

## Einführung in DSP - Chromatographie

### Ihre Ziele:

Am Ende der Lektion sollten Sie in der Lage sein, den Prozess der Chromatographie in groben Zügen wiederzugeben und zu erklären, welche Trennungen stattfinden.

Einer der wichtigsten Aspekte der Herstellungsprozesse bei Biogen ist die Gewinnung und Aufreinigung eines einzelnen Zielproteinmoleküls. Das Molekül liegt typischerweise in Lösung vor und muss von den anderen Komponenten in der Lösung isoliert werden.

Die Chromatographie bietet eine Methode zur Trennung von Molekülen aus komplexen Lösungen. Durch Analyse der Eigenschaften eines Zielmoleküls kann es von anderen Molekülen in einer Lösung unterschieden werden. Das Zielmolekül kann dann mit den entsprechenden Chromatographieverfahren getrennt werden.

Die Chromatographie-Methoden und die Anzahl der Chromatographie-Schritte hängen von der chemischen Zusammensetzung des Moleküls sowie von dem für das Endprodukt benötigten Reinheitsgrad ab. Im Allgemeinen handelt es sich bei Chromatographieverfahren um eine bestimmte Art von Bindungsinteraktion, die reversibel ist. Chromatographie-Methoden sind so leistungsfähig und präzise, dass sie oft Proteine unterscheiden können, die sich in ihrer Zusammensetzung nur um eine einzige Aminosäure oder sogar nur um ein einziges Atom unterscheiden. Da die Bedingungen und Prozesse der Chromatographie schonend sind, ermöglicht sie zudem eine zuverlässige Trennung von empfindlichen, hoch fragilen Komponenten.

Die Chromatographie hat zwei Phasen: die stationäre und die mobile Phase, die sich jeweils in eine bestimmte Richtung bewegen und typischerweise für die Zulassung von Proteinmedikamenten erforderlich sind.

### Am einfachsten lässt sich die Chromatographie erklären, wenn man sie mit einem reissenden Fluss vergleicht:

Ein reissender Fluss kann eine Menge Treibgut mit sich führen. Die Geschwindigkeit, mit der Treibgut bewegt wird, hängt (1) von der Art des Treibguts (d. h. Sandkörner werden schneller transportiert als Kieselsteine) und (2) von der Beschaffenheit des Flussbetts (d. h. raue Oberflächen erhöhen die Reibung des Treibguts und verlangsamen oder hemmen so die Geschwindigkeit der Entfernung) von der Fließgeschwindigkeit ab.

In der Chromatographie werden verschiedene Substanzen (= Treibgut im "Fluss") in der sogenannten mobilen Phase (= "Flusswasser") auf einer stationären Phase (= "Flussbett") transportiert. Durch die Wechselwirkungen\* zwischen Probe, stationärer Phase und mobiler Phase werden die einzelnen Stoffe unterschiedlich schnell transportiert und sind deshalb voneinander getrennt und unterscheidbar, wenn zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Gemisch aus "Sand", sehr kleinen und etwas grösseren "Kieselsteinen" in den "Fluss" eingebracht wird;

nach 100 Metern kommt gemäss der Analogie zuerst der ganze Sand an (verteilt über einige Meter), nach einer gewissen Wartezeit folgen alle kleineren Kieselsteine und viel später alle grösseren Partikel, jeweils über eine gewisse Strecke verstreut.

Die Flussanalogie ist in der Tat anschaulich genug für ein erstes Verständnis des Prozesses der Chromatographie (obwohl der tatsächliche Prozess in der Chromatographie vielleicht eher an einen digitalen Prozess erinnert, der als "Stop-and-Go-Verkehr" bekannt ist), wobei die Probenmoleküle entweder in der mobilen Phase mitgeführt werden (analog zu einem "leichten Floss", das passiv in einer Strömung getragen wird) oder an der stationären Phase haften (bei "Nullgeschwindigkeit"). Die Moleküle schalten sehr schnell zwischen diesen beiden Möglichkeiten hin und her (vacillieren), und Wärmewellen wirken wie 'Schocks'.

Die Analogie des Flussbettes unterscheidet sich jedoch insofern, als die Verzögerungen, die die verschiedenen Probenmoleküle (durch das chromatographische System) erleiden, nicht für das Reibungsphänomen verantwortlich sind. Die Grundlage für das Verständnis dieses Unterschieds liegt in der Verteilung der verschiedenen Molekültypen (Typ A, B, C usw.), die Unterschieden im durchschnittlichen Zeitanteil entsprechen, den die einzelnen Moleküle in der mobilen Phase verbringen). Die Chromatographie ermöglicht es, solche Unterschiede in "Geschwindigkeitsunterschiede" umzuwandeln und damit für eine Trennung wirklich effektiv zu machen, ohne die diese winzigen (winzigen) Unterschiede nicht genutzt werden könnten, weder für Trenn- und Reinigungsvorgänge noch für richtige Analysen/Analysen.

\* (Zu Wechselwirkungen siehe die Prinzipien der "Trennung unter Trennung").

## **Das Verfahren**

Es werden vier Phasen der Chromatographie angewendet:

1. Etablierung des Flusses der mobilen Phase,
2. Injektion der zu trennenden Probe,
3. Tatsächliche Trennung, und
4. Detektion der Komponenten

Der Fluss der mobilen Phase wird auf drei Arten erreicht: durch Druck (z. B. Hydraulikpumpe, Gasdruck), durch Kapillarkraft oder anschliessend durch Anlegen einer elektrischen Spannung.

Die Injektion (d. h. das Einbringen des Substanzgemisches in das chromatographische System) erfolgt entweder, bevor der Fluss der mobilen Phase hergestellt ist (Dünnschichtchromatographie) oder während die mobile Phase bereits im Fluss ist. Bei einer grossen Anzahl von Proben werden bei automatisierbaren Chromatographiearten sogenannte Autosampler (mit eigenem Datenerfassungssystem) eingesetzt, die die Proben vollautomatisch injizieren.

Die eigentliche Trennung des Stoffgemisches erfolgt auf der Trennstrecke. Schliesslich ist (wie auch bei der Trennstrecke) die Chromatographie ohne Detektion (∴ Sichtbarmachen des Durchgangs einer Substanz durch einen bestimmten Abschnitt des Chromatographiesystems oder des Stillstands einer Substanz nach Beendigung des Prozesses) nicht denkbar. Für jede

Art der Chromatographie werden unterschiedliche Nachweissysteme angewandt, entweder durch Ausnutzung physikalischer Eigenschaften (z. B. Lichtabsorption, Fluoreszenz, Lichtstreuung und Wärmeleitfähigkeit) der Substanzen oder durch Gewinnung eines Signals durch chemische Reaktionen, z. B. durch eine Färbung bei der **planaren Chromatographie** (z. B. Aminosäuren mit Ninhydrin), oder durch Reaktionen, die vor der Trennung (Vorsäulenderivatisierung) oder sonst nach der Trennung (Nachsäulenderivatisierung) durchgeführt werden, bei der **Säulenchromatographie**. Bei der **präparativen Chromatographie** wird zusätzlich ein Fraktionssammler benötigt, um die abgetrennte Substanz zu sammeln.

Chromatographische Aufreinigungsverfahren sind konstruktionsbedingt immer Batch-Prozesse. Das bedeutet, dass immer nur eine bestimmte Substanzmenge aufgetragen (injiziert) und aufgetrennt werden kann, bevor mit der nächsten (gleichen) Menge fortgefahren wird, was besonders bei der Aufarbeitung grosser Mengen problematisch ist. Deshalb wurden spezielle Methoden entwickelt, um die Chromatographie kontinuierlich zu betreiben, die sonst mit einer einfachen Säulenaufreinigung nicht möglich wären:

**Kontinuierliche Ring Chromatographie (CAC), True Moving Bed Chromatographie (TMB) und Simulated Moving Bed Chromatographie (SMB).**

CAC eignet sich sowohl für die Trennung von Mehrkomponenten- als auch von Zweikomponenten-Gemischen.

TMB wird als kostengünstiges Verfahren eingesetzt.

SMB ist ein theoretisches Konzept

Notabene:

Für die **hochleistungsflüssigkeitschromatographische (HPLC)** Bestimmung von Penicillin mittels Fluoreszenzdetektion wurde eine Vorsäulenderivatisierungsmethode entwickelt. ... Das resultierende Reaktionsgemisch wurde direkt auf eine Reversed-Phase-**Säule** injiziert und mittels HPLC analysiert.

Die **Nachsäulenderivatisierung**, auch **Nachsäulenreaktion** genannt, macht bestimmte Verbindungen sichtbar, die normalerweise unsichtbar sind. Dieser Trick wird **nach** der Trennung durchgeführt, indem man eine chemische Reaktion an den Substanzen durchführt, die ihnen eine leicht nachweisbare physikalische Eigenschaft verleiht.