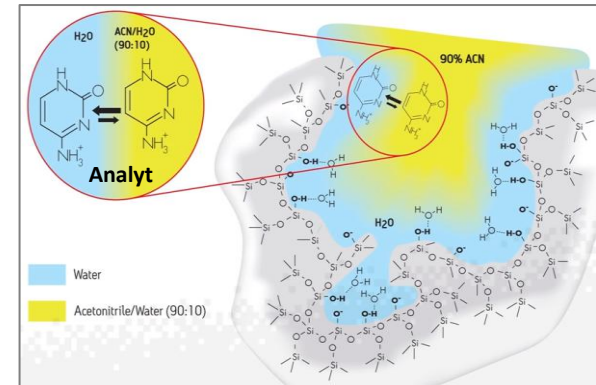
# Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

Biomoleküle (Proteine, Glykane, Nukleotide, Metabolite) sind meist **polar / geladen**

→ NPC **nicht** geeignet → mobile Phase aus **unpolaren** Lösungsmitteln besteht (→ **Löslichkeitsproblem**)

## Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

- Variante der NPC (Normalphasen-Chromatographie)
- Trennung der Analyten gemäß **Hydrophilie**
- Sehr **polare/geladene Analyten**, z.B. Oligosaccharide (**Glykane**)
- **Adsorbierte Wasser- / Pufferschicht** auf der stationären Phase (z.B. Diol- oder Amino-Phasen → stark **hydratisiert**)
- **Verteilungschromatographie** in der mobilen Phase zwischen extrem polaren und weniger polaren Anteilen
- **Polare Verbindungen** werden stark **retardiert**
- Unpolare Verbindungen erfahren eine geringere Retention (**Elutionsreihenfolge** wie in der **NPC**)



z.B. Acetonitril und Wasser im Verhältnis von 9:1

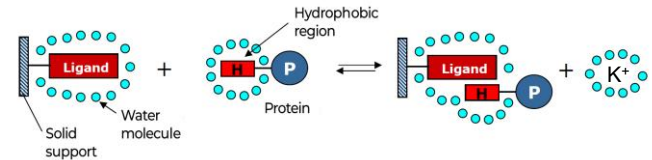
# Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

## Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

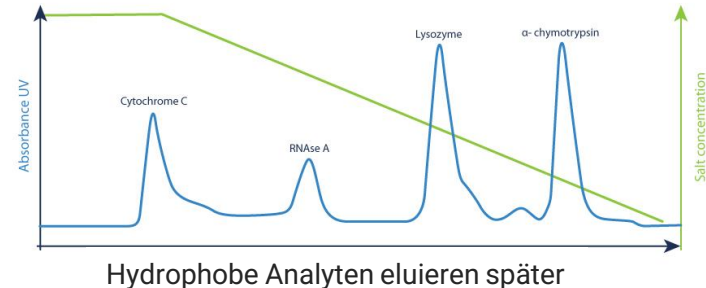
# Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

## Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)

- Trennung anhand der **Hydrophobizität**, aber Erhalt der biologischen **Aktivität** und Tertiärstruktur
- stationäre Phase **weniger hydrophob** als bei **RPC** (z.B. C4 statt C18)
- **Mobile Phase** mit sehr hoher **Salzkonzentration** (z.B.  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ )
- Salz entzieht der Proteinoberfläche die Hydrathülle
- hydrophobe Bereiche des Proteins interagieren mit schwach hydrophober Säule („Salting-out“ Effekt)
- **Salzhaltiger Puffer** fördert die Bindung von Biomolekülen an die HIC-Säule und stabilisiert gleichzeitig die Struktur des Proteins
- Elution durch **Verringerung der Salzkonzentration**



Hydrophobe Regionen des Proteins interagieren mit hydrophober stat. Phase.



# Ionen(austausch)chromatographie

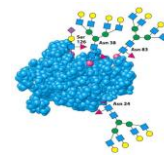
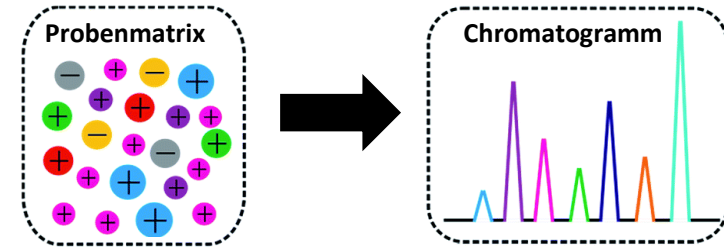
## Ionen(austausch)-Chromatographie

# Anwendung

## Ionen(austausch)-Chromatographie:

Methode zur Trennung und Bestimmung von **geladenen Molekülen** und Ionen

- Hohe Empfindlichkeit → **Spurenanalytik** (LOQ: ppb, d.h.  $\mu\text{g/L}$ )
- Hoher Automatisierungsgrad
- Wichtigste **Anwendungsgebiete:**
  - Umweltanalytik (z.B. Abwasseranalytik)
  - Qualitätskontrolle (z.B. Mineralwasser)
  - **Aufreinigung** von **Proteinen** und **Proteinanalytik**
  - Glykanalytik (→ Sialinsäure)



Glycoprotein



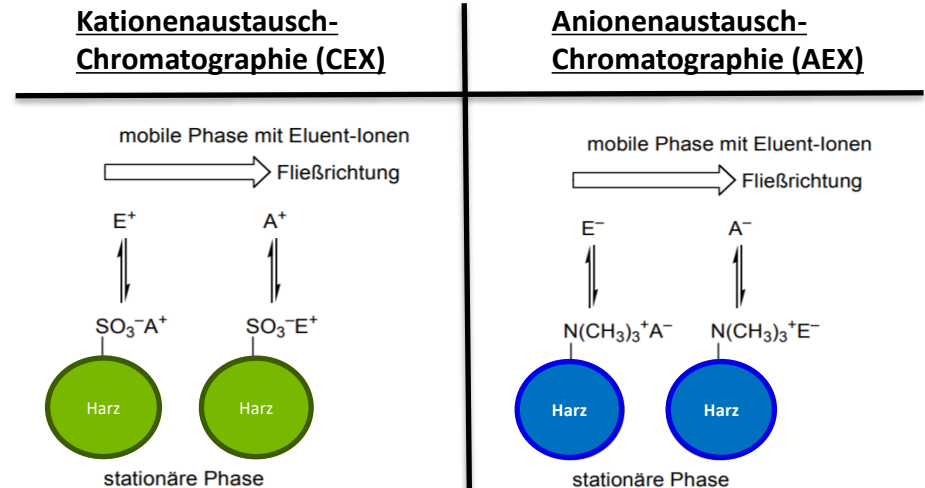
# Arten von Ionenaustauschern

Trennung der Analytionen aufgrund der unterschiedlichen **elektrostatischen Wechselwirkung** mit der komplementär geladenen Oberfläche der **stationären Phase**.

Es werden **zwei verschiedene Typen** von Ionenaustauschern unterschieden:

## Ionenaustausch:

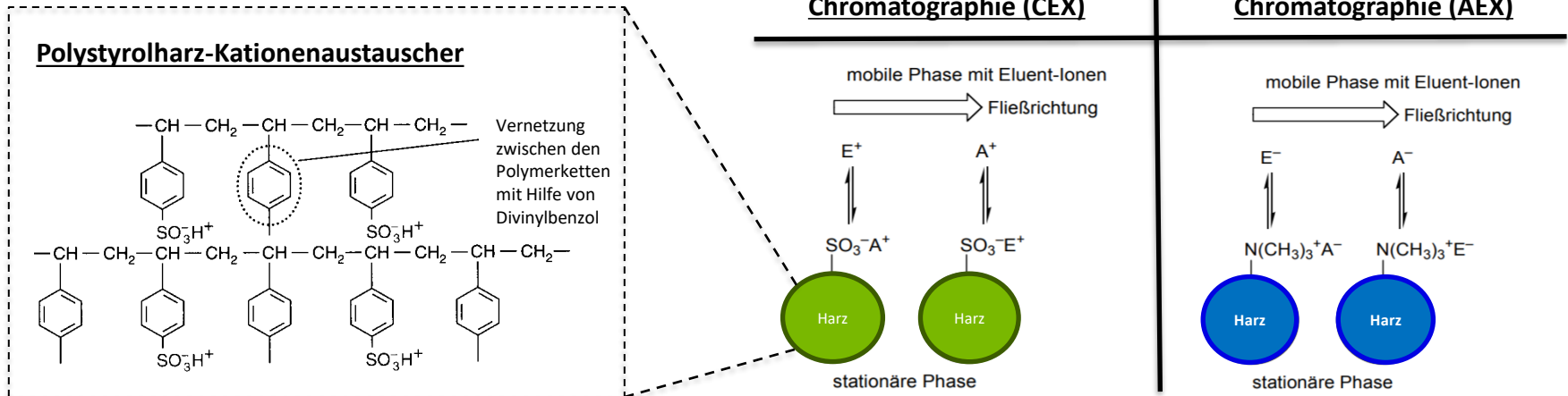
**Analytion (A)** konkurriert mit **Elution (E)** der mobilen Phase um Bindungsstellen



# Arten von Ionenaustauschern

## Stationäre Phase:

Polystyrol-Harz ist **unpolar** und **stabil** gegenüber mobilen Phasen mit pH 1-13



# Ionenaustausch-Chromatographie für Proteine

## **Ionenaustausch-Chromatographie für Proteine:**

Proteine sind je nach pH-Wert ihrer Umgebung geladen

- Niedriger pH-Wert: Proteine tragen eine positive Nettoladung
- Hoher pH-Wert: Proteine tragen eine negative Nettoladung

Am isoelektrischen Punkt ( $\text{pH} = \text{pI}$ ) sind die positiven und negativen Ladungen ausgeglichen

Proteine haben eine einzigartige Aminosäuresequenz

→ charakteristischer **Ionisationszustand** und **pI-Wert**

→ ermöglicht eine proteinspezifische Trennung

# Ionenaustausch-Chromatographie für Proteine

## Anionenaustausch-Chromatographie (AEX):

- Trennung von Peptiden/Proteinen nach ihrer **negativen Nettoladung**
- Mobile Phase: Wässrig, niedrige Salzkonzentration, **hoher pH-Wert**
- **Elution** durch Erhöhung der **Salzkonzentration** oder Erniedrigung des **pH-Werts** (→ Protonierung der Analyten)

## Kationenaustausch-Chromatographie (CEX):

- Trennung von Peptiden/Proteinen nach ihrer **positiven Nettoladung**
- Mobile Phase: Wässrig, niedrige Salzkonzentration, **niedriger pH-Wert**
- **Elution** durch Erhöhung der **Salzkonzentration** oder Erhöhung des **pH-Werts** (→ Deprotonierung)

# Ionenaustausch-Chromatographie für Proteine

## Ablauf einer Trennung

**Äquilibrieren:** Die Säule wird mit einem Puffer bei einer bestimmten **pH-Wert-** und **Ionenstärke** eingestellt

**Probenauftrag:** Proteine **interagieren** mit dem Harz basierend auf ihrer Ladung

- **Anionenaustauschchromatographie (AEX):** Negativ geladene Moleküle binden an das positiv geladene Harz
- **Kationenaustauschchromatographie (CEX):** Positiv geladene Moleküle binden an das negativ geladene Harz

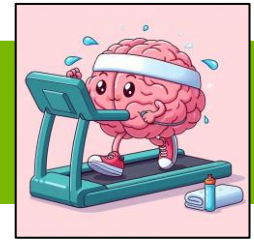
**Waschen:** Ungebundene oder schwach gebundene Moleküle werden ausgewaschen

**Elution:** Gebundene Moleküle werden eluiert durch

- **Erhöhung** der **Salzkonzentration** (z. B. NaCl) → Salzionen **konkurrieren** um Bindungsstellen
- **Änderung** des **pH-Werts** → verändert die Nettoladung des Analyten und **verringert** die Affinität

# Arten von Ionenaustauschern

Was macht einen Ionenaustauscher stark?



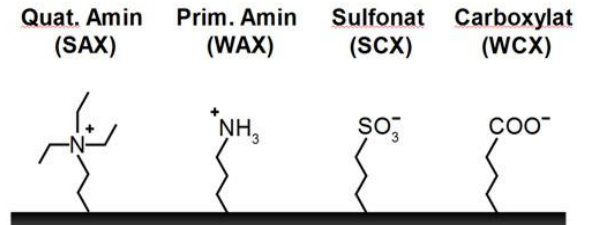
AEX und CEX werden weiter unterteilt in:

**SCX** starker Kationaustauscher (**Strong Cation Exchanger**)

**WCX** schwacher Kationaustauscher (**Weak Cation Exchanger**)

**SAX** starker Anionenaustauscher (**Strong Anion Exchanger**)

**WAX** schwacher Anionenaustauscher (**Weak Anion Exchanger**)



# Kationenaustauscher

Oberflächengruppen müssen in **ionischer Form** bleiben, sonst findet kein Ionenaustausch statt!

## a) Kationenaustauscher

- **starke Kationenaustauscher:**

funktionelle Gruppe: **Sulfonat**  $R-SO_3^-$  ( $R-SO_3H$ :  $pK_s = 1$ )

Arbeitsbedingungen: Pufferlösungen mit **pH  $\geq 3$**

→ Große Vorteile für Proteinanalytik, da die negative Ladung der Sulfonat-Gruppe über einen großen pH-Bereich erhalten bleibt

- **schwache Kationenaustauscher:**

funktionelle Gruppe: **Carboxylat**  $R-COO^-$  ( $R-COOH$ :  $pK_s = 5-6$ )

Arbeitsbedingungen: Pufferlösungen mit **pH  $\geq 7 - 8$**

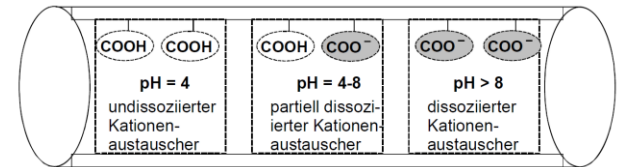
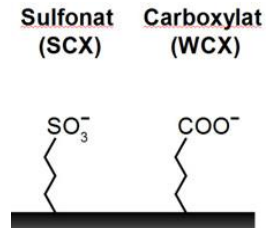


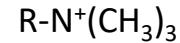
Abb. 5.5 Schematische Darstellung der Ladungsverhältnisse eines schwach sauren Kationenaustauschers in Abhängigkeit vom pH-Wert

# Arten von Ionenaustauschern

## b) Anionenaustauscher

- starke Anionenaustauscher:

funktionelle Gruppe: **Quartäre Alkylammoniumgruppe**



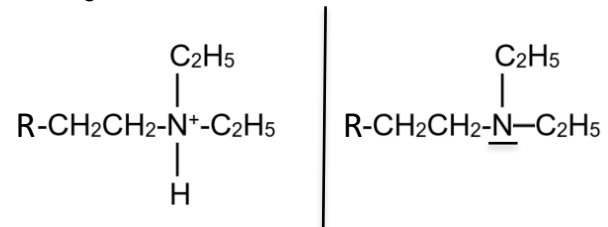
Arbeitsbedingungen: Pufferlösungen mit  $\text{pH} \leq 9$

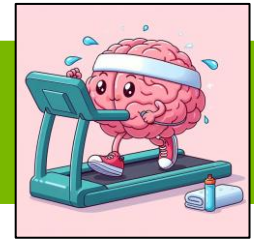
- schwache Anionenaustauscher:

funktionelle Gruppe: protonierte **tertiäre Ammoniumgruppe**

( $\text{pK}_s$  tert. Amin: 9 - 10)

Arbeitsbedingungen: Pufferlösungen mit  $\text{pH} \leq 6 - 7$





## Einfluss der Trennparameter:

- Eine **Erhöhung** der **Ionenstärke**  $I$  der mobilen Phase ..... die **Retentionszeiten** der zu trennenden Analyten
- Starke Kationenaustauscher: Eine **Erhöhung** des **pH-Werts** der mobilen Phase ..... die **Retentionszeiten** von Proteinen
- Schwache Kationenaustauscher: Eine **Erhöhung** des **pH-Werts** der mobilen Phase ..... die **Retentionszeiten** von Kationen (z.B.  $K^+$ )
- Starke Anionenaustauscher: Eine **Erniedrigung** des **pH-Werts** der mobilen Phase ..... die **Retentionszeiten** von Proteinen
- Schwache Anionenaustauscher: Eine **Erniedrigung** des **pH-Werts** der mobilen Phase ..... die **Retentionszeiten** von Anionen (z.B.  $Cl^-$ )

# 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**.

