Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und hydrophobe Interaktionschromatographie C3BL

CC BY NC SA
laborberufe.de

Es existiert ein Lernvideo, das Sie durch das Arbeitsblatt begleitet: https://youtu.be/s18b0_KfztE

Die **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie** (*high performance liquid chromatography*, **HPLC**) ist eine instrumentelle analytische Methode, die sowohl der Trennung von Substanzen eines Gemisches, als auch deren Identifizierung und Quantifizierung (d.h. Gehaltsbestimmung) dient. Seltener wird die HPLC auch zu präparativen Zwecken eingesetzt, hier kommen Säulen mit bis zu einem Meter Durchmesser zum Einsatz. Auch die **hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)** ist ein Verfahren zur Stofftrennung, hiermit werden in der Biochemie Proteine aufgereinigt, es steht also der präparative Charakter gegenüber dem analytischen Charakter im Vordergrund. Zwischen beiden Verfahren gibt es einige Parallelen.

1. Funktionsweise – Überblick über eine typische HPLC-Apparatur

Es handelt sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase (auch **Elutionsmittel** oder **Eluent** genannt) durch eine **Trennsäule**, welche die stationäre Phase enthält, gepumpt wird. Dabei werden die einzelnen Komponenten vor dem Zusammenmischen zur mobilen Phase über **Mischventile**, jede für sich allein, erst einmal entgast. Eine Trennsäule in einem HPLC-Gerät ist zwischen 1,8 und 30 cm lang und hat zumeist einen **Innendurchmesser von 2 - 4,6 mm** im Falle von analytischen HPLC-Systemen. Gelegentlich wird eine sogenannte **Vorsäule** aus wirtschaftlichen Gründen vorgeschaltet; dabei handelt es sich um eine kurze Säule, die Verunreinigungen von der Hauptsäule abhalten soll. Der auf die wesentlichen Elemente reduzierte Aufbau einer typischen HPLC-Apparatur kann aus unten stehenden Abbildungen entnommen werden:

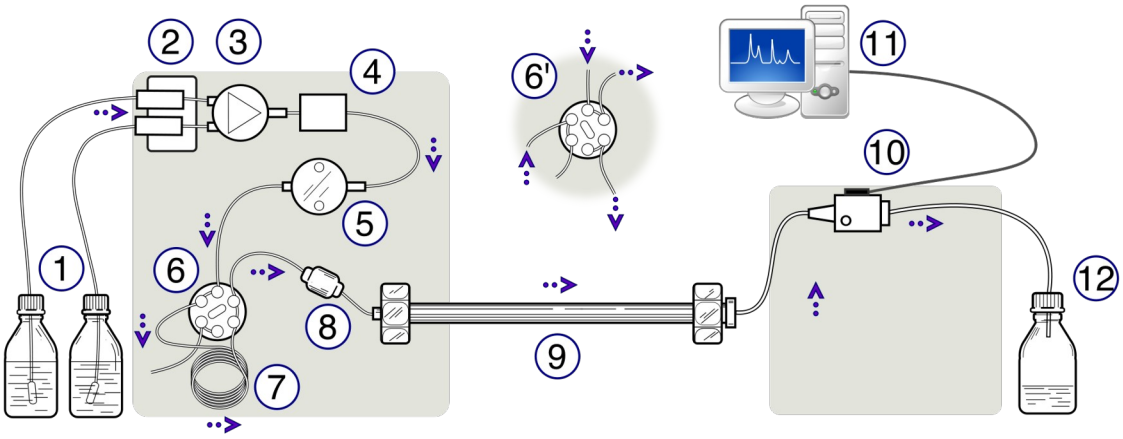

Abb. 1.1: Schema eines HPL-Chromatographs *(Quelle: wikipedia.org)*

1.1 Ordnen Sie die Nummern 1 – 12 einem der folgenden Begriffe (incl. Übersetzung des Begriffs).

(…) Sample injection loop ……, (…) Pre-column ……,

(…) Solvent degasser ……, (…) Detector (i.e. IR, UV)……,

(…) Solvent reservoirs ……, (…) Analytical column ……,

(…) Gradient valve ……, (…) High-pressure pump ……,

(…) Switching valve ……, (…) Data acquisition ……,

(…) Mixing vessel for delivery of the mobile phase ……,

(…) Waste or fraction collector ……

Die unverzichtbaren Bauteile haben folgende Abfolge:

Lsg.mittelvorrat → Entgasungseinheit → Pumpe → Probeschleife → Trennsäule → Detektor/Auswertung → Lsg.mittelabfall

2. Prinzip und gängige stationäre Phasen bei der HPLC

Je stärker ein Analyt mit der stationären Phase bindend wechselwirkt, desto länger verbleibt er auf der Säule. Je nach Stärke der Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz also zu verschiedenen Zeiten (**den Retentionszeiten**) am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden können. Es werden zwei Methoden unterschieden**: Normalphase (NP)** und **Umkehrphase (engl. *reversed phase*, RP)**.

2.1 Normalphasen-HPLC

Bei der Normalphasenchromatographie wird eine polare stationäre Phase genutzt, in den meisten Fällen handelt es sich um **Kieselgel** (**Silicagel).** Das ist eine poröse Form von **Siliciumdioxid** mit zahlreichen OH-Gruppen.

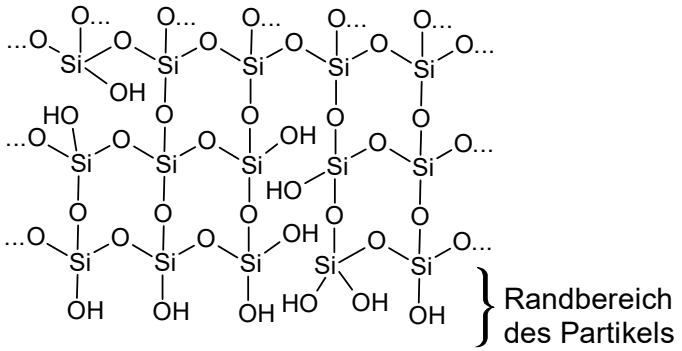

Abb. 2.1 Funktionelle Gruppen im Kieselgel

SiO_2 liegt als poröse Raumnetzstruktur verknüpfter SiO_4-Tetraeder vor. Der Bau ist jedoch nicht ideal, so dass zahlreiche Fehlstellen, Lücken etc. vorhanden sind. Das Material besitzt großen inneren Oberflächen und porösen Charakter. An den Oberflächen befinden sich neben den **Siloxan-Gruppen** (...Si-O-Si...) auch ...Si-OH-Grupppen **(Silanol-Gruppen)** *(vgl. Abb. 2.1)*

2.1 *Markieren Sie die Fehlstellen, eine Silanol-Gruppe, und eine Siloxan-Guppe.*

Die Stärke der Elutionskraft der mobilen Phase ist im allgemeinen abhängig von deren Polarität. Die verschiedenen Lösungsmittel sind nach steigender Polarität in der **eluotropen Reihe** angeordnet. Je polarer eine mobile Phase ist, desto schneller wird eine Substanz eluiert. Aus der entsprechenden Liste *(vgl. z.B. Tabellenbuch)* kann man ablesen, dass eine polare Substanz wie Acetylsalicylsäure auf einer Kieselgel- oder Al_2O_3-Säule mit Hexan sehr langsam läuft, mit Methanol sehr schnell.

Merke: Polare Moleküle werden auf der NP-Säule länger retardiert (zurückgehalten) als unpolare Moleküle und verlassen deshalb die Säule später. Die Elutionskraft auf ein Probemoleküls nimmt mit steigender Polarität der mobilen Phase zu.

2.2. Reversed-Phase-HPLC (Umkehrphasen-HPLC, hydrophobe Chromatographie)

Auch bei der **RP-HPLC** ist die Retentionszeit einer Substanz abhängig von der Verweildauer in der stationären Phase. Diese Form konnte sich die letzten Jahrzehnte stark durchsetzen. Mittlerweile werden 90% der HPLC-Trennungen auf Umkehrphasen durchgeführt. Es werden unpolare stationären Phasen eingesetzt, deshalb spricht man im biologischen Bereich auch von „***hydrophober Chromatographie“.*** Die Analyte binden reversibel über *van-der-Waals-Wechselwirkungen (unpolare Wechselwirkungen)* an die stationäre Phase. Je polarer die mobile Phase, desto weniger kann sie diese Wechselwirkungen aufbrechen und die Analyte weitertragen. Die Elutionskraft der mobilen Phase sinkt also mit steigender Polarität.

Macht man die mobile Phase unpolarer, erhöht man also beispielsweise den Anteil an Alkanen, so kann sie zunehmend die unpolaren Kräfte zwischen den Analyten und der stationären Phase lösen. Weiterhin steigt die Affinität des Analyten zur mobilen Phase. Die Elutionskraft steigt.

Die stationäre Phase wird ausgehend von Kieselgel hergestellt, indem man Moleküle mit langkettigen Kohlenwasserstoffresten (Alkylresten) an die Oberfläche der Silicagel-Partikel koppelt. Die Polarität der stationären Phase wird also umgekehrt (engl.: "reversed") .

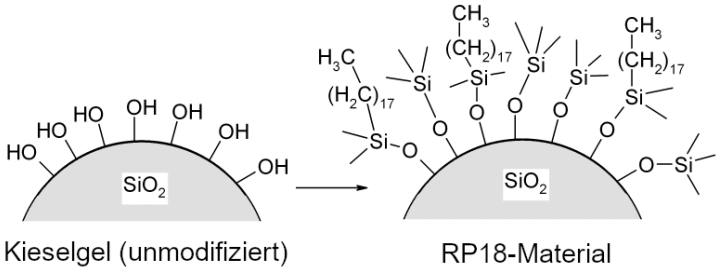

Abb. 2.2: Bildung von RP18-Material (Quelle: commons.wikimedia.org. Autor: Dschanz.stark verändert)

Als mobile Phase werden bei der RP-HPLC meist Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol eingesetzt.

2.2. Hier ein Auszug aus der englischen Wikipedia. Geben Sie den Text sinngemäß stichwortartig auf Deutsch wieder.

"Reversed-phase chromatography employs a polar (aqueous) mobile phase. As a result, hydrophobic molecules in the polar mobile phase tend to adsorb to the hydrophobic stationary phase, and hydrophilic molecules in the mobile phase will pass through the column and are eluted first. Hydrophobic molecules can be eluted from the column by decreasing the polarity of the mobile phase using an organic (non-polar) solvent, which reduces hydrophobic interactions. The more hydrophobic the molecule, the more strongly it will bind to the stationary phase, and the higher the concentration of organic solvent that will be required to elute the molecule."

……

……

……

……

……

……

……

……

……

2.3 Isokratische und Gradientrentrennung

Bei **isokratischen Trennungen** bleibt die Zusammensetzung der Mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich. Bei **Gradiententrennungen** wird die Polarität des Fließmittelgemisches während der Analyse verändert.

2.2. Wie verändern sich die Peaks bei der isokratischen Trennung mit steigender Retentionszeit? Wie verändert eine Gradientenelution das Chromatogramm?

……

……

……

……

……

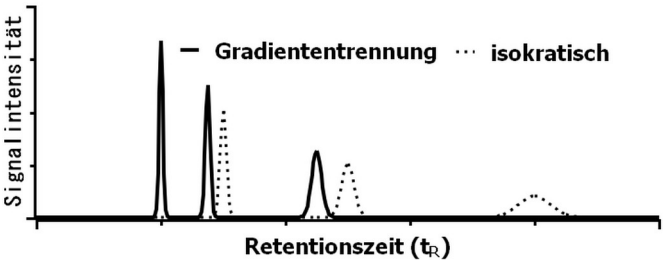

Abb. 2.1: Vergleich: isokratische und Gradientrennung. Alle Analyte haben denselben Gehalt (!) und Responsefaktor (!) (Quelle: eigenes Werk)

……

……

……

……

2.3 Wie muss die Polarität während es Laufs ändern, damit die letzten Peaks bei kürzeren Retentionszeiten erscheinen? Begründen Sie kurz?

a) Normalphasenchromatographie	b) Umkehrphasenchromatographie
……	……
……	……
……	……

3. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) zur Proteinaufreinigung

Die Trennung von Proteinen mit der **hydrophoben Interaktionschromatographie** hat Ähnlichkeit zur Umkehrphasenchromatographie: Sie beruht auf Wechselwirkungen (="Interaktion") unpolarer (= „hydrohober") Oberflächenregionen eines Proteins mit der ebenfalls unpolaren stationären Phase (Umkehrphase).

Diese Wechselwirkungen entstehen dabei erst durch eine hohe Salzkonzentration der Lösung (i.d.R. wässrige $(NH_4)_2SO_4$-Lösung), demselben Salz das bevorzugt auch

bei der **Salzpräzipitation** von Proteinen verwendet wird *(vgl. 2. Lehrjahr, Ammoniumsulfatfällung*): Eine erhöhte Salzkonzentration führt dabei zu einer Erhöhung der Oberflächenspannung, was zu einer teilweisen Entfernung der Hydrathülle und somit zu einem Freilegen hydrophober Bereiche des Proteins führt. Diese hydrophoben Oberflächenbereiche eines Analytmoleküls treten nun mit den hydrophoben Resten der stationären Phase in Wechselwirkung. Dabei ist zu beachten, dass mit steigender Hydrophobizität eines Proteins die zur Bindung an die stationäre Phase nötige Salzkonzentration geringer wird

Wie bei der Gradienten-RP-HPLC eluiert man nun mit mit einer mobilen Phase die immer unpolarer wird: Der Salzgehalt der mobilen Phase nimmt also immer weiter ab. In der Praxis gibt man das Proteingemisch, gelöst in einer relativ konzentrierten Salzlösung (z.B. 1,8 M-$(NH)_4SO_4$ oder 4 M NaCl) auf die Säule. Bei diesen Bedingungen binden praktisch alle Proteine mit ihren hydrophoben Oberflächen an die Säule. Während des Laufs verringert man die Polarität der mobile Phase: Schon geringe Erniedrigung der Polarität führt dazu, dass die hydrophileren/ polareren Proteine an den betroffenen Oberflächenbereichen wieder ihre Hydrathüllen ausbilden und nun mit der mobilen Phase mittransportiert werden. Zu Beginn eluieren also die polareren/hydrophileren Proteine. Während diese Proteine eluieren, ist die Polarität der moilen Phase (Salzlösung) zum Ablösen der hydrophoben Probenbestandteile noch zu hoch. Erst wenn die mobile Phase durch die sinkende Salzkonzentration unpolar genug ist, werden auch diese Proteinen an den relevanten Oberflächen rehydratisiert, und sie lösen sich von der stationären Phase ab.

· Unterschiede zur RP-HPLC

Die Alkylreste der stationären Phase sind bei der HIC häufig kürzer als bei der klassischen RP-HPLC:

- klassische RP- HPLC: C_8 linear, C_{18} linear
- HIC C-$(CH_3)_3$ (tert-Butyl), -C_6H_5 (Phenyl), C_8 linear

Aus diesem Grund sind die Elutionsbedingungen milder und auch keinen so hohen Drücke nötig. Es gibt *„gravity columns“* Plastiksäulchen – wie die bei uns im Praktikum genutzten Gelchromatographie-Säulen, bei denen die Schwerkraft der Flüssigkeit als Transportkraft ausreicht. *„Pressure columns“* erfordern für eine akzeptable Trennzeit eine Pumpe. Auch hier werden jedoch überwiegend Kunststoffmaterialien eingesetzt, weil die Drücke recht niedrig sind.

Die HIC erfolgt unter weitgehender Schonung der Proteinkonformation, weil ausschließlich mit einer wässrigen, salzhaltigen Phase gearbeitet wird. Bei der RP-HPLC enthält die mobile Phase typischerweise noch organische Bestandteile, die zur Denaturierung der Proteine führt. Die Wechselwirkung zur stationären Phase erfolgt bei der RP-HPLC also nicht nur mit Aminosäureresten an den nativen Proteinoberflächen, sondern auch mit Aminosäureresten, die im Proteininneren zu finden sind und die durch die Denaturierung exponiert werden. Dadurch sind höhere Trennauflösungen möglich und es lassen sich mit der RP-HPLC so auch Proteine trennen, die sehr ähnlich gebaut sind. Dies ist allerdings nur möglich, weil die aufgetragenen Probevolumen viel kleiner sind. Zusammenfassend kann man also konstatieren:

- RP-HPLC: Hochauflösendes System, geeignet zur komplexen Proteinanalyse
- HIC: Geringere Auflösung, eher präparativer Charakter, geeignet zur Proteinisolierung/ Aufreinigung

Das Trennprinzip der HIC weicht deutlich von dem der HPLC ab.

***3.1** Füllen Sie in den Lückentext unten mit den passenden Wortkombinationen. Erläutern Sie unter sinnvoller Verwendung folgender Wortkombinationen: mobilen Phase, Protein, Säulenlänge, permanent, Elutionskraft, unretardiert, 100%, 0%,*

Bei der HIC gilt das „Alles-oder-nichts-Prinzip“: Bei einer bestimmten Salzkonzentration ist eine Proteinart entweder …….. gebunden oder läuft …….. mit der mobilen Phase mit. Es gibt nur die Wanderungsgeschwindigkeiten ……. und …… (= Geschwindigkeit der ……..) , je nach Salzkonzentration trifft der eine oder der andere Wert zu. Bei der HPLC gibt es die Geschwindigkeiten 0% **bis** 100% (und alle Werte dazwischen). Ist die Elutionskraft auf die Verbindung nicht so groß, dauert es einfach länger, bis der Stoff am Detektor erscheint. Bei der HIC wird bei nicht passender …….. der Stoff gar nicht weiter transportiert. Deshalb ist für das chromatographische Auflösungsvermögen die …….... bei der HIC nicht besonders relevant, denn sie bedeutet nicht automatisch bessere Trennung. Vielmehr steigt hierdurch die Säulenkapazität: Das heißt, es kann mehr ……... aufgetragen und damit auch mehr aufgereinigt werden

4. Praktische Durchführung und Detaillierte Informationen zu den Bauteilen der HPLC-Anlage

- **Pumpe**

Die Pumpen für die HPLC müssen Flüssigkeiten mit Drücken bis zu 600 bar durch die stationäre Phase transportieren. Dieses Durchdrücken muss mit konstanter und Strömung geschehen, da sonst vom Detektor kein brauchbares Signal zu erwarten ist.Ein wichtiger Faktor beim Pumpen und Mischen von Lösungsmitteln kommt dem **Entgasen der Laufmittel** zu: Da unter hohem Druck die Löslichkeit der Lösungsmittel für Gase vermindert sein kann, kommt es zum Ausgasen und die Pumpensysteme können nicht mehr optimal arbeiten. Viele **Entgasungseinheiten** können das Laufmittel online durch Vakuum entgasen, bevor es unter hohen Druck versetzt wird **(online degassing system.)**

- **Probeneinlass und Autosampler**

Für die Zuführung der Probe hat sich ein System mit einer **Dosierschleife** und Ventilsystem durchgesetzt:

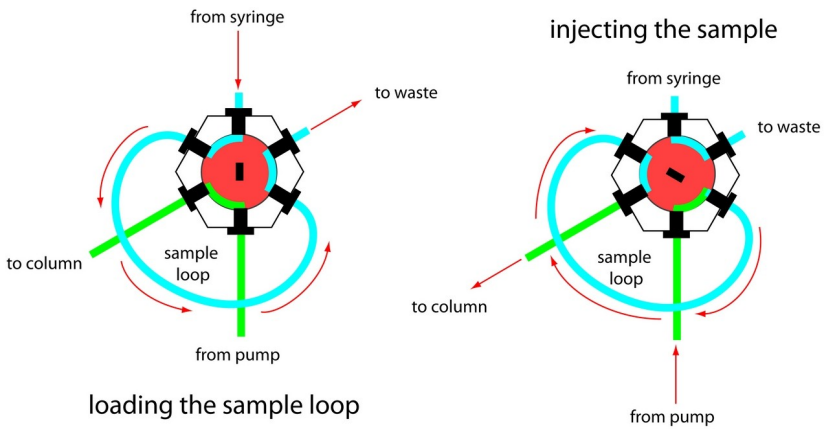

Abb. 4.1 und 4.2: Funktionsweise einer Dosierschleife (Quelle: 3.2: chem.libretexts.org, 3.3 wikipedia.de)

***4.1** Erklären Sie anhand der Abbildung die Funktionsweise des Einlassventils.(Quelle: commons.wikimedia.org. Autor: Cahra)*

……..

……..

……..……

……...……...

……...……..

Wichtig ist, in die Probeschleife mehrere Male unmittelbar hintereinander Probelösung zu injizieren, denn zu Beginn ist sie mit Eluent gefüllt. So injiziert man in eine 5µL-Probeschleife hintereinander z.B. 4 mal 20 µL Probe. Dadurch ist sichergestellt, dass die Schleife vollkommen mit unverdünnter Probelösung (ohne Eluentenreste) gefüllt ist .

Ein **Autosampler** macht den HPL-Chromatograph zum richtigen Arbeitstier. Hier kann man auf einen Probenteller viele **Behälter (vials)** unterbringen. Die Gefäße werden in der programmierten Art jeweils zur Injektionsnadel geführt. Das Gerät bringt das eingestellte Volumen an Probe automatisch auf die Trennsäule auf. Darüber hinaus können bei Bedarf Probelösungen aus verschiedenen Behältern gemischt werden. Insgesamt kann so mithilfe eines Autosamplers das HPLC-Gerät z.B. auch nachts Analysen durchführen, was einen enormen ökonomischen Vorteil bedeutet.

5. Detektoren in der HPLC und der HIC

Die Detektoren messen Veränderungen des Eluats und Wandeln diese Information in elektronische Signale um. Die aufgenommenen Kurven (Peaks) und Chromatogramme können dann quantitativ und/oder qualitativ ausgewertet werden.

***5.1a)** Zeichnen Sie die Basislinie ein.*

***b)** Beschreiben Sie die Bedeutung der Begriffe Rauschen und Drift. Inwiefern beeinflussen sie die Signalerkennung?*

……...……

……...……..……

……...……...……

……...……...……

……...……

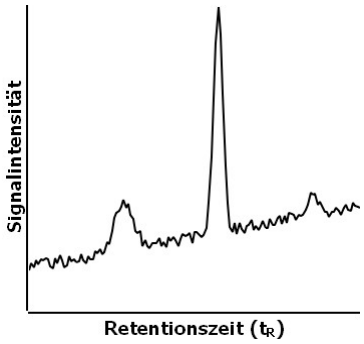

Abb. 5.1: Rauschen, Drift und Signal (Q: e.W.)

Je nach Analyseproblem gibt es zahlreiche Detektoren. Neben den unten vorgestellten UV-VIS- und Brechungsindexdetektoren gehören dazu auch Fluoreszenzdetektoren (→ Messen Fluoreszenz), Massenspektrometrie-Detektoren (→ Analyse von Molekülfragmenten zur Stoffidentifizierung) oder in der pharmazeutischen Chemie auch Polarimetrie-Detektoren (→ messen optische Aktivität bzw. Enantiomeren-Reinheit).

- **UV/VIS-Detektor und DA-Detektor**

Das Gerät misst bei einer voreinstellbaren Wellenlänge (UV oder VIS-Bereich) ständig die Absorbanz in der Durchflusszelle:

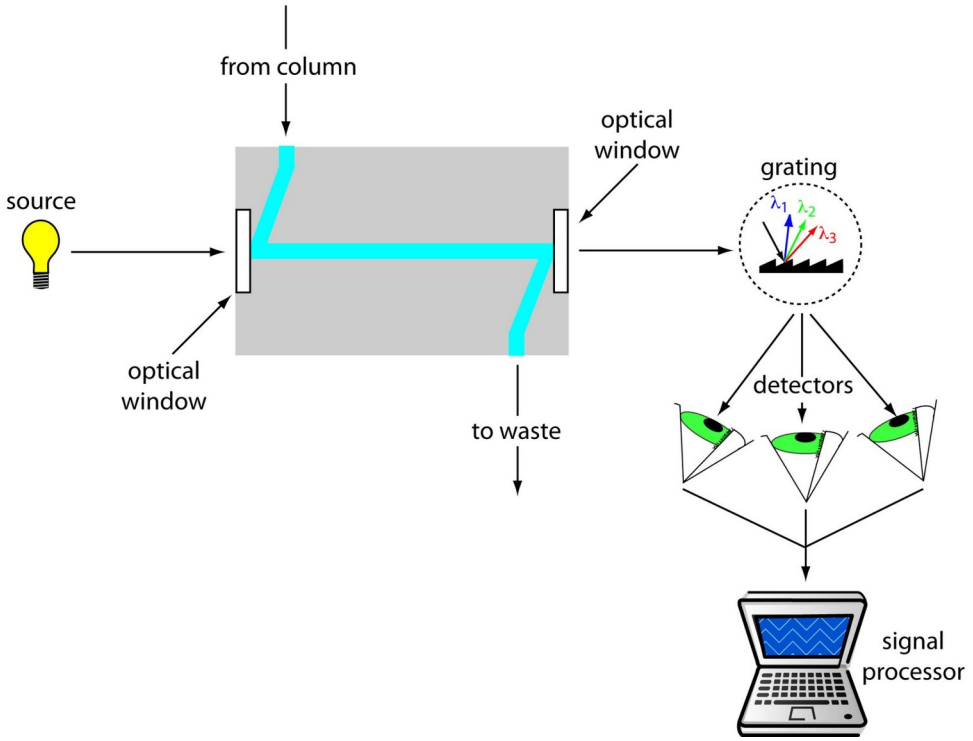

Abb. 5.2: Schema eines DAD (Q: www.chem.libretexts.org)

5.2 a) *Erklären Sie anhand Abb. 4.2 den baulichen Unterschied zwischen einem UV/VIS-Detektor und einem DAD, sowie den Vorteil letzteren.* ***b)*** *Warum ist die Durchflusszelle so lang?*

Das ist für die Analyse des Stoffe mittels HPLC wichtig, weniger jedoch bei der HIC, weshalb sich dort ein solcher Detektor in der Regel dort nicht verwendet wird.

5.3 *Begründen Sie kurz!*

……,……

……..……

- ***Brechungsindexdetektor***

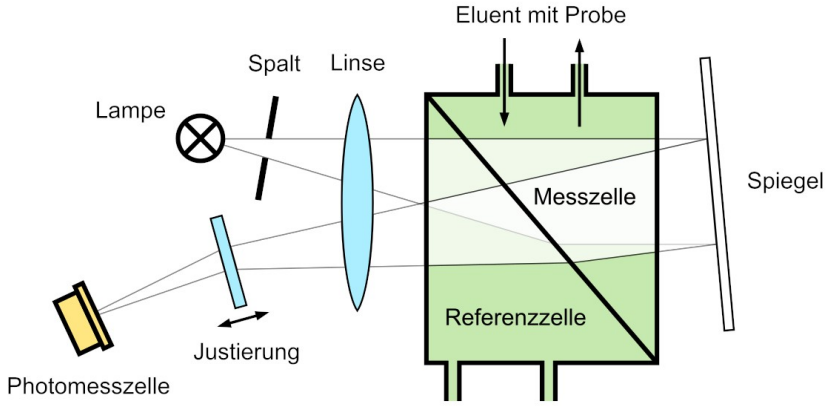

Abb. 4.4: Bauprinzip eines Brechungsindex-Detektors
(Q: wikipedia.de, verändert)

Der Brechungsindex-Detektor misst, wie stark das Licht an der Grenzfläche zwischen Eluat und mobiler Phase gebrochen wird. Sobald das Eluat in seiner chemischen Zusammensetzung durch gelöste Stoffe von der eingesetzten mobilen Phase abweicht, kommt es zur Brechung an der Grenzfläche zwischen beiden Flüssigkeiten. Wie stark die Brechung ist, kann das Gerät quantitativ bestimmen und so Peaks aufnehmen. Beim RID handelt es sich um einen **Universal-detektor** der auch dann eingesetzt werden kann, wenn die Analyte keine UV/VIS-Spektren besitzen.

Er bleibt in seiner jedoch Empfindlichkeit weit hinter einem DAD oder einem UV/VIS-Detektor zurück. Da der Brechungsindex stark temperaturabhängig ist, ist für fehlerfreie Messungen eine konstante Temperatur des Eluenten unerlässlich. Moderne kommerzielle Geräte verfügen daher über exakt temperierte Messzellen. Weiterhin ist er bei Gradiententerennungen nicht einsetzbar, weil hier der Brechungsindex der mobilen Phase sich ständig verändert und eine Basislinie so nicht zugeordnet werden kann.

5.4 *Welchen der beiden vorgestellten Detektoren würden Sie bei der Auftrennung von Proteinen und Peptiden nutzen? Begründen Sie!*

……,……

……..……

6. Identifizierung der Substanzen

……..……..

……..……..

……..……

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..

……..……..