

Praktikum physikalische/analytische Biochemie (SS 2004)

Versuch 1: HPLC

Versuch am: 4.05.2004

Abgabe am: 19.05.2004

Martin Thunemann

Natalie Leiprecht

Torsten Barth

A) HPLC UND REVERSE PHASE (RP) HPLC-CHROMATOGRAPHIE

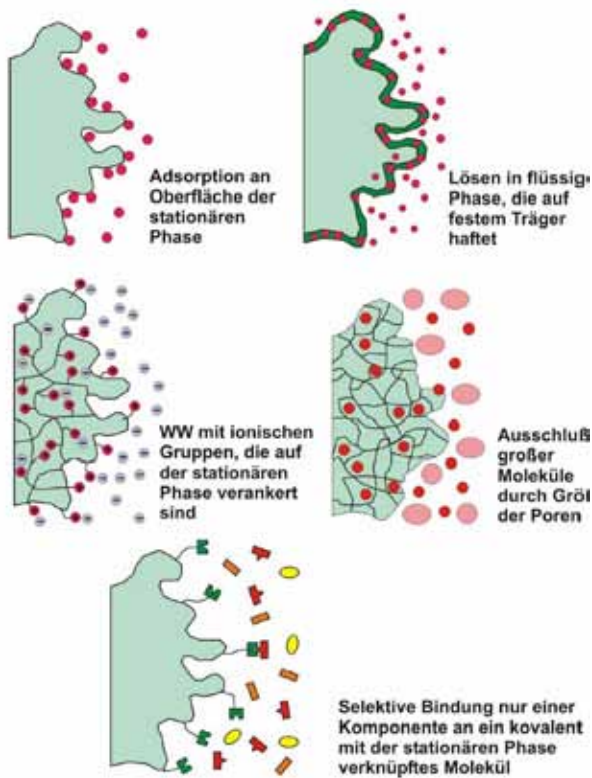


Abbildung A-1: Wichtige Wechselwirkungsmechanismen bei chromatographischen Trennverfahren

Die Grundidee der Chromatographie ist die Trennung von Substanzen durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit einer stationären Phase. Die unterschiedlich stark mit der stationären Phase wechselwirkenden Probesubstanzen können durch einen Eluenten (mobile Phase) unterschiedlich schnell transportiert werden, was eine Auftrennung dieser bewirkt. Wichtigste Grundlage der Chromatographie ist daher die unterschiedliche Verteilung eines Stoffes in zwei Lösemitteln (also den beiden Phasen); das Verhältnis der Konzentrationen der Substanz in der stationären und der mobilen Phase wird durch den Verteilungskoeffizienten beschrieben, welcher als thermodynamische Grundlage den Nernst'schen Verteilungssatz besitzt. Ein für die Trennung bestimmter Substanzen geeignetes Chromatographiesystem muss dazu führen, dass die zu trennenden Substanzen verschiedene Verteilungskoeffizienten besitzen.

Die Vielfalt der verschiedenen stationären und mobilen Phasen lässt sich in grundlegende Chromatographiesysteme einteilen, welche auf Adsorptionsgleichgewichten, Verteilungsgleichgewichten, Ionenaustauschergleichgewichten und weiteren spezifischen Gleichgewichten, z.B. zwischen Makromolekül und (s)einem Ligand oder dem Gleichgewicht an einem Molekularsieb basieren. Auch die physikalischen Eigenschaften der stationären und mobilen Phasen erlauben eine Unterteilung der Chromatographiearten. Die stationäre und häufig feste Phase kann so z.B. aus einer Kieselgelschicht auf einer Gasplatte bestehen (DC), aus flüssigen Materialien bei der Gaschromatographie oder aus für ihren Anwendungsbereich optimal angepassten chemischen Substanzen. Die stationäre Phase liegt häufig in einer Säule vor, die mit dem Material der festen Phase gefüllt ist, bei Kapillarsäulen ist meist die Wand der Säule mit der festen Phase versehen.

In der Flüssigchromatographie (liquid chromatography, LC) stellt die mobile Phase eine Flüssigkeit dar, während die stationäre Phase aus festen Materialien besteht. Bei der simpelsten Form der Flüssigchromatographie fließt der Eluent mit Hilfe der Schwerkraft durch die Säule, bei der HPLC wird aus verschiedenen Gründen, auf die wir im Folgenden noch eingehen werden, der Eluent unter hohem Druck durch die Säule gepresst.

Um die Eigenschaften eines Chromatographiesystems beschreiben zu können, müssen einige grundlegenden Konzepte erwähnt werden: Zurückgehend auf die Rektifikation unterteilt man die Chromatographiesäule in theoretische Böden einer bestimmten Höhe (height equivalent of a theoretical plate, HETP) und nimmt an, dass sich in dem Bereich eines theoretischen Bodens ein Gleichgewicht einstellen kann. Je mehr Gleichgewichtseinstellungen auf der Säule nebeneinander möglich sind, desto besser ist ihre Trennleistung; anders gesagt: je mehr theoretische Böden eine Säule besitzt, desto größer ist die Auflösung der Trennung. Die zweite die Auflösung beeinflussende Größe ist die Wanderungsgeschwindigkeit einer Verbindung durch die Säule, welche durch ihren (effektiven) Verteilungskoeffizienten bestimmt wird.

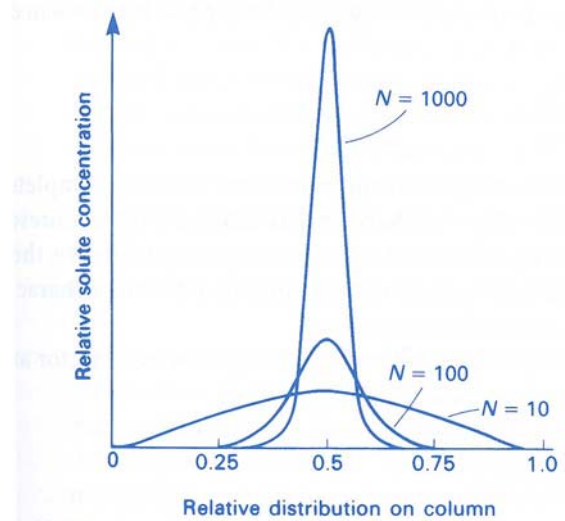


Abbildung A-2: Einfluss der Zahl der theoretischen Böden auf die Form des Peaks

Das am Ende der Säule mit Hilfe eines Detektors aufgenommene Chromatogramm entspricht einem Konzentrationsprofil, was idealerweise die symmetrische Form einer Gaußfunktion besitzt, mit dieser Annahme lassen sich viele Größen einfach bestimmen (siehe Auswertung). Die über den Erfolg entscheidende Größe ist die schon erwähnte Auflösung, die ein Maß für die Trennung der Peaks angibt:

$$R_S = \frac{2(t_R^j - t_R^i)}{b_b^i + b_b^j}$$

Die in der HPLC verwendeten Säulenmaterialien sind sehr kleine Teilchen (im Versuch 5 µm), weswegen der Eluent gegen einen großen Widerstand der Teilchen gegen den Durchfluss mit (relativ) hohem Druck durch die Säule gepresst werden muss. Im Gegensatz zur LC besitzen die verwendeten Säulen aber eine große Zahl an theoretischen Böden (8000 – 18000) bei einer kurzen Säulenlänge (üblich 3 - 25 cm) und geringem Durchmesser (1 – 5 mm). Eine Säule mit der gleichen Bodenzahl würde viel länger ausfallen, was wiederum zu einer Verbreiterung der Peaks führen würde. Die Herstellung ideal kugelförmiger Teilchen, die eine optimale Schichtung der festen Phase in der Säule ermöglichen, war zwingende Voraussetzung zum Erfolg der HPLC.

Im Bereich der HPLC gibt es vielfältige Anwendungen, die auf Adsorption, Flüssigverteilung, Ionenaustausch, Molekularsiebtrennung oder Affinitätstrennung basieren; wichtig ist jedoch, dass die stationären Phasen gegen hohe Drücke beständig sind.

Für die Adsorptionschromatographie lassen sich zwei unterschiedliche Methoden unterscheiden: bei der „normalen“, jedoch weniger häufig verwendeten, HPLC bestehen die Teilchen der festen Phase aus polaren Materialien oder Trägern, auf die polare Materialien aufgebracht sind. Die mobile Phase besteht daher aus unpolaren Lösungsmitteln. Bei der reverse phase (RP)-HPLC besteht die stationäre Phase aus unpolaren Materialien (Kohlenstoffketten, z.B. mit 8 oder 18 Atomen), der Eluent dementsprechend aus polaren Lösungsmitteln, denen eine unpolare Komponente zugesetzt wurde, die um die Bindung an der unpolaren Phase mit den Analyten konkurriert und der Analyt so eluiert werden kann.

A.1) Aufbau und Funktion einer HPLC-Apparatur

Anhand des Aufbaus einer HPLC-Apparatur lässt sich ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug zum Eluenten herausarbeiten; und zwar wird unterschieden, ob während des Trennprozesses konstant eine Zusammensetzung der mobilen Phase (isokratische Trennung) vorliegt oder diese während des Trennvorganges variiert wird (Gradientenelution). Darüber hinaus sei anzumerken, dass der Druck in der Säule konstant gehalten und Gasblasen in der Säule vermieden werden müssen; beides wird durch diverse technische Einrichtungen gewährleistet.

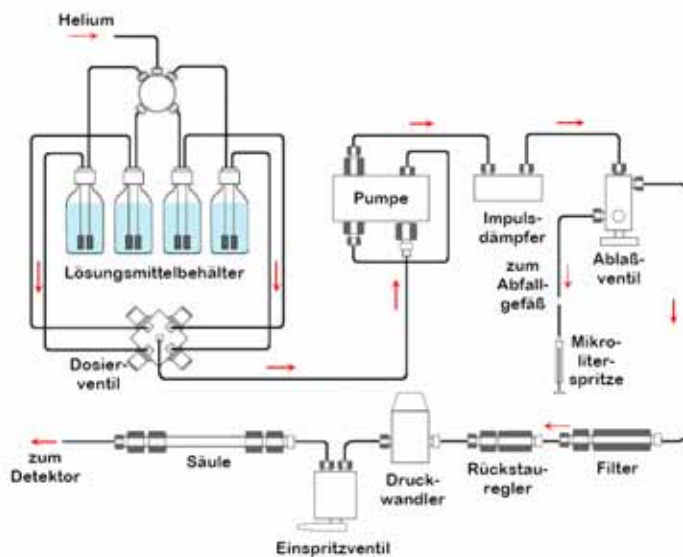


Abbildung A-3: Aufbau eines HPLC--Systems (ohne Detektor).

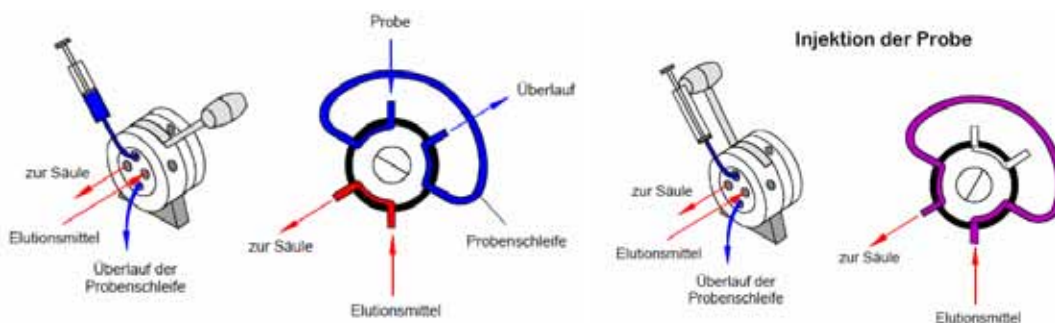


Abbildung A-4: Funktion der Probenschleife zum Probenauftrag auf die Säule.

B) AUSWERTUNG ZU TEIL 1

B.1) Versuchsergebnisse

Es wurde ein Stoffgemisch der folgenden Substanzen mit Hilfe der RP-HPLC getrennt. Die Trennung wurde bei verschiedenen Durchflussvolumina dV/dt durchgeführt.

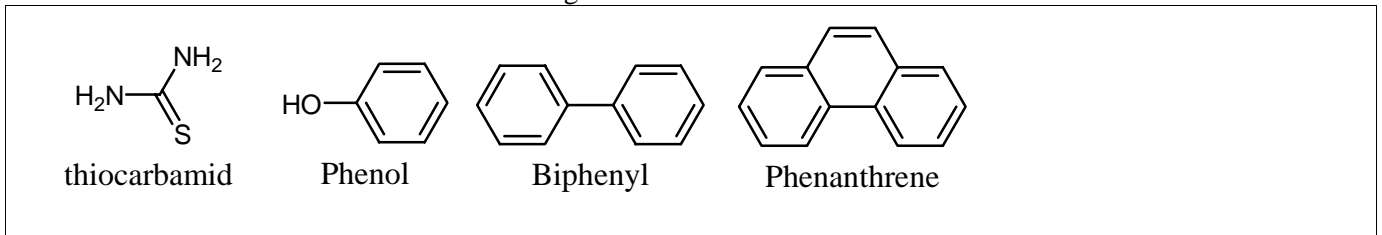


Abbildung B-1: Zusammensetzung des Substanzgemisches

Folgende Parameter sind in diesem Versuch gegeben:

Reverse Phase HPLC-Säule (unpolare stationäre Phase RP 18, 250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm)

Mobile Phase: isokratisch; 80 % Acetonitril und 0,1 % TFA in Wasser [Trifluoressigsäure]

Probenvolumen: 100 μL

Durchflussvolumen dV/dt : variabel mit 0,1 – 1,4 ml / min

Detektor: UV/Vis bei 254 nm

Aufzeichnung mit Schreiber (Integrator) und digital

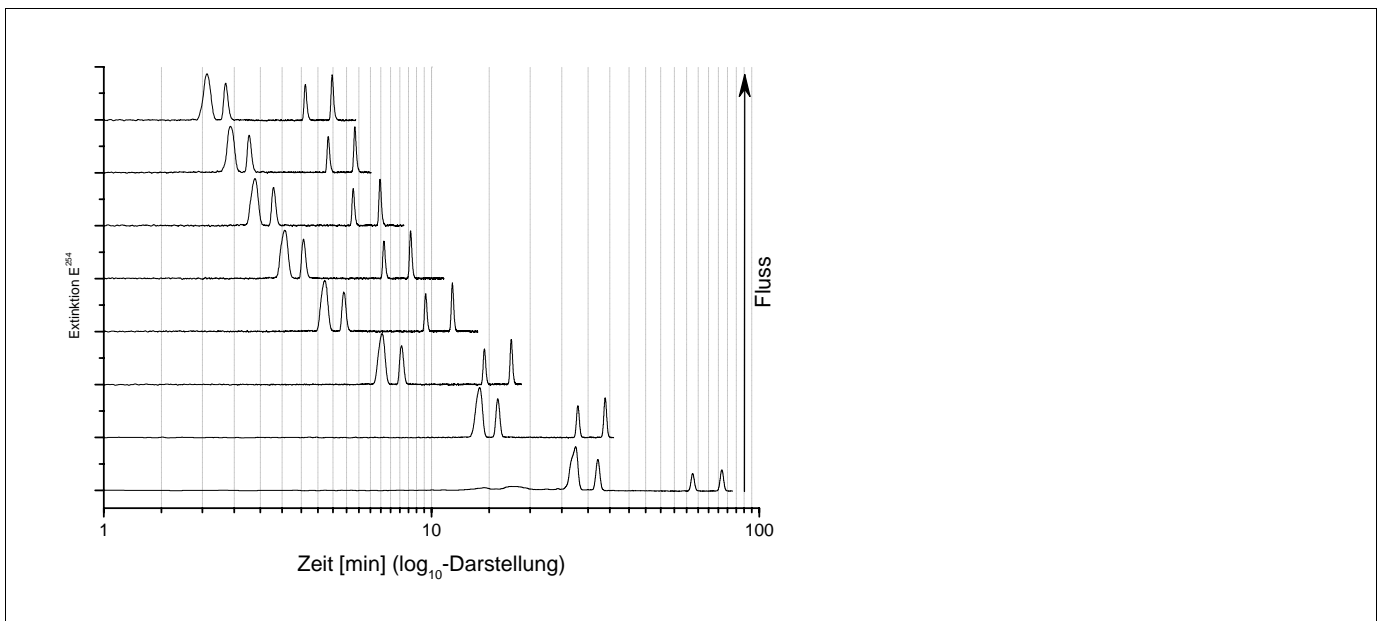


Abbildung B-2: Übersicht über die erhaltenen Chromatogramme (Zeit in logarithmischer Skalierung)

Für die folgende Auswertung wurden mit Hilfe von Origin die Parameter (Retentionszeit, Halbwertsbreite) der einzelnen Chromatogramme ermittelt.

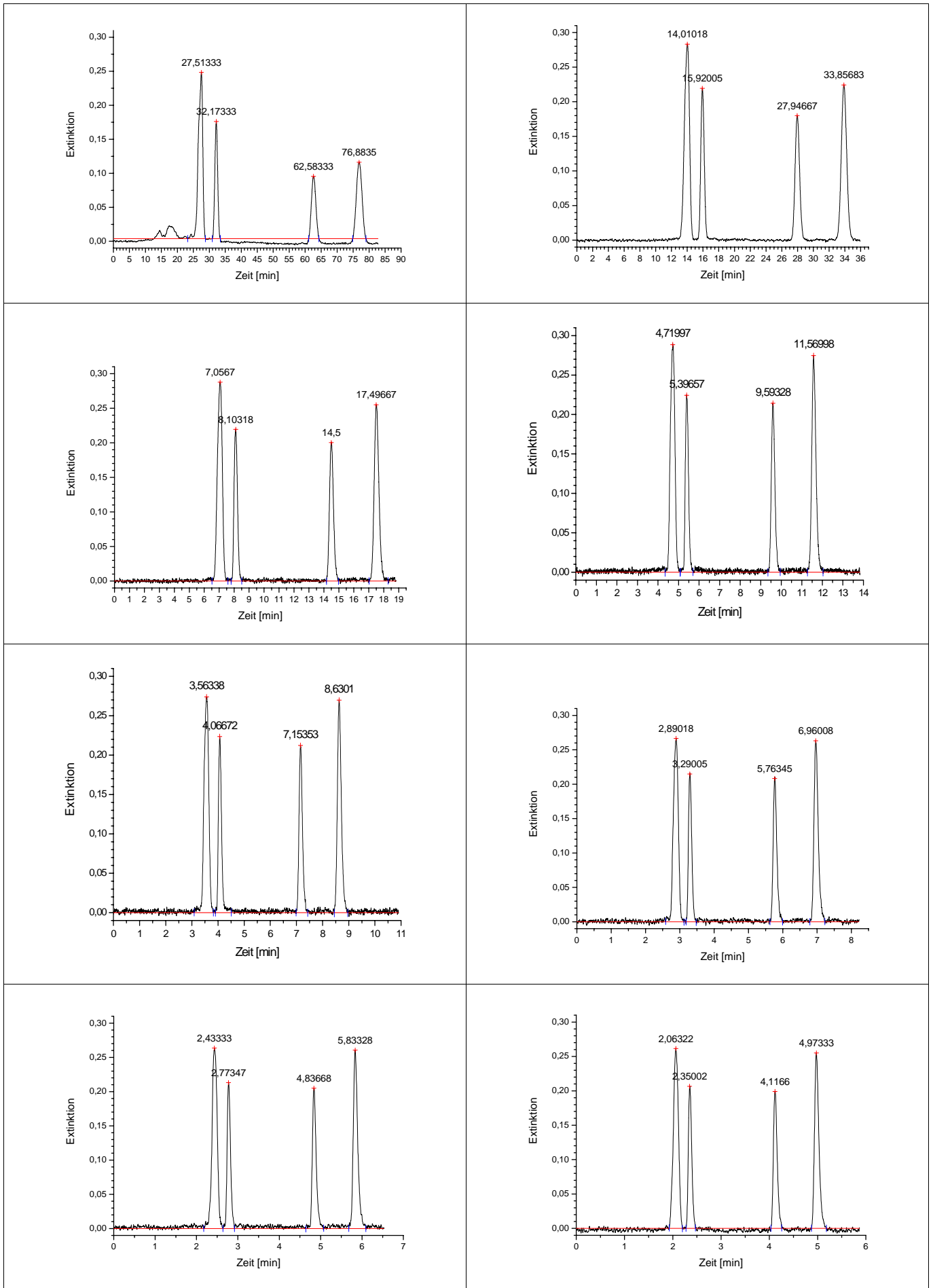


Diagramm B-1 (a-h): Chromatogramme (mit Basislinie und Retentionszeiten)

Thioharnstoff (Thiocarbamid) als kleines, polares Molekül wird von der Säule praktisch nicht retardiert und durchläuft daher mit der Geschwindigkeit des Eluenten die Säule. Mit seiner Hilfe (durch sein Auftreten im Chromatogramm) lassen sich folgende Parameter ermitteln:

- Totzeit t_0 (als Retentionszeit des Thioharnstoffs)
- effektive Retentionszeit $t_{\text{eff}} = t_R - t_0$
- lineare Strömungsgeschwindigkeit $u = L / t_0$ mit L: Säulenlänge
- Totvolumen V_0 der Säule $V_0 = t_0 \cdot dV/dt$ dV/dt : Durchflussvolumen
- Packungsdichte ε der Säule $\varepsilon = (V_S - V_0) / V_S$ V_S : Säulenvolumen

Des Weiteren lässt sich unter der Annahme einer idealen Gauß-Symmetrie der Peaks der Breite bestimmen. Es gilt:

$$b_b = 4\sigma \quad \text{und} \quad b_{0,5} = 2,354\sigma \quad \Rightarrow \quad b_b = \frac{4}{2,354} b_{0,5}$$

Tabelle B-1: Die Parameter der einzelnen Chromatogramme

Durchflussvolumen dV/dt [ml / min]	Peak	Fläche	Höhe	Retentionszeit t_R [min]	eff. Retentionszeit t_{eff} [min]	Halbwertsbreite $b_{0,5}$ [min]	Breite des Peaks b_b [min]
0,1	a	0,38587	0,24437	27,5168	0	1,61317	2,74115548
	b	0,17672	0,17217	32,1768	4,66	1,01683	1,72783347
	c	0,1732	0,09858	62,58667	35,06987	1,57	2,66779949
	d	0,26124	0,11918	76,88667	49,36987	1,99	3,38147833
0,2	a	0,21717	0,28314	14,01018	0	0,74	1,25743415
	b	0,1155	0,21927	15,92005	1,90987	0,48685	0,82727273
	c	0,12167	0,17992	27,94667	13,93649	0,63333	1,07617672
	d	0,18134	0,22415	33,85683	19,84665	0,76017	1,29170773
0,4	a	0,11008	0,28831	7,04663	0	0,37675	0,64018692
	b	0,0588	0,2201	8,10662	1,05999	0,2566	0,43602379
	c	0,06334	0,20136	14,50663	7,46	0,29	0,49277825
	d	0,09454	0,25527	17,49317	10,44654	0,34017	0,57802889
0,6	a	0,07527	0,28968	4,71653	0	0,25947	0,44090059
	b	0,0414	0,2251	5,39337	0,67684	0,1735	0,29481733
	c	0,04358	0,21484	9,60335	4,88682	0,18677	0,31736619
	d	0,06534	0,2749	11,57318	6,85665	0,21997	0,3737808
0,8	a	0,05845	0,27393	3,56338	0	0,2099	0,3566695
	b	0,03164	0,22351	4,06672	0,50334	0,13002	0,22093458
	c	0,03257	0,21222	7,15353	3,59015	0,14007	0,23801189
	d	0,04793	0,27088	8,63353	5,07015	0,15998	0,27184367
1,0	a	0,0451	0,26672	2,89018	0	0,16343	0,27770603
	b	0,02402	0,21625	3,2967	0,40652	0,10323	0,17541206
	c	0,02613	0,21033	5,77008	2,8799	0,1133	0,19252336
	d	0,03829	0,26312	6,96008	4,0699	0,13	0,22090059
1,2	a	0,03885	0,26361	2,43333	0	0,13327	0,22645709
	b	0,02058	0,21313	2,77347	0,34014	0,08675	0,14740867
	c	0,0224	0,20501	4,83668	2,40335	0,09682	0,16451997
	d	0,03272	0,2605	5,83328	3,39995	0,1133	0,19252336
1,4	a	0,03217	0,26154	2,06322	0	0,11353	0,19291419
	b	0,01704	0,20672	2,35665	0,29343	0,08012	0,13614274
	c	0,01841	0,1997	4,12003	2,05681	0,08332	0,14158029
	d	0,02708	0,25507	4,97333	2,91011	0,0966	0,16414613

Aufgrund der Moleküleigenschaften können wir die Substanzen den Peaks zuordnen: Da die Moleküle in der Säule anhand ihrer unterschiedlichen Adsorption an der unpolaren stationären Phase aufgetrennt werden, werden die Analyten nacheinander entsprechend ihrer Löslichkeit im polaren Eluenten bzw. ihrer hydrophoben WW mit der stationären Phase detektiert; daher entspricht a Thioharnstoff, b Phenol, c Biphenyl und d Phenanthren.

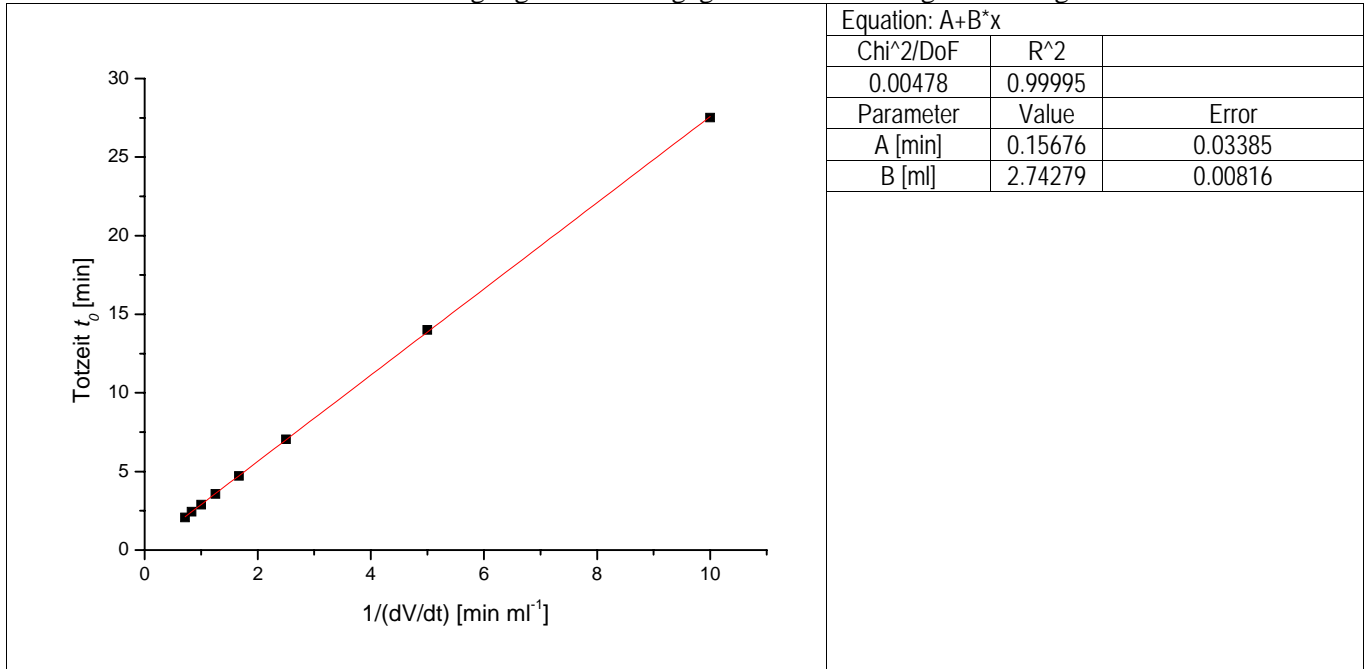
B.2) Bestimmung des Totvolumens und des Kapazitätsfaktors

Das Volumen der Säule berechnet sich über die Raumformel eines Zylinders:

$$V_S = \pi r^2 h \quad \text{mit} \quad r = 2,3 \text{ mm} \quad \text{und} \quad h = 250 \text{ mm}$$

$$V_S = 4,15 \text{ cm}^3 = 4,15 \text{ ml}$$

Das Totvolumen lässt sich durch Auftragung der Totzeit gegen die Durchflussgeschwindigkeit bestimmen:



Es gilt:

$$V_0 = t_0 * dV/dt \quad \text{liefert} \quad t_0 = V_0 * (dV/dt)^{-1}$$

$$V_0 = B = 2,74 \text{ ml}$$

Für den Kapazitätsfaktor (Porosität) gilt:

$$\varepsilon = \frac{V_S - V_0}{V_S} \quad \text{mit} \quad V_S = 4,15 \text{ ml}$$

$$\text{und} \quad V_0 = 2,74 \text{ ml}$$

$$\varepsilon = 0,340$$

Wie aus der Gleichung zu ersehen ist, gibt die Porosität Auskunft über das Verhältnis der Volumina von fester und flüssiger Phase in der Säule, nicht aber über die Güte der Packung selbst (siehe van-Deemter-Gleichung).

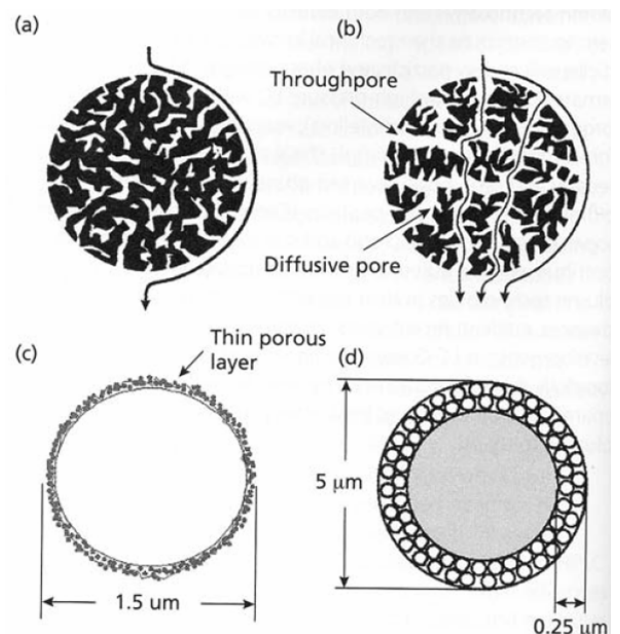


Abbildung B-3: Stationäre Phasen unterschiedlicher Porosität (a) vollst. Porös (b) mit Perfusionen für die mobile Phase (c) nichtporös mit poröser Oberfläche (d) nichtporös mit poröser Schale.

2.a. Bestimmung von Kapazität, Selektivität und Auflösung

Zur Bestimmung dieser Größen wird das effektive Retentionsvolumen benötigt. Dieses ergibt sich aus dem Retentionsvolumen sowie dem Totvolumen durch Subtraktion:

$$V_R^{eff} = V_R - V_0 = t_R \frac{dV}{dt} - V_0$$

Das Totvolumen wurde oben (siehe) mit Hilfe von linearer Regression bestimmt. Die Kapazität k' ist ein Maß für das Rückhaltevermögen der stationären Phase bezüglich eines Analyten und ergibt sich aus dem Verhältnis seines effektiven Retentionsvolumens zum Totvolumen der Säule, sie ist unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit und der Säulenlänge:

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{V_R^{eff}}{V_0} = \frac{t_R^{eff}}{t_0}$$

Das effektive Retentionsvolumen und die Kapazität sind vom Fluss nahezu unabhängig, weswegen die einzelnen Werte für die unterschiedlichen Durchflussgeschwindigkeiten berechnet und dann gemittelt werden. Rein formal lassen sich hier auch für Thioharnstoff effektives Retentionsvolumen und Kapazität angeben, da sich die hier aufgeführten Retentionsvolumina vom durch Regression ermittelten Retentionsvolumen unterscheiden, jedoch sollten V_R^{eff} und k' für Thioharnstoff ungefähr null sein. Die Kapazität stellt eine von den Versuchsbedingungen (relativ) unabhängige Kenngröße dar, was einen Vergleich zwischen verschiedenen Labors ermöglicht.

Tabelle B-2: Effektives Retentionsvolumen und die Kapazität k' der Analyten

dV/dt [ml / min]	effektives Retentionsvolumen [ml]				Kapazität k'			
	Thioharnstoff	Phenol	Biphenyl	Phenanthren	Thioharnstoff	Phenol	Biphenyl	Phenanthren
0,1	0,01	0,47	3,52	4,95	0,00	0,17	1,28	1,80
0,2	0,06	0,44	2,85	4,03	0,02	0,16	1,04	1,47
0,4	0,08	0,50	3,06	4,25	0,03	0,18	1,12	1,55
0,6	0,09	0,49	3,02	4,20	0,03	0,18	1,10	1,53
0,8	0,11	0,51	2,98	4,16	0,04	0,19	1,09	1,52
1,0	0,15	0,55	3,03	4,22	0,05	0,20	1,10	1,54
1,2	0,18	0,59	3,06	4,26	0,06	0,21	1,12	1,55
1,4	0,15	0,56	3,03	4,22	0,05	0,20	1,10	1,54
Mittelwert	0,10	0,51	3,07	4,29	0,04	0,19	1,12	1,56
Standardabw.	0,05	0,04	0,18	0,26	0,02	0,02	0,07	0,09
rel. Fehler	50,7	8,7	5,9	6,0	50,7	8,7	5,9	6,0

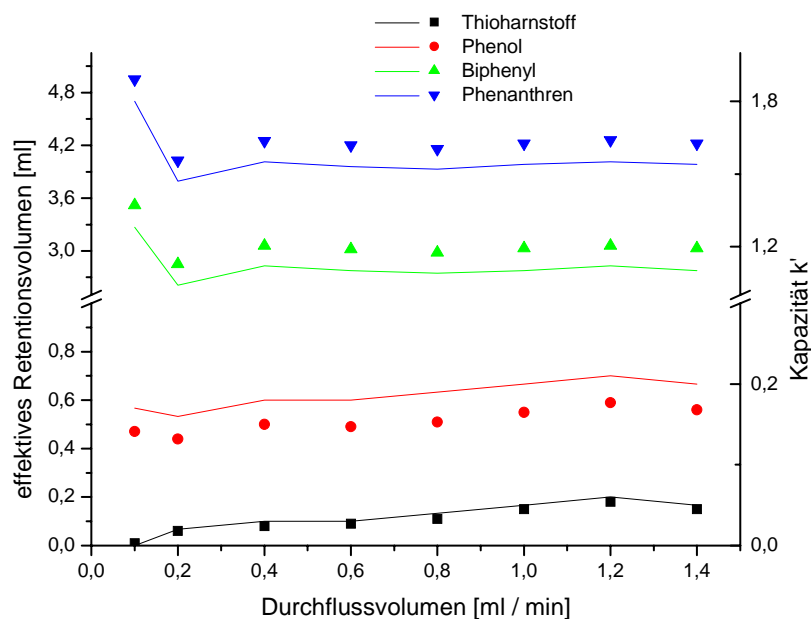


Diagramm B-2: effektive Retentionsvolumina und Kapazitäten in Abhängigkeit des Durchflussvolumens

Die Selektivität gibt an, wie gut zwei Substanzen im vorliegenden Chromatogramm unterscheidbar sind. Sie wird über

$$\alpha_{ji} = \frac{k'_j}{k'_i} = \frac{K_j}{K_i}$$

berechnet. Die Selektivität gibt darüber hinaus das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten an, stellt also ein Bindeglied zur thermodynamischen Beschreibung der Chromatographie dar. Für unsere Analyten (ohne Thioharnstoff) lassen sich folgende Selektivitäten ermitteln:

Tabelle B-3: Selektivität einzelner Analytpaare

dV/dt [ml / min]	Biphenyl und Phenol	Phenanthren und Biphenyl	Phenanthren und Phenol
0,1	7,40	1,41	10,41
0,2	6,45	1,42	9,13
0,4	6,12	1,39	8,51
0,6	6,12	1,39	8,52
0,8	5,84	1,40	8,16
1	5,47	1,39	7,61
1,2	5,23	1,39	7,27
1,4	5,44	1,39	7,58

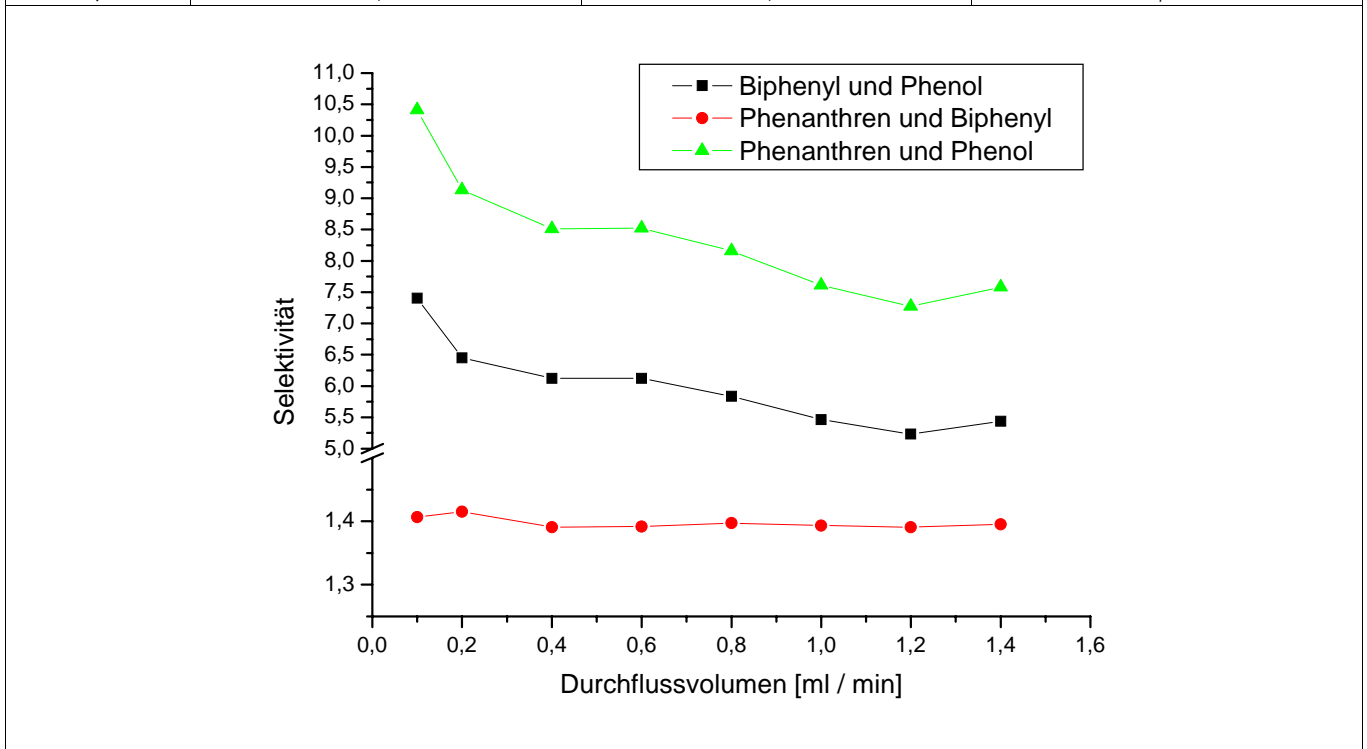


Diagramm B-3: Selektivitäten in Abhängigkeit des Durchflussvolumens

Es zeigt sich eine Tendenz zum Abfall der Selektivität bei höheren Durchflussvolumina, was verwunderlich ist, da die Kapazitäten vom Durchflussvolumen unabhängig sein sollten.

Die Auflösung gibt ein von der Bodenhöhe abhängiges Maß für die Trennbarkeit zweier Substanzen an:

$$R = \frac{2(t_j - t_i)}{b_j^b + b_i^b} = \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k'}{k' + 1}$$

Die Auflösung sollte – wie die Selektivität – nur für direkt benachbarte Peaks angegeben werden – jedoch lassen sich auch Werte für Peaks berechnen, zwischen denen ein weiterer liegt, diese Werte erhalten praktische Bedeutung, wenn der dazwischen liegende Peaks nicht vorhanden wären, wenn im Versuch demnach ein Gemisch ohne Biphenyl aufgetrennt worden wäre.

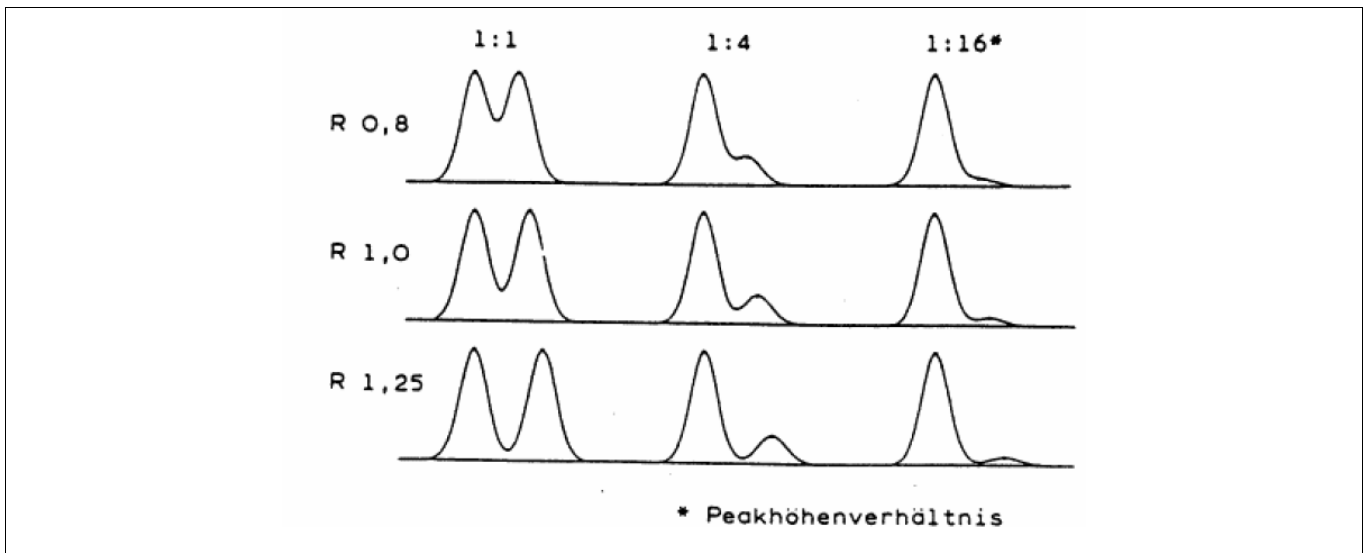


Diagramm B-4 Die Auflösung zweier benachbarter Peaks (nach L.R. Snyder und J.J. Kirkland, *Modern Liquid Chromatography*, Seite 35)

Für die Auflösung kann man folgende Fälle unterscheiden: $R = 0,5$: keine zwei Maxima; $R = 0,75$ zwei gerade noch getrennte Maxima; $R = 1,00$ es verbleiben 10% Peaküberlappung; vollständige Trennung: R mindestens 1,25.

Tabelle B-4: Die Auflösung für einzelne Analytpaare

dV/dt [ml / min]	Thioharnstoff und Phenol	Phenol und Biphenyl	Biphenyl und Phenanthren	Phenol und Phenanthren
0,1	2,09	13,84	4,73	17,50
0,2	1,83	12,64	4,99	16,93
0,4	1,97	13,78	5,58	18,51
0,6	1,84	13,75	5,70	18,49
0,8	1,74	13,45	5,81	18,53
1	1,79	13,44	5,76	18,49
1,2	1,82	13,23	5,58	18,00
1,4	1,78	12,70	5,58	17,43

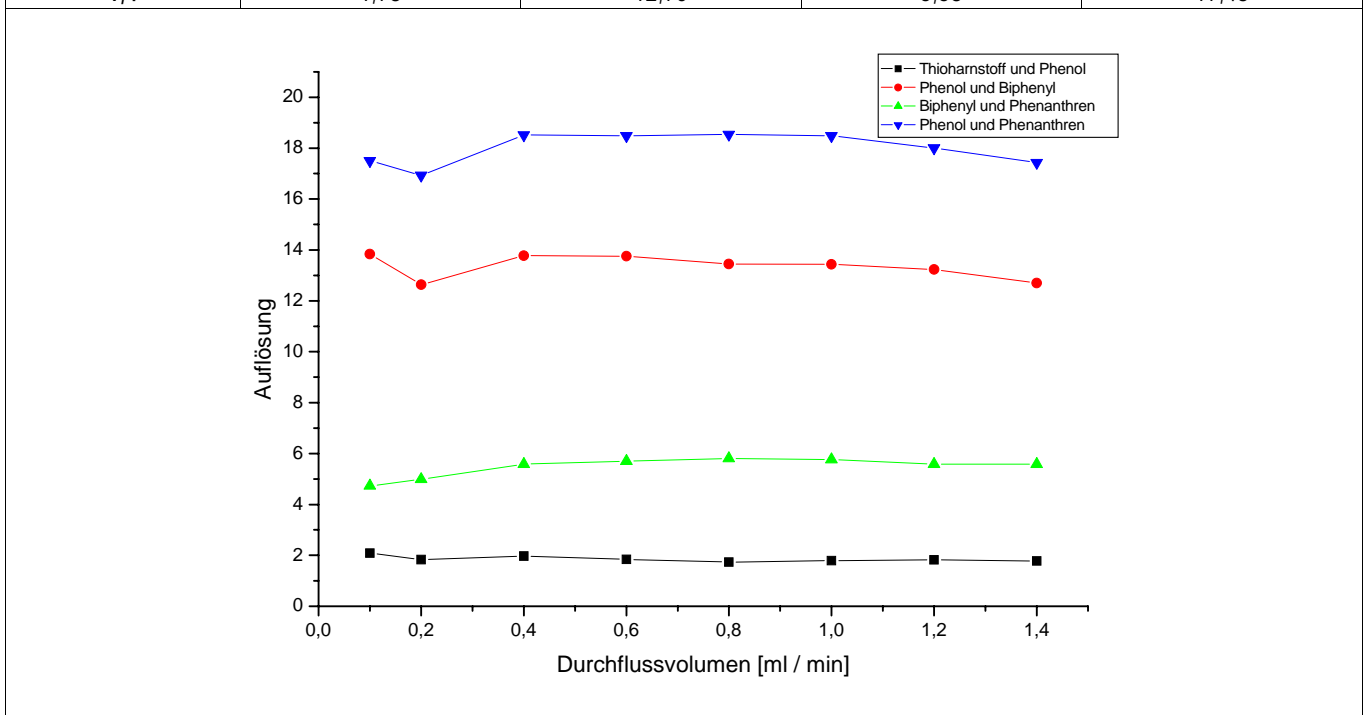


Diagramm B-4: Auflösungen in Abhängigkeit des Durchflussvolumens

B.3) Bestimmung von Bodenzahl, Bodenhöhe und des optimalen Durchflussvolumens

3.a. Bestimmung der Bodenzahlen und Bodenhöhe

Mit Hilfe der Retentionszeiten und den Halbwertsbreiten (in min) der Analyten lassen sich die theoretischen Bodenzahlen sowie unter Berücksichtigung der Säulenlänge die Bodenhöhen (HETP) bezüglich eines Analyten berechnen; es gilt:

$$n = 5,54 \left(\frac{t_R}{b^{0,5}} \right)^2$$

$$HETP = h = \frac{L}{n} = L \left[5,54 \left(\frac{t_R}{b^{0,5}} \right)^2 \right]^{-1}$$

Darüber hinaus lässt sich aus der Totzeit sowie der Säulenlänge für ein Durchflussvolumen (in ml / min) die lineare Flussgeschwindigkeit (Fluss, in mm / min) als durchschnittliche Geschwindigkeiten des Eluenten in der Säule berechnen.

Tabelle B-5: Fluss, Bodenzahlen und Bodenhöhen der Analyten bei unterschiedlichen Durchflussgeschwindigkeiten

dV/dt [ml / min]	u [mm / min]	Thioharnstoff		Phenol		Biphenyl		Phenanthren	
		N	h [mm]	N	h [mm]	N	h [mm]	N	h [mm]
0,1	9,09	1612	0,1551	5548	0,0451	8804	0,0284	8270	0,0302
0,2	17,84	1986	0,1259	5924	0,0422	10787	0,0232	10990	0,0227
0,4	35,48	1938	0,1290	5529	0,0452	13863	0,0180	14651	0,0171
0,6	53,01	1831	0,1366	5353	0,0467	14647	0,0171	15335	0,0163
0,8	70,16	1597	0,1566	5420	0,0461	14450	0,0173	16134	0,0155
1,0	86,50	1733	0,1443	5650	0,0442	14369	0,0174	15880	0,0157
1,2	102,74	1847	0,1354	5663	0,0441	13825	0,0181	14685	0,0170
1,4	121,17	1830	0,1366	4793	0,0522	13546	0,0185	14684	0,0170

3.b. Die van-Deemter-Gleichung und die Diffusion in Säulen.

Mit der Auftragung der linearen Strömungsgeschwindigkeit gegen die Bodenhöhe lässt sich die Gültigkeit der van-Deemter-Gleichung überprüfen. Sie hat die analytische Form:

$$h(u) = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Mit Hilfe einer nichtlinearen Anpassung dieser Gleichung an die Messwerte lassen sich die Parameter A, B, C der Gleichung für die einzelnen Analyten ermitteln.

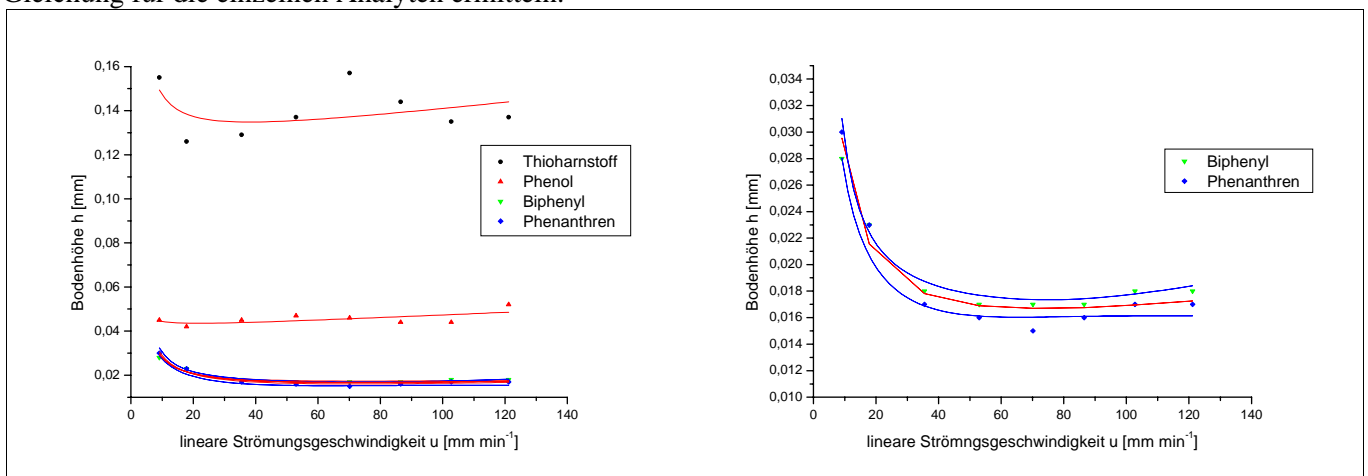


Diagramm B-5: (a) Auftragung der Bodenhöhe gegen den Fluss u mit Anpassung an die van-Deemter-Gleichung. (b) Vergrößerung des Bereiches für Biphenyl und Phenanthren, blaue Banden entsprechen 95%-Vertrauensbereich.

Die Übereinstimmung zwischen den ermittelten Bodenhöhen und der van-Deemter-Gleichung lässt sich anhand der Regressionsergebnisse ermitteln. Wie zu ersehen ist, finden wir für Thioharnstoff eine minimale Übereinstimmung,

was damit zu erklären ist, dass dieser als polare Substanz mit der Säule nicht wechselwirkt und somit eine Anwendung der van-Deemter-Gleichung nicht möglich ist. Ein besseres, aber immer noch mit großen Fehlern behaftetes Ergebnis finden wir für Phenol. Die besten Ergebnisse finden wir für die beiden Substanzen mit der stärksten Retardierung, also Biphenyl und Phenanthren. Die Anpassung liefert hier sehr gute Ergebnisse, mit Hilfe derer sich die optimale Flussgeschwindigkeit ermitteln lässt.

Tabelle B-6: Ergebnisse der Anpassung an die van-Deemter-Gleichung

	Thioharnstoff		Phenol		Biphenyl		Phenanthren		Biphenyl, Phenanthren	
χ^2 / dh	0,00015		7,95E-02		6,32E-03		8,51E-03		1,04E-02	
R^2	0,18363		0,35739		0,97125		0,97672		0,95386	
	Wert	Fehler	Wert	Fehler	Wert	Fehler	Wert	Fehler	Wert	Fehler
A [mm]	0,12273	0,01824	0,0409	0,00427	0,01377	0,0012	0,01119	0,0014	0,01248	0,00109
B [mm ² min ⁻¹]	0,00016	0,00019	0,00006	0,00004	0,00002	0,00001	0,00003	0,00001	0,00003	0,00001
C [min]	0,2292	0,21612	0,02855	0,05056	0,13195	0,01426	0,17317	0,01654	0,15256	0,01296

Um die optimale Flussgeschwindigkeit bzw. die optimale Durchflussgeschwindigkeit zu finden, suchen wir das Minimum der van-Deemter-Gleichung und erhalten

$$\frac{dh}{du} = C - \frac{B}{u^2} \quad \Leftrightarrow \quad 0 = C - \frac{B}{u_{\min}^2} \quad \Leftrightarrow$$

$$C = \frac{B}{u_{\min}^2} \quad \Leftrightarrow \quad u_{\min} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

Analog gilt für H_{\min} :

$$H_{\min} = A + 2\sqrt{BC}$$

Mit Hilfe der Parameter A, B, C (aus den Daten von Biphenyl und Phenanthren gewonnen) lassen sich die optimalen Geschwindigkeiten, die minimale Bodenhöhe sowie die maximale Bodenzahl bestimmen:

$$u_{\min} = 71,31 \text{ mm / min} \quad (dV/dt)_{\min} = 0,82 \text{ ml / min}$$

$$H_{\min} = 0,017 \text{ mm} \quad N_{\max} = 14918$$

Verbleibt noch die Frage nach der Bedeutung der Parameter A, B, C der van-Deemter-Gleichung:

$$A = 2 \lambda d_p \quad \text{mit: } \lambda: \text{ „Packungsfaktor“}$$

d_p : durchschnittlicher Teilchendurchmesser

Parameter A beschreibt die **Eddy-Streudiffusion** in der Säule. Beim Durchlaufen der Probemoleküle durch die Säule legen diese geringfügig unterschiedliche Wege zurück – Probemoleküle, die große Teilchen der stationären Phase umrunden müssen, brauchen länger als Probemoleküle, die kleine Teilchen der festen Phase umgehen. Resultierend daraus können sich bei ungleicher Packung Strömungsbereiche entwickeln, die Probemoleküle schneller transportieren als in anderen Bereichen der Säule. Finden sich sehr poröse Partikel, sind strömungshemmende Effekte in den Vertiefungen der Partikel ebenfalls von Bedeutung.

$$B = 2 D_m \gamma \quad \text{mit } D_m: \text{ Diffusionskonstante der Probe in der mobilen Phase}$$

γ : Faktor für die Diffusionshemmung durch die Packung

Parameter B beschreibt die **longitudinale Diffusion** (also ggf. auch entgegen der Flussrichtung), also den Einfluss der molekularen Diffusion entlang der Säulenachse. Die Longitudinaldiffusion ist abhängig davon, wie lange sich die Probenmoleküle in der mobilen Phase befinden (hohe Strömungsgeschwindigkeiten bedeuten kürzere Verweilzeiten).

$$C = \omega * d_p^2 / D_s \quad \text{mit: } D_s: \text{ Diffusionskonstante für Probe in der mobilen Phase}$$

ω : Porengrößen(-verteilung), Form und Größenverteilung der stat. Phase

Parameter C beschreibt zwei wichtige Vorgänge: Die Kinetik der Absorption und den **Massentransfer** (durch Diffusion). Eine zu hohe Flussgeschwindigkeit kann die Einstellung des Gleichgewichtes verhindern.

Die van-Deemter-Gleichung wurde ursprünglich für die Gaschromatographie entwickelt, es gibt modifizierte Gleichungen für die Anwendungen in der HPLC. Vor allem die Diffusionskonstanten sind in der Gaschromatographie viel größer. Vor allem bei Parameter A ist fraglich, inwieweit dieser gültig sein kann, da in der HPLC sehr einheitliche Partikel verwendet werden.

C) AUSWERTUNG ZU TEIL 2

C.1) Peptide mapping

Peptide mapping ist ein Verfahren zum Vergleich der Primärsequenz von Proteinen. Es macht eine qualitative Analyse des Proteins unter Erkennung kleinster Sequenzunterschiede möglich. Durch Verdau mit Proteasen oder mit chemischen Agentien und anschließender chromatographischer Auftrennung ergibt sich durch das Elutionsprofil ein charakteristischer fingerprint. Die Technik des Peptide Mapping wird für diverse analytische Untersuchungsmethode verwendet (Expressionskontrolle, Vergleich von Syntheseprodukten, Untersuchung von Modifikationen nach der Translation).

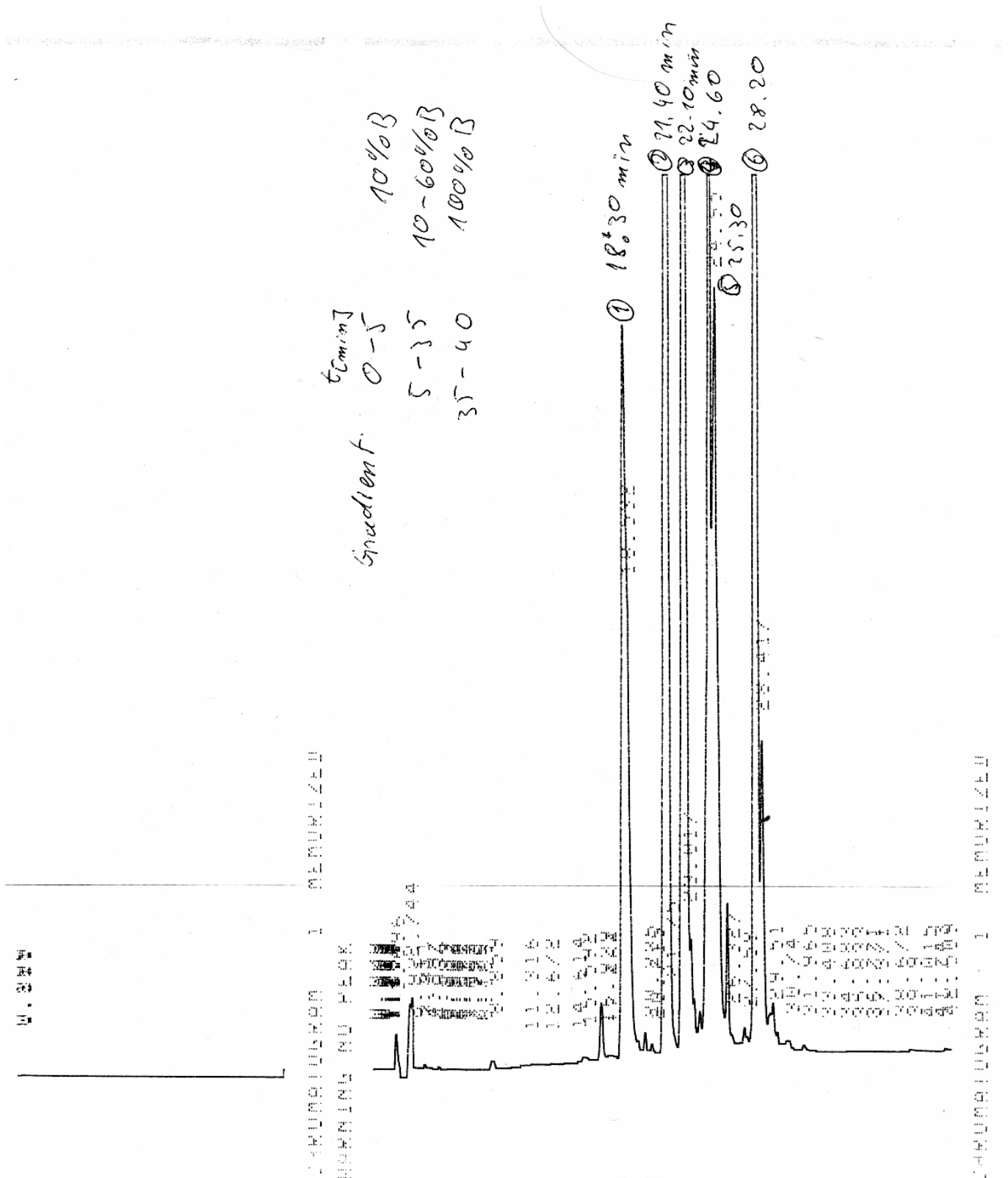
C.2) Versuchsergebnisse

2.a. Durchführung und Parameter

Die Proteinfragmente eines Multienzymverdaus sollen für nachfolgende Untersuchungen (Massenspektrometrie, Sequenzierung) chromatographisch getrennt werden. Dies geschieht durch Gradientenelution mit Hilfe einer RP-HPLC-Säule; die Fraktionen werden wie im obigen Versuch durch UV-Absorption detektiert und manuell die Fraktionen manuell aufgefangen. Fünf Fraktionen konnten gut voneinander getrennt und gesammelt werden.

Detektionswellenlänge:	218 nm	
Flussrate:	1,0 ml/min	
Injektionsschleife:	100 µl	
Eluenten:	Puffer A:	H ₂ O + 0,1 % TFA
	Puffer B:	80 % Acetonitril + 0,1 % TFA
Elution:	0 – 5 min:	10 % B
	5 – 35 min:	10 – 60 % B (linear)
	35 – 40 min:	60 – 100 % B (linear)

2.b. Erhaltenes Chromatogramm



C.3) Beantwortung der Fragen

Warum empfiehlt sich bei der Fraktionierung der Spaltpeptide eine Gradientenelution und keine isokratische Elution? Erklären Sie den Sinn der Stufe (10 % B) zu Beginn der Trennung.

Die zu trennenden Moleküle (Peptidfragmente) sind nach dem Verdau durch Proteasen sehr unterschiedlich in ihren Eigenschaften (Molekulargewicht und Polarität), so dass bei einer isokratischen Elution eine Trennung nicht funktioniert, wenn die kleinen Fragmente zu schnell wandern und die großen Fragmente zu lange brauchen, um von

der Säule eluiert zu werden. Die Peaks der kleinen Moleküle würden so sehr eng beieinander liegen und damit nicht fraktionierbar sein, die Peaks der großen Moleküle würden erst sehr spät und deutlich verbreitert erscheinen.

Mit Hilfe der Gradientenelution (hier: lineare Veränderung der Eluentenzusammensetzung) können die Peaks der kleinen Moleküle mit niedrigen Retentionszeiten gestreckt werden, eine Auftrennung der niedermolekularen Fraktionen wird so ermöglicht; gleichzeitig werden die Peaks der höhermolekularen Fragmente nach vorne verschoben und gestaucht. Das Ergebnis ist eine deutlich schnellere und effektivere Auftrennung der Moleküle.

Zunächst wird mit 90 % Wasser und 10 % Puffer B eluiert; hierdurch werden einzelne Aminosäuren oder sehr kurze unspezifische Fragmente sowie Puffersalze, die allesamt aufgrund ihrer hohen Polarität nur wenig retardiert werden, direkt von der Säule entfernt und können so die Hauptfraktionen nicht verunreinigen.

In welchem Konzentrationsbereich (% B) erwarten Sie die Elution von Peptiden im Allgemeinen unter den gegebenen Bedingungen?

Die Elution erfolgt bei der RP-HPLC durch den Zusatz von Acetonitril (relativ unpolares organisches Lösungsmittel), was mit den adsorbierenden Molekülen über hydrophobe Wechselwirkungen um eine Bindung in der (unpolaren) stationären Phase konkurriert. Während der isokratischen Elution mit 10 % B in den ersten 5 Minuten werden nur o.g., für die Sequenzbestimmung unbrauchbare Stoffe eluiert. Der Grund dafür sind die schwachen Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial, so dass schon geringe Mengen Acetonitril zur Verdrängung reichen. Es wurde daher nur ein nennenswerten Peak gemessen, der jedoch nicht aufgefangen wurde.

Die Elution der aufgetrennten Peptidfragmente erfolgt dann während der Gradientenelution in der Reihe abnehmender Polarität; das Lösungsmittel sollte hier schon ausreichen, um alle Fragmente zu eluieren. Während der letzten 10 Minuten (100 % B) werden allenfalls noch sehr große, unvollständig verdaute Proteinf Fragmente eluiert. Das Chromatogramm zeigt hier jedoch keine Peaks mehr, wir können daher annehmen, dass der Verdau des Proteins quantitativ war.

Welche Unterschiede ergeben sich bei der RP-HPLC beim Übergang von niedermolekularen Molekülen wie in (1) zu Peptiden bzw. Proteinen?

Die großen Proteinf Fragmente diffundieren viel weniger stark als kleine Moleküle; dies ist bei der Wahl der Säule (Porengröße, Länge der hydrophoben Linker) zu beachten. Bei der Auftrennung von Proteinen können diese über ggf. vorhandene hydrophobe Bereiche sehr starke Bindungen zur Oberfläche der stationären Phase ausbilden, so dass das Protein denaturiert und ausfällt oder durch einen höheren Anteil an organischen Lösungsmitteln die Löslichkeit des Proteins herabsetzt und eventuell eine Denaturierung bewirkt.

Fehlen hydrophobe Linker, liegt also der polare Träger (Kieselsäure) frei, so kann eine ungewollte Ionenaustauschreaktion auftreten, die ggf. (bei Proteinen mit einem hohem Anteil an geladenen Aminosäuren) zu starker Retardierung oder zum Verlust des Peptids führen kann.

Einige Proteine gewinnen nach ihrer Aufreinigung nicht ihre volle physiologische Aktivität zurück, andere zeigen eine erhöhte Aktivität. Soll die physiologische Aktivität eines Proteins erhalten, empfiehlt sich die Verwendung spezieller Säulenmaterialien, vor allem um eine Vergiftung mit Schwermetallen zu vermeiden.