

Instrumentelle Bioanalytik

Trennverfahren

Prof. Dr. Mircea Tric

SS 2026

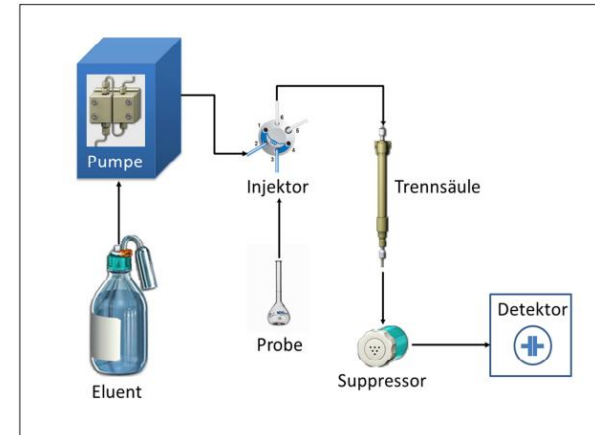
Aufbau eines Ionenchromatographs

Ionenchromatographie

Ionenchromatographie (IC) ist für die quantitative Analyse von **anorganischen Ionen** sowie kleiner **organischer Ionen** (z.B. organische Säuren, Amine) optimiert.

Aufbau Ionenchromatograph:

- Eluenten im Vorratsbehälter werden mit einer **Pumpe** gefördert
- Injektor mit Probenschleife (5-100 μL)
- Trennsäule aus Polymermaterialien (\varnothing 1-4,6 mm und 5-25 cm Länge, **thermostatisiert**)
- **Suppressor** nach der Trennsäule
- **Detektor**
 - Leitfähigkeitsdetektor
 - Spektroskopische Detektion
 - Amperometrische Detektion
 - Fluoreszenz-Detektion

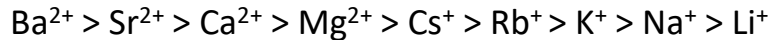


Wechselwirkung mit der stationären Phase

Starke Wechselwirkung mit stationärer Phase, wenn

- Hohe Ladung des Ions
- Kleiner Ionenradius (inkl. Hydrathülle)

Bindungsaffinität zum Kationenaustauscher:

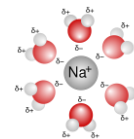
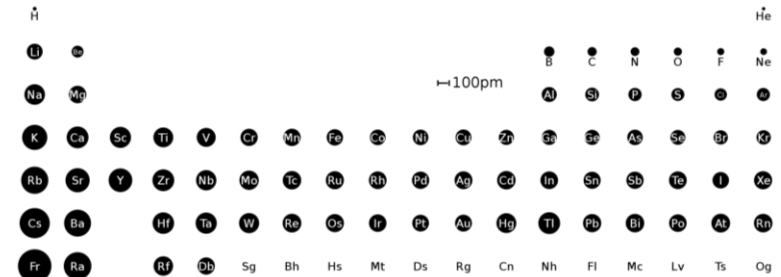


Je größer die **Ladungsdichte**, desto stärker ist das **elektrische Feld** → größere Hydrathülle

→ größerer Abstand zur Säule

→ geringere elektrostatische Anziehung (vgl. Coulombsches Gesetz)

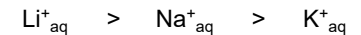
Atomgröße



Ionenradius ohne Hydrathülle:



Ionenradius mit Hydrathülle:



Trennprozess

Analyten:

- Negative Analyten (z.B. Cl^- , NO_3^-) → Anionenaustauscher verwenden
- Positive Analyten (z.B. Na^+ , Mg^{2+}) → Kationenaustauscher verwenden

Trennprozess:

- **Konkurrenz** um **Bindungsplätze**

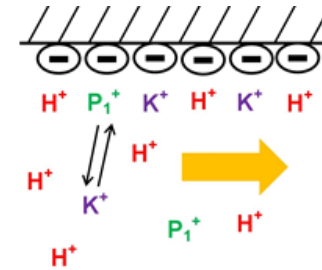
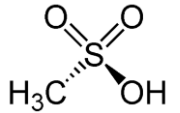
Selektivität abhängig von der Ladungsdichte:

- Ladung: Je höher die Ladung desto höher die Bindungsstärke
- Größe inkl. der Hydrathülle: Je größer, desto schwächer die Bindung

Typische Eluenten:

→ $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ oder KOH

→ **Verdünnte HCl** oder
Methansulfonsäure (MSA)



Retention

Retentionszeit hängt ab von:

- **Ladung** und **Größe** des Analyten
- Bindungsstärke des Ionenaustauschers (Art der **funkt. Gruppen** an stat. Phase)
- **pH-Wert** der mobilen Phase
- **Gegenion** der mobilen Phase (Ladung und Größe)
- **Ionenstärke:**

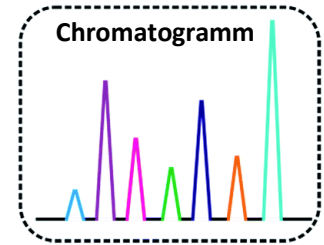
Erhöhung der **Ionenstärke** I der mobilen Phase **verkleinert** die **Retentionszeiten**
(→ hohe **Konkurrenz** um freie Plätze an stat. Phase)

Höhere Ionenstärke:

→ höhere Konzentration der Ionen

→ höhere Ladung

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i$$

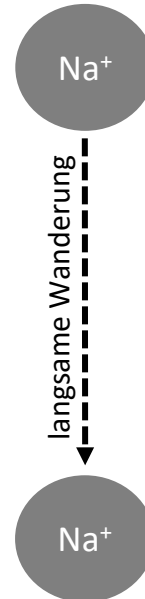
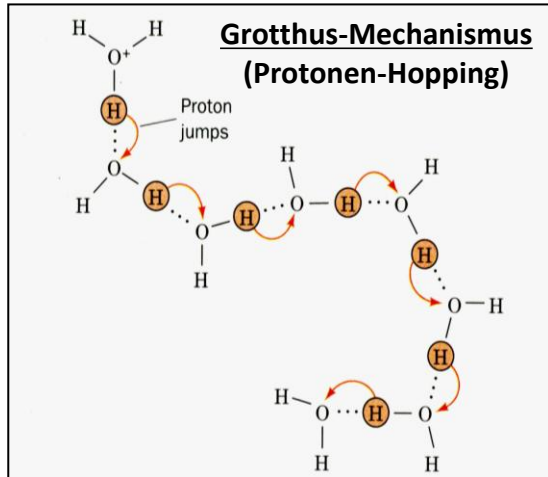


Detektion

Leitfähigkeitsdetektion:

Mobile Phase (z.B. $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, KOH , verd. HCl) besitzt eine **hohe Grundleitfähigkeit** (Hintergrund)

→ geringe Empfindlichkeit (SNR) ☹️



Molare Leitfähigkeit

Kation	λ ($\text{cm}^2/\Omega\cdot\text{mol}$)	Anion	λ ($\text{cm}^2/\Omega\cdot\text{mol}$)
H_3O^+	350	OH^-	198
Li^+	39	F^-	54
Na^+	50	Cl^-	76
K^+	73	Br^-	78
NH_4^+	73	I^-	77
$\frac{1}{2} \text{Mg}^{2+}$	53	NO_2^-	72
$\frac{1}{2} \text{Ca}^{2+}$	60	NO_3^-	71
$\frac{1}{2} \text{Sr}^{2+}$	59	$\frac{1}{2} \text{CO}_3^{2-}$	72
$\frac{1}{2} \text{Ba}^{2+}$	64	$\frac{1}{3} \text{PO}_4^{3-}$	69
		$\frac{1}{2} \text{SO}_4^{2-}$	80

Instrumentelle Analytik und Bioanalytik

Eliminierung der Grundleitfähigkeit

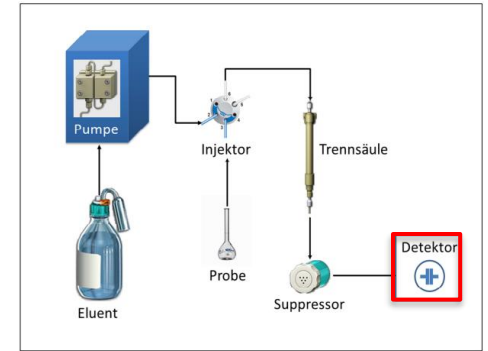
Eliminierung der Grundleitfähigkeit in der mobilen Phase:

- a) elektronische Unterdrückung
- b) chemische Unterdrückung

a) Elektronische Unterdrückung der Grundleitfähigkeit:

Die **Eigenleitfähigkeit** des Eluenten quantitativ elektronisch **erfasst** und bei den anschließenden Analysenläufen **herausgerechnet** (erfordert eine sehr gute **Thermostatisierung** des Trennsystems)

- Kein zusätzliches Totvolumen durch eine Suppressorsäule
- Aber etwas **höheres Rauschen** und damit eine schlechtere **Nachweisempfindlichkeit**



Eliminierung der Grundleitfähigkeit

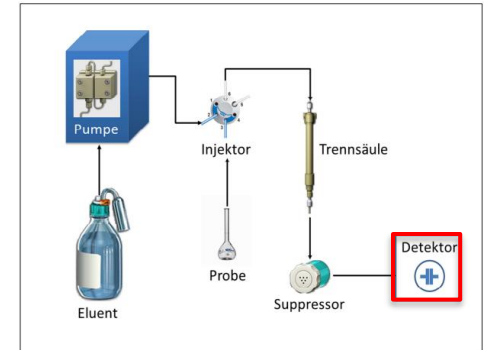
Eliminierung der Grundleitfähigkeit in der mobilen Phase:

- a) elektronische Unterdrückung
- b) chemische Unterdrückung

b) Chemische Unterdrückung:

Suppressor-Technik

- Senkt die hohe **Grundleitfähigkeit** des Eluenten
- Erhöht das Signal des Analyten



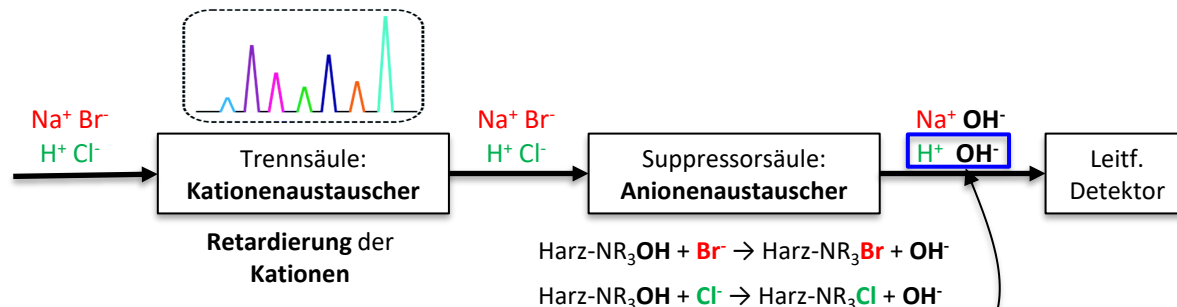
Suppressor-Technik

Kationenanalytik:

Analyt: Na^+ (z.B. in NaBr)

Eluent: verdünnte HCl

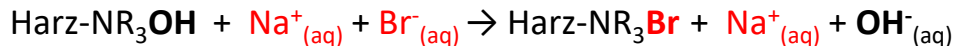
Suppressorsäule: Anionenaustauscher



Erniedrigung der Grundleitfähigkeit durch Umwandlung der gut leitenden HCl in **Wasser**:



Als Bromid vorliegende **Analyten** werden zu dem **stärker leitenden** Hydroxid umgewandelt ($\text{NaBr} \rightarrow \text{NaOH}$):



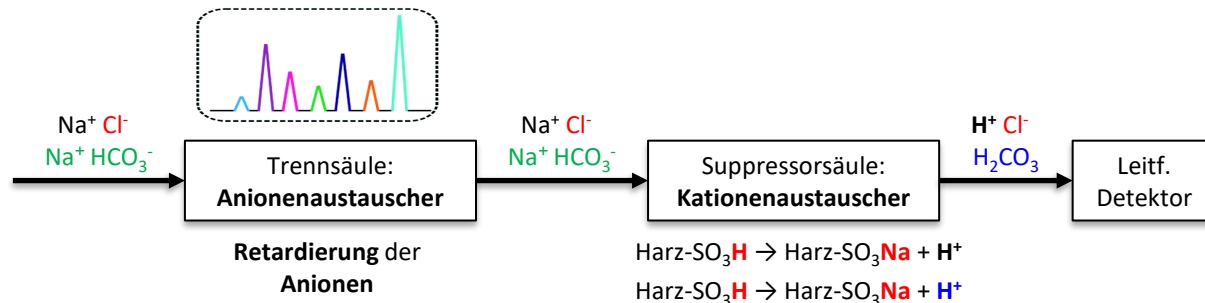
Suppressor-Technik

Anionenanalytik:

Analyt: **Chlorid** (in NaCl)

Eluent: **NaHCO₃**

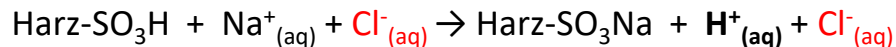
Suppressorsäule: Kationenaustauscher



Erniedrigung der **Grundleitfähigkeit** durch Umwandlung des gut leitenden NaHCO₃ in die **Kohlensäure**:



Der **Analyt** (NaCl) wird in die korrespondierende (sehr gut **leitenden**) **Säure** umgewandelt:



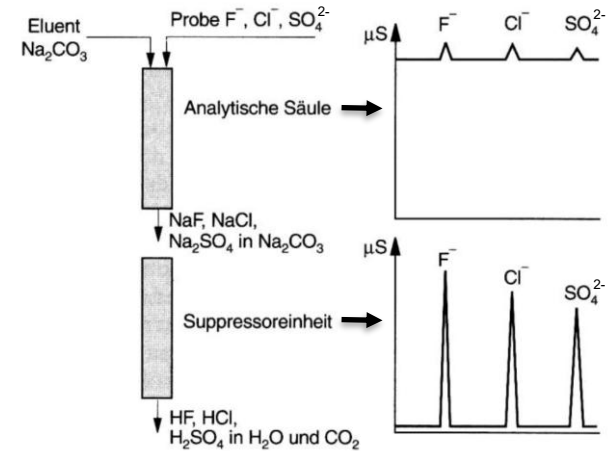
Suppressor-Technik

Vorteile Suppressor-Säule:

- Führt zur Steigerung der **Detektionsempfindlichkeit**
- Erlaubt Gradientenelution

Nachteile Suppressor-Säule:

- Trägt zur **Peakverbreiterung** bei (Totvolumen!)
- Muss regeneriert werden (**Standzeiten**)



Instrumentelle Analytik und Bioanalytik

Mikromembransuppressor

Chemische Unterdrückung mit einem Mikromembransuppressor

Kontinuierlich → keine Standzeiten

Beispiel: Anionenaustausch-Chromatographie

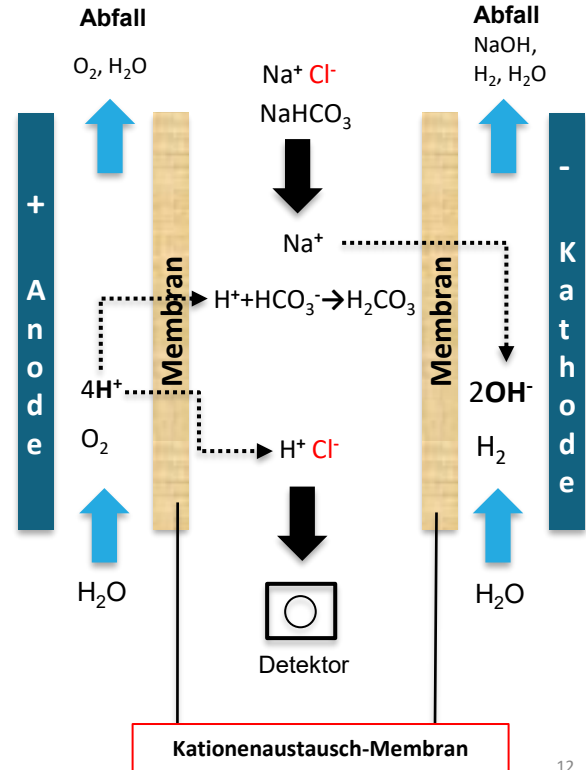
→ **Analyt:** z.B. Cl^- in NaCl

→ Eluent: NaHCO_3

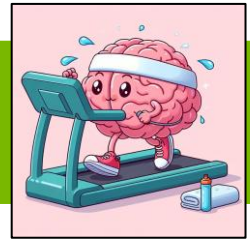
Kontinuierliche Elektrolyse von Wasser:

Anode: $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}^+ + \text{O}_2 + 4 \text{e}^-$

Kathode: $2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{OH}^- + \text{H}_2$



Übung



Chemische Unterdrückung mit einem Mikromembransuppressor

Kontinuierlich → keine Standzeiten

Beispiel: Kationenaustausch-Chromatographie

→ **Analyt:** z.B. Na^+ in NaCl

→ Eluent: verd. HCl

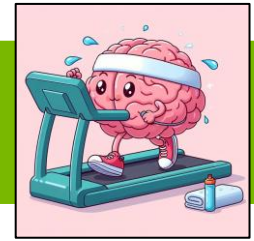
Kontinuierliche Elektrolyse von Wasser:

Anode: $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{H}^+ + \text{O}_2 + 4 \text{e}^-$

Kathode: $2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{OH}^- + \text{H}_2$

Detektionsarten

Erklärung
Elutionsreihenfolge?



Detektionsarten: **Elektrochemische** und **photometrische** Verfahren

Leitfähigkeitsdetektor

- Für alle geladenen Teilchen (universell) einsetzbar
- Sehr empfindlich
- Einfacher bzw. günstiger Aufbau
- Miniaturisierbar und beständig

Photometrische Detektion:

- Direkt: Br^- ; I^- ; NO_2^- ; NO_3^- (UV-Absorption: $\lambda = 200\text{-}240\text{ nm}$)
- Nach einer **Derivatisierung**
- **Indirekte Messung** mit **UV-absorbierenden** Verbindungen im **Elutionsmittel**

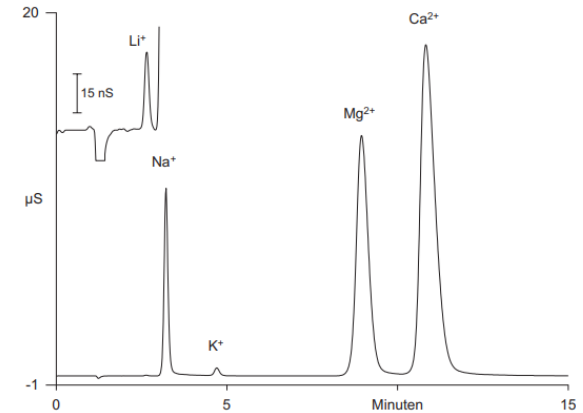


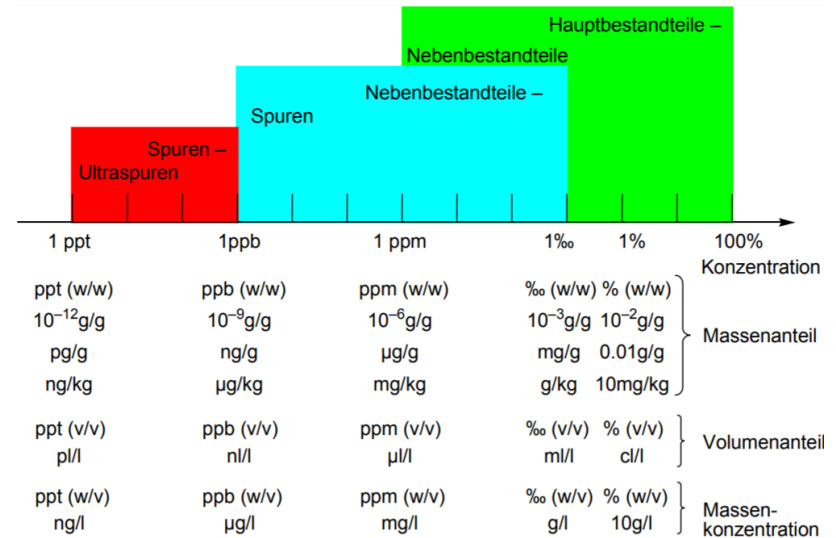
Abbildung:
Bestimmung anorganischer Ionen in Trinkwasser

Ionenchromatographie

Ionenchromatographie

- Reproduzierbare **Ionenanalytik**
- Robust
- Hoher Automatisierungsgrad
- Hohe **Sensitivität (Spurenanalytik: ppm, mg/L)**
- **Kopplung** der IC mit ICP/MS möglich (Nachweisgrenzen im **Ultraspurenbereich**: ppb, µg/L)
- IC-ICP/MS ermöglicht sogar eine **Unterscheidung** zwischen den verschiedenen **Oxidationsstufen** eines Elements

ICP (Inductively Coupled Plasma)



Size Exclusion Chromatography (SEC)

Größenausschlusschromatographie (SEC)
(Gelfiltration)

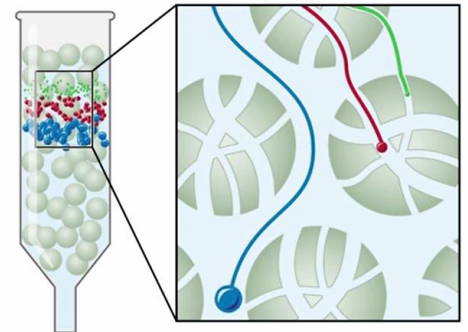
Size Exclusion Chromatography (SEC)

Gelfiltration (Gelpermeationschromatographie)

- Einsatz für die **Proteinaufreinigung** (kaum Denaturierung!)
- **Stationäre Phase** und **mobile Phase** haben eine sehr ähnliche Polarität
- **Stationäre Phase** ist ein **poröses** Material (Polysaccharid, Dextran) mit **definierter Porengröße**

Trennung nach Molekülgröße:

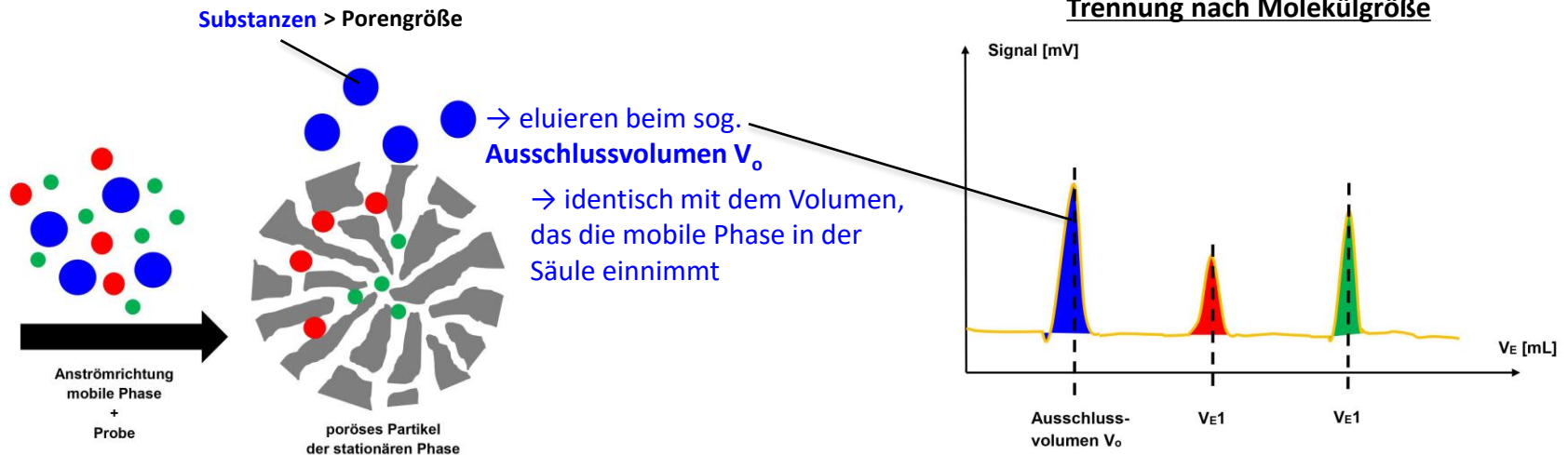
- Je nach **Molekülgröße** ist eine unterschiedliche **Eindringtiefe** möglich
- Kleine Teilchen **diffundieren tiefer** in die Poren des Gels
- **Große Teilchen** können nicht so tief (oder gar nicht) in die Poren diffundieren
→ **eluierten schneller**



Size Exclusion Chromatography (SEC)

Gelfiltration

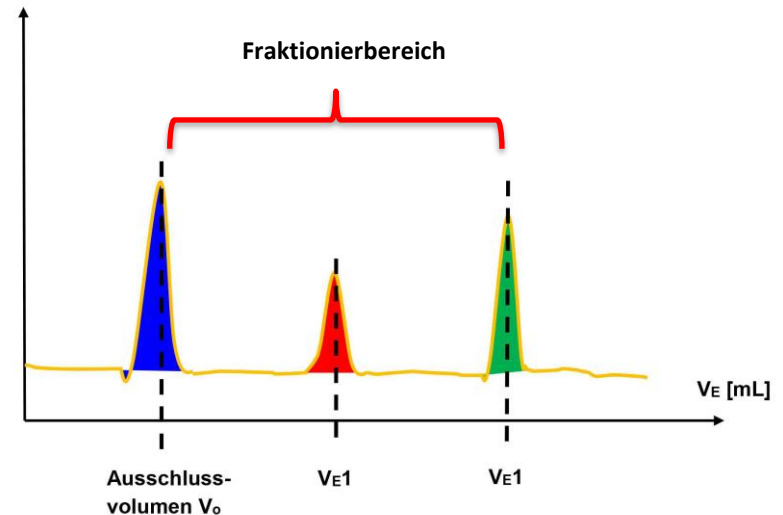
- Man spricht nicht mehr von Retentionszeiten, sondern von **Elutionsvolumina (V_E)**



Size Exclusion Chromatography (SEC)

Trennung nach Molekülgröße:

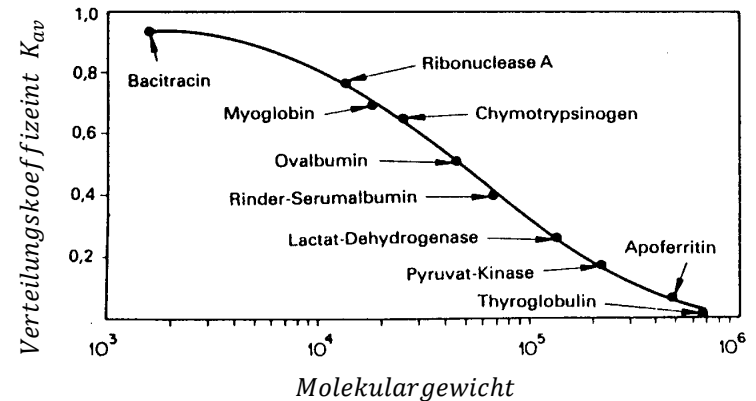
- **Blauer Peak:** Alle Substanzen, die **größer** als die **Poren** sind
- **Grüner Peak:** Alle Substanzen, die maximal **tief** in die Porenstruktur **eindringen** können
- **Fraktionierbereich:**
→ Moleküle eluieren entsprechend ihrer **Molmasse**



Eichkurve

Molekulargewichtsbestimmung mittels Eichkurve

1. **Kalibration** mit Mischung von Proteinen bekannter Molmasse (Standardmischung)
2. Probenlösung mit unbekannten Proteinen über die Trennsäule laufen lassen
3. **Vergleich** der **Elutionsvolumina V_E** zwischen **Standardlösung** und **Probenlösung**
4. Molmasse lässt sich mit Hilfe der Gelfiltration **grob abschätzen**



$$V_E \sim -\log M$$

Anwendung in der Biotechnologie

Herstellung von Gelen für die Gelfiltration:

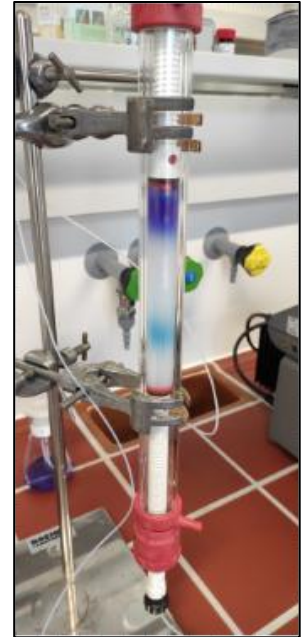
- Gel in **Pulverform** (Dextran) in **Pufferlösung suspendieren** (keinen Scherkräften durch Magnetrührer aussetzen!)
- Über mind. 24 h **aufquellen**
- Gießfähige Masse (engl.: "**slurry**") in eine **Glassäule** einfüllen
- **Gel** benötigt einige Tage, um sich vollständig zu setzen

Gelfiltration ist ein chromatographisches Verfahren mit einer **geringen Trennleistung** und **geringer Kapazität**

Anwendung der GPC in der Biotechnologie:

Entfernung von unerwünschten **Aggregaten** (**multimeren Formen** von Proteinen) oder **Verunreinigungen** mit großer Massendifferenz.

Trennung von freien und gebundenen Biomolekülen (z.B. Antikörper-Rezeptor-Komplex)



Affinitätschromatographie AC

Affinitätschromatographie (AC)

Affinitätschromatographie

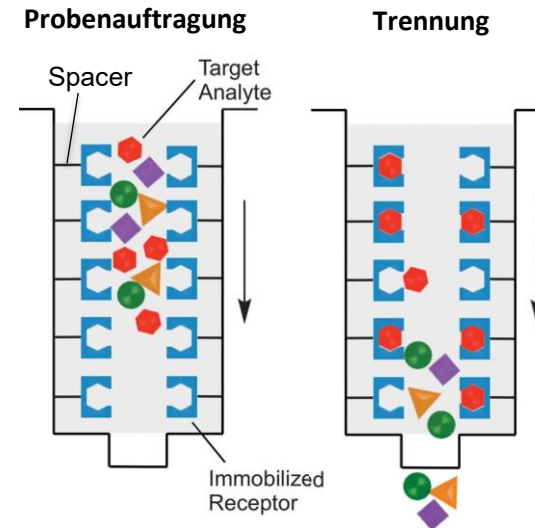
Aufreinigung von Proteinen durch spezifische Wechselwirkungen mit der stationären Phase

Spezifische Bindung durch:

- Antikörper-Antigen-Bindung [IAC]
- Rezeptor-Ligand-Bindung
- Komplexbildung [IMAC]

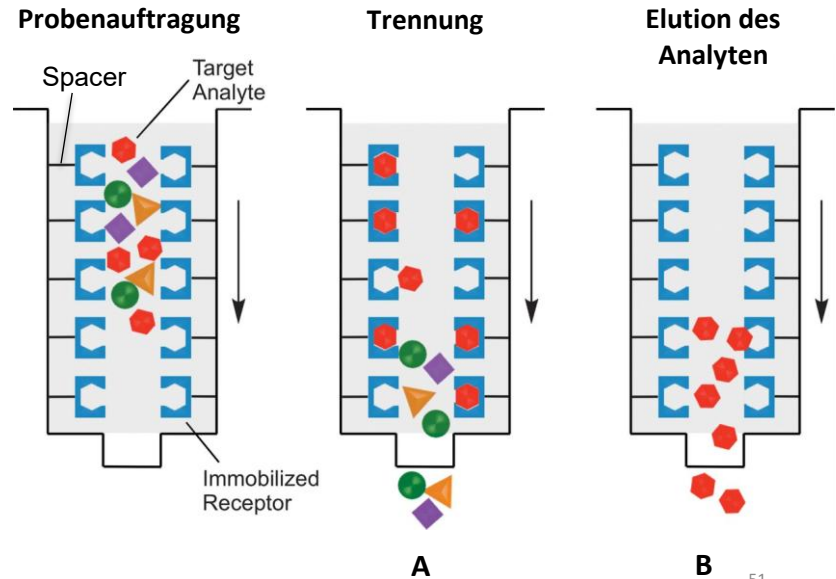
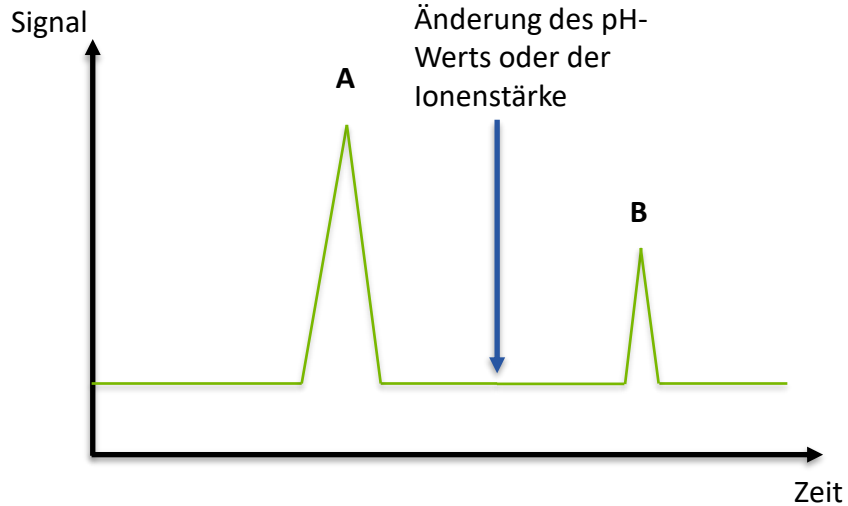
Bindung abhängig von:

- pH-Wert
- Ionenstärke



Affinitätschromatographie

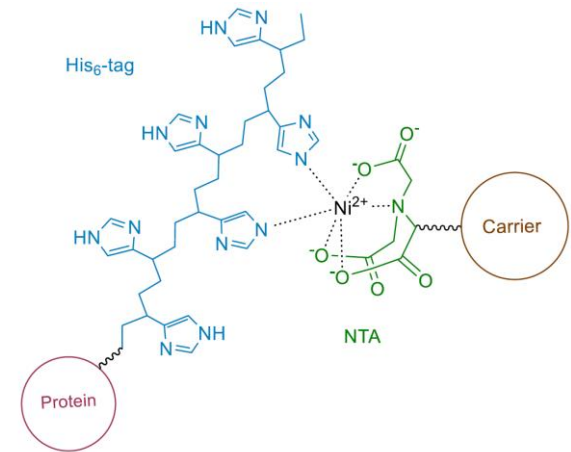
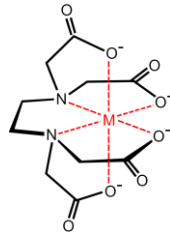
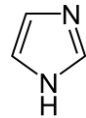
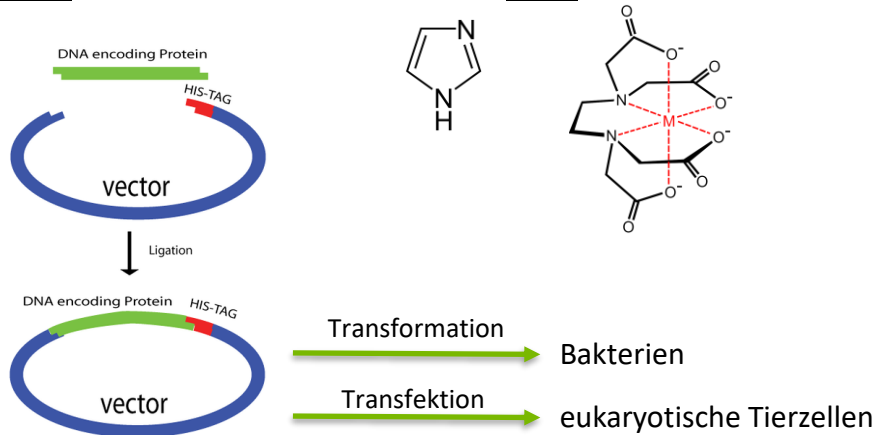
Aufreinigung von Proteinen durch spezifische Wechselwirkungen mit der stationären Phase



Metallchelatchromatographie (IMAC)

Polyhistidin-tag Aufreinigung (IMAC: Immobilized Metal Affinity Chromatography)

- **Rekombinante Proteine** mit **His-tag** (Protein-His₆)
- **Chelat-Bindung** zu Übergangsmetallionen (z.B. Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺) ab pH 8
- Elution bei **pH 4** (Histidin wird protoniert → löst Komplexbindung)
oder mit Überschuss an **Imidazol** **oder** **EDTA**



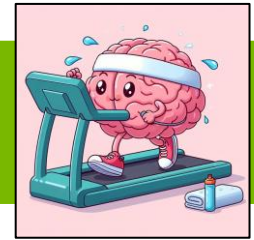
NTA Nitrilotriacetic acid (Nitrilotriessigsäure)

Zusammenfassung Proteinanalytik

■ **Tab. 11.7** Chromatographische Methoden für die Peptid- und Proteinanalyse und die Charakteristika ihrer stationären und mobilen Phasen

Chromatographische Methode	Stationäre Phase	Retentive mobile Phase	Eluierende mobile Phase
SEC oder GPC	porös	(nicht retentiv)	wässrig, niedriger Salzgehalt
RPC	hydrophob	wässrig	organisches Lösungsmittel
NPC	polar	unpolar organisch	polares organisches Lösungsmittel
HILIC	hydrophil	unpolar organisch	polares organisches Lösungsmittel wässrig
ANPC	polar	organisch	wässrig
HIC	schwach hydrophob	wässrig, hohe Ionenstärke	wässrig, niedrige Ionenstärke
AEX	geladen	wässrig, hoher pH-Wert, niedrige Ionenstärke	wässrig, hoher pH-Wert, hohe Ionenstärke (oder niedriger pH-Wert), hoch selektives Gegenion
CEX	geladen	wässrig, niedriger pH-Wert, niedrige Ionenstärke	wässrig, niedriger pH-Wert, hohe Ionenstärke (oder hoher pH-Wert)
AC	biomimetisch, biospezifisch	niedrige Ionenstärke	hohe Ionenstärke, konkurrierender Ligand
IMAC	Metallchelate	wässrig, neutraler pH-Wert, hohe Ionenstärke	niedriger pH-Wert, konkurrierender Ligand EDTA

Verständnisfragen



Verständnisfragen

1. Warum wird die RPC selten für die Proteinaufreinigung genutzt?
2. SEC: Was passiert, wenn ein Protein kleiner ist als die kleinste Pore des Säulenmaterials?
3. Warum ist die SEC die Methode der Wahl, um die Bildung von Dimeren oder Aggregaten in Biopharmazeutika (z. B. Antikörpern) zu untersuchen?
4. Die Kombination aus Ionenaustauschchromatographie (IEX) und Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) ist eines der elegantesten und am häufigsten genutzten Setups in der biochemischen Proteinreinigung (Downstream Processing). Welche prozesstechnischen Gründe erklären die besondere Effizienz und weite Verbreitung dieser Kombination?
5. Nennen und begründen Sie zwei orthogonale chromatographische Trennmethode, die sich für die Proteinreinigung eignen.

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**.

