



Hochschule für Angewandte  
Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

# **Der Einfluss ausgewählter Kationen und Anionen in kosmotropen Salzen auf die Selektivität und das Adsorptionsverhalten bei Phenyl-Phasen in der Hydrophoben Interaktionschromatographie**

**Vorgelegt von**

**Léonie Masso Tafo**

**aus Hamburg**

**Januar 2014**

**Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Oktober bis Januar 2014 an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg erstellt.**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen**

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Birger Anspach, für die Bereitstellung eines sehr interessanten Themas und für die Möglichkeit, die Bachelorarbeit an der HAW Hamburg durchzuführen. Seine geduldige Betreuung und seine Ansprechbarkeit waren mir eine große Hilfe und Motivation für das Gelingen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Gesine Cornelissen danke ich für ihre Bereitschaft als zweiter Gutachter zur Verfügung zu stehen.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind in allen Fällen unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Léonie Masso Tafo

Hamburg, den 31. 01. 2014

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Chemikalien und Strukturformeln.....	15
<b>Tabelle 2:</b> Darstellung der HiTrap HIC Selection Kit.....	16
<b>Tabelle 3:</b> HIC-Säulen Merkmale Übersicht. ....	16
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Proteine .....	17
<b>Tabelle 5:</b> Pufferlösung Herstellung.....	17
<b>Tabelle 6:</b> Herstellung der Proteinlösung für Standardprotein und BSA.....	17
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Geräte .....	18
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht über einige Merkmale der verwendeten Proteine. ....	20
<b>Tabelle 9:</b> Übersicht über Eigenschaften von verwendeten Proteinen. ....	20
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Salzkonzentrationen für die Gradientenchromatographie. ....	22
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Salzkonzentrationen und Flussrate für die Frontalchromatographie. ....	25
<b>Tabelle 12:</b> HIC-Säule Position im Hochdruckprobenaufgabenventil. ....	25
<b>Tabelle 13:</b> Übersicht über Drücke von kosmotropen Salzen vor der Probenaufgabe mit Phenyl Sepharose HP bei 1 mL/min .....	56

## Abkürzungen

BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
$\alpha$ -Chymo A	$\alpha$ -Chymotrypsinogen A
CV	Column Volumes (Säulenvolumina)
Cyt C	Cytochrome c
DBK	Durchbruchskurve
6FF (high sub)	6 Fast Flow (high Substitution)
6FF (low sub)	6 Fast Flow (low Substitution)
$f_v$	Flussrate
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HP	High Performance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
Lys	Lysozym
mAU	Milli-absorbance-Units

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>8</b>
2.1 Trennprinzipien in der Proteinchromatographie .....	8
2.1.1 Größe und Molekülform .....	8
2.1.2 Elektrische Ladung .....	8
2.1.3 Hydrophobizität .....	8
2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	9
2.3 Retention .....	9
2.4 Durchbruchskurve .....	11
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1 Material.....	15
3.1.1 Chemikalien, chromatographische Medien und sonstiges Material.....	15
3.1.2 Verwendete Proteine.....	17
3.1.3 Puffer und Lösungsmittel.....	17
3.1.4 Gerät, Chromatographie Anlage und Software .....	18
3.2 Methoden.....	20
3.2.1 Trennung von Standardproteinen durch Gradientenchromatographie.....	20
3.2.2 Adsorption von Rinderserumalbumin durch Frontalchromatographie.....	24
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>27</b>
4.1 Vergleich der Löslichkeit verwendeter Proteine in verschiedenen HIC-Puffersystemen	27
4.2 Einfluss von Kationen und Anionen auf die Selektivität.....	27
4.3 Vergleich starker und schwacher Ionen .....	37
4.4 Einfluss von Kationen und Anionen auf die Form der Durchbruchskurve .....	37
4.5 Einfluss von Kationen und Anionen auf die Bindungskapazität von Serumalbumin .....	54
4.6 Einfluss der Fließmittelgeschwindigkeit.....	57
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>58</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>60</b>
<b>7 Quellenverzeichnis</b> .....	<b>61</b>

## 1 Einleitung

Die Entwicklung von chromatographischen Trenntechniken und deren heutigen moderne Untersuchungsmethoden sind in der Biotechnologie von großer Bedeutung. Diese ermöglichen eine Optimierung der Trennleistung von Biomolekülen bei der präparativen Chromatographie und damit eine gute Qualitätssicherung und Anwendung des Zielproduktes. Einer in der Proteinchromatographie am häufigsten verwendete Trennmethode ist die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), bei der Proteine auf Basis ihrer unpolaren Oberflächenstruktur in der Lage sind, unter adäquaten chromatographischen Bedingungen in Wechselwirkung (Interaktion) einzutreten und so ihre Trennung zu bewirken. Die native Konformation des Zielproteins bleibt dabei unverändert. Die Reversed-Phase Chromatographie hingegen, bei der die Auftrennung von Proteinen nach dem gleichen Hydrophobizitätsprinzip erfolgt, wirken diese hier aufgrund des Zusatzes organischer Lösungsmittel eher denaturierend. Bekannt ist, dass durch Zugabe von kosmotropen Salzen (auch antichaotrope Salze genannt wie z.B. Ammoniumsulfat) bei höheren Konzentrationen zur Intensivierung der Interaktionseffekte in der hydrophoben Wechselwirkung in der HIC führt und so eine bessere Selektivität der untersuchten Komponenten gewährleistet. In der Literatur ist ebenfalls die Wirkung des Salztyps bei der HIC-Chromatographie auf das Trennvermögen beschrieben. Jedoch bleiben bisher immer noch zahlreiche Fragen zu den Bindungs- und Adsorptionseigenschaften von Proteinen offen. Um den Effekt von kosmotropen Ionen auf die Selektivität und Adsorptionsverhalten bei der Proteinbindung an HIC-Medien besser zu verstehen, wurden für diese Arbeit zahlreiche Experimente bei verschiedenen Salzkonzentrationen und Flussraten durchgeführt. Ziel hierfür war es, die Wirkung ausgewählter Kationen und Anionen bei der Bindung von Rinderserumalbumin (BSA) an Phenyl-substituierte HIC-Medien zu analysieren. Ferner sollte herausgestellt werden, ob diese antichaotropen Ionen einen Einfluss auf den Durchbruchkurvenverlauf ausüben und welche Rolle die Fließmittelgeschwindigkeit dabei spielt.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Trennprinzipien in der Proteinchromatographie

Unter dem Begriff Chromatographie werden alle physikalisch-chemischen Trennprozesse bezeichnet, bei denen die Auftrennung des Substanzgemisches auf unterschiedliche Wechselwirkung von Substanzen zwischen zwei Phasen (einer mobilen und stationären Phase) basiert. Die mobile Phase, auch Eluent genannt, ist entweder gasförmig oder flüssig, während die stationäre Phase aus einer chemischen Substanz oder gefüllten Trennsäule (Adsorbens) besteht. Die zu untersuchende Probe wird mit Hilfe eines Eluenten in die unbewegte stationäre Phase transportiert. Dort werden die einzelnen Komponenten des Probengemisches unterschiedlich mit der Stationären Phase interagieren. Sie werden je nach Zusammensetzung der mobilen und stationären Phase verteilt, an der Oberfläche der Trägermaterialien adsorbiert oder schneller die Säule durchlaufen. So lassen sie sich viele Trennmechanismen in der Proteinchromatographie unterscheiden.

#### 2.1.1 Trennung nach Größe und Molekülform

Hier werden die Probenmoleküle nach ihrer Größe und Forme getrennt. Die stationäre Phase ist eine poröse Matrix. Moleküle mit größerem Molekulargewicht können nicht durch die Poren der stationären Phase diffundieren und werden als erste die Säule verlassen. Kleine Moleküle hingegen werden zurückgehalten und mit fallendem Molekulargewicht eluiert. Diese Trennmethode ist Basis der Ausschlusschromatographie (SEC).

#### 2.1.2 Trennung nach elektrischer Ladung

Die Trennung beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen geladenen Probenmolekülen und den an der stationären Phase immobilisierten funktionellen Gruppen. Der hier beschriebene chromatographische Trennvorgang ist spezifisch für die Ionenaustauschchromatographie.

#### 2.1.3 Trennung nach Hydrophobizität

Hydrophobizität gibt an, wie hydrophob oder unpolar (nicht mit Wasser mischbar) ein Stoff ist. Hierbei wird der hydrophobe Charakter von Proteinen genutzt, um diese unter bestimmten Bedingungen zu isolieren. Dieses Trennprinzip spielt besonders eine große Rolle bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie, welche im Rahmen dieser Arbeit als chromatographische Methode untersucht wurde.



## 2.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie spielt eine große Rolle bei der Isolierung von Biomolekülen in der präparativen Chromatographie. Hierbei werden die Biomoleküle in ihrer biologisch aktiven Form getrennt.

Das Trennprinzip beruht, wie oben bereits erwähnt, auf der hydrophoben Interaktion von Proteinen mit einer unpolaren stationären Phase. Proteine bestehen sowohl aus polaren als auch aus unpolaren Seitenketten. Die Hydrophobe Interaktionschromatographie nutzt unpolare Regionen auf Proteinoberflächen aus, um die Bindung im wässrigen Milieu an hydrophobe Liganden einer Säulenmatrix zu fördern, indem beide aufeinander einwirken. Das in dieser Arbeit verwendete HIC-Material war eine quervernetzte Agarose Matrix mit gebundenen substituierten Arylresten (Phenyl-Gruppen) auf seiner Oberfläche. Die mobile Phase setzte sich aus einer kosmotropen Salzpufferlösung bei variablen Konzentrationen zusammen. Die Adsorption von Proteinen auf der Säulenmatrix wird mit Zugabe von Salzen und bei höherer Konzentration stärker.

## 2.3 Retention

Das Ergebnis der zu trennenden Probenmoleküle wird durch einen Detektor in Form eines Chromatogramms aufgezeichnet, welches wichtige Auskünfte über die Trennung einzelner Komponenten (Peaks) enthält. Je nach verwendeter Auftragung unterscheidet man die Retentionszeit und das Retentionsvolumen.

### **Retentionszeit**

Anhand der Retentionszeit (Durchlaufzeit) lässt sich das Chromatogramm qualitativ auswerten.

Die Bruttoretentionszeit ( $t_R$ ) entspricht der benötigten Zeit einer Komponenten von der Probeninjektion bis zum Erreichen eines Peakmaximums.

Die Nettoretentionszeit ( $t_N$ ) ist die Zeitdauer eines Stoffs innerhalb der stationäre Phase. Diese lässt sich aus der Differenz zwischen Totzeit ( $t_0$ ) und Bruttoretentionszeit ( $t_N$ ) bestimmen. Bei der Trennung eines Substanzgemischs und Analyse der einzelnen Standardsubstanzen lässt sich durch Vergleich von Retentionszeiten erkennen, welcher Substanz welcher Peak zuzuordnen ist.

Abbildung 1 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen Retentionszeiten und Identifizierung des einzelnen Peaks eines Chromatogramms.

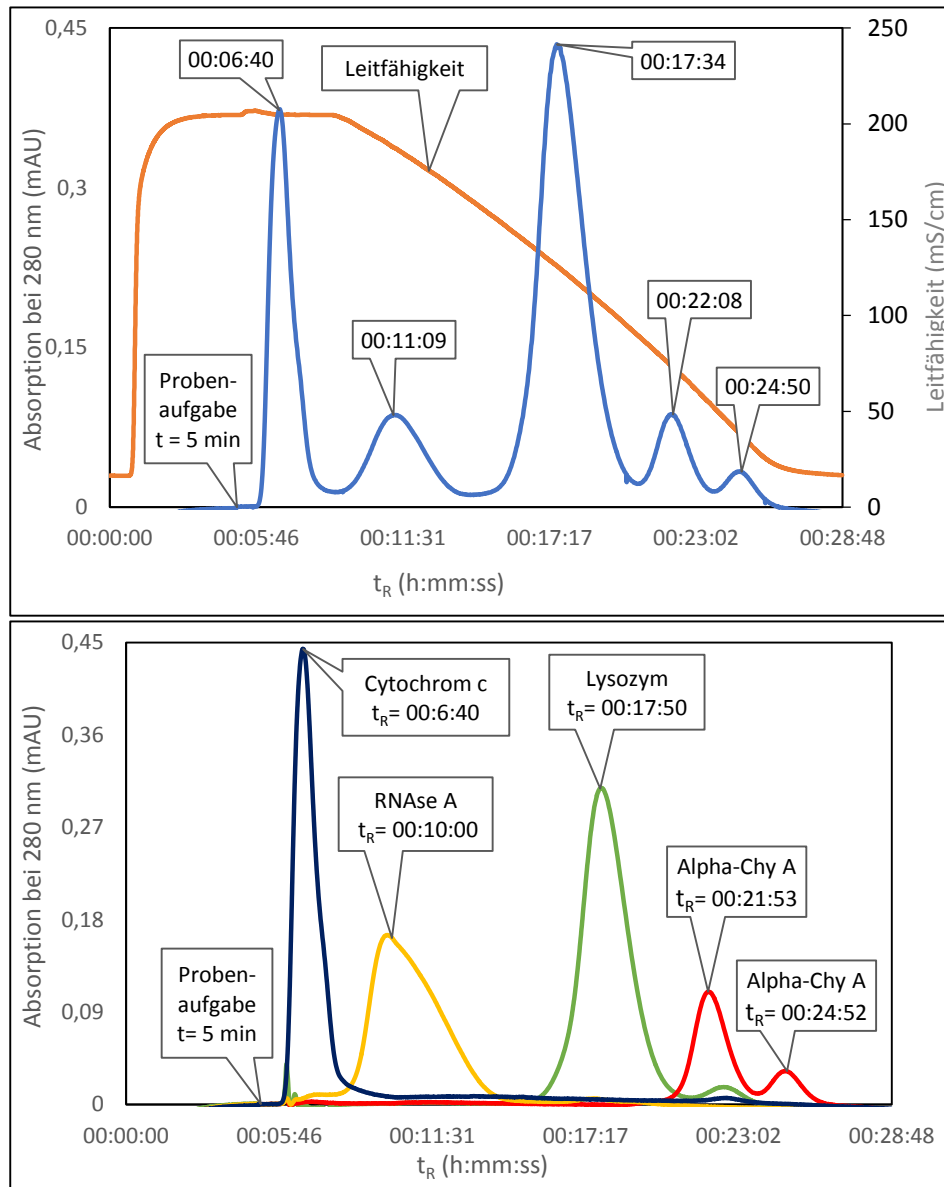


Abbildung 1: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten) mit 1,7 M Ammoniumsulfat.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogen-phosphatspuffer pH 7 + 1,7 M Ammoniumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatspuffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 100  $\mu$ l, Probenkonzentration 1 mg/mL.

### Retentionsvolumen

Das Retentionsvolumen ( $V_R$ ) setzt sich aus der Bruttoretentionszeit und der Flussrate ( $f_v$ ) zusammen.  $V_R = t_R \cdot f_v$ .

Neben der Retention gibt es weitere wichtige chromatographische Kenngrößen wie z.B. die Peakfläche, Peakhöhe oder Peaksymmetrie, welche eine quantitative Beschreibung erlauben.

## 2.4 Durchbruchskurve

Zur Untersuchung von Durchbruchskurven und deren Formen werden Adsorptionsparameter berücksichtigt. Unter Adsorption wird die Bindung einer Substanz aus einer fluiden oder gasförmigen Phase an eine feste Phase verstanden. Wird die gebundene Substanz freigegeben, so spricht man von Desorption.

Das Adsorptiv (die zu aufnehmende Substanz) wird mit einer Eingangskonzentration kontinuierlich auf das Adsorbens (Adsorbentien, Trägermaterial) aufgetragen. An der inneren Oberfläche des Säulenmaterials bewegt sich das Adsorptivmolekül in Richtung eines Konzentrationsgradienten. Die Diffusion des Moleküls in die Pore wird, neben anderen Einflussgrößen, durch die Porendurchmesser der Matrix und die Fließmittelgeschwindigkeit bestimmt. Je kleiner das Molekül ist, desto schneller die Adsorptionskinetik. Größere Moleküle, die nicht in die Porenmatrix eindringen können, bewegen sich nur im Zwischenkornvolumen (Volumen zwischen den Partikeln) während der Adsorption. Die Adsorptivkonzentration in der Flüssigkeit sinkt ab. Nach einer gewissen Transportzeit im Adsorbens kommt es zur Bildung einer Massenübergangszone (Adsorptionszone), die den eigentlichen Bereich der Adsorption umfasst. Sie charakterisiert die Abnahme der Konzentration des Adsorptivs im Trägermaterial unter den Wert in der aufgetragenen Probe. Außerdem besitzt sie eine gewisse Breite, welche von Fließgeschwindigkeit und Adsorptionsgleichgewichten abhängt. Das Beladen des Adsorbens erreicht hier einen maximalen Punkt (Sättigungspunkt,  $t_s$ ) und somit nimmt seine Aufnahmekapazität ab. Durch Stoffaustausch zwischen Fluid und Trägermaterial stellt sich nach  $t \rightarrow \infty$  eine Gleichgewichtsadsorption ein. Die Massenübergangszone bewegt sich in Fließrichtung durch das Adsorbens. Der zeitliche Verlauf der Adsorptivkonzentration des den Absorber ablaufenden Fluides wird als Durchbruchskurve bezeichnet.

Die Durchbruchskurve wird meist durch einen S-förmigen Verlauf gekennzeichnet (reale Durchbruchskurve) im Gegensatz zu der mit steilem oder scharfem Verlauf (ideale Durchbruchskurve). Viele Parameter wirken auf die Form der Durchbruchskurve ein, beispielweise die Art und Konzentration des Adsorptivs, die Fließgeschwindigkeit, die Art des Adsorbens sowie die dynamische Kapazität, das Adsorptionsgleichgewicht und die Dicke der Massenübergangszone.

In Abbildung 2 sind Durchbruchkurven von Rinderserumalbumin mit Ammoniumsulfat bei höherem und bei niedrigerem Durchfluss (1,93 mL/min bzw. 0,33 mL/min) jeweils an Phenyl Sepharose HP (oben) und 6FF high Substitution (unten) dargestellt.

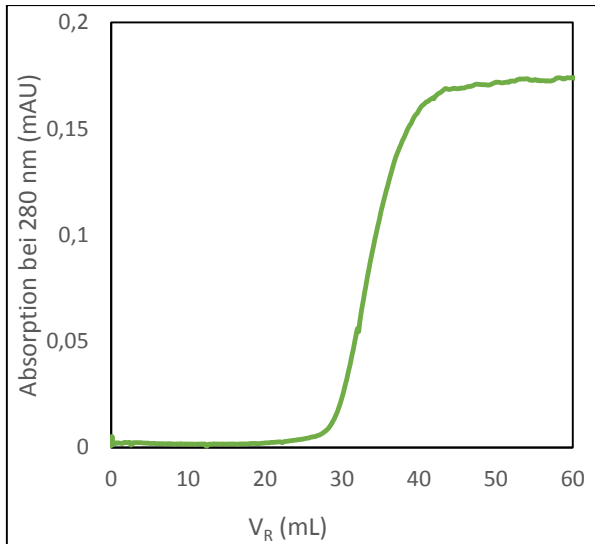
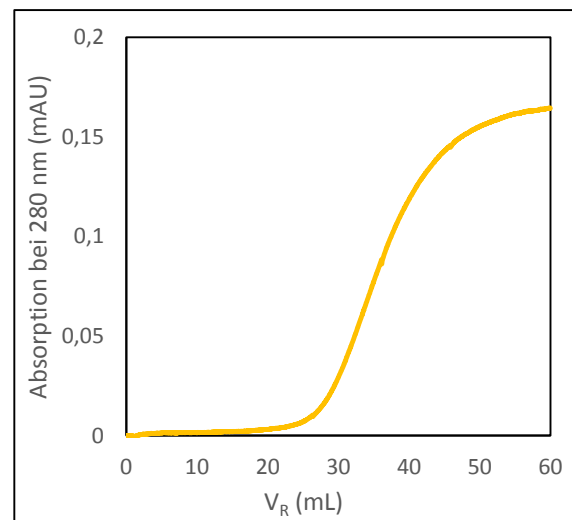
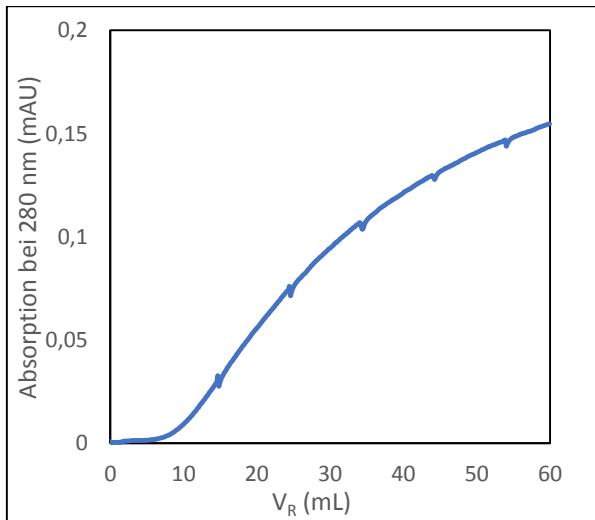
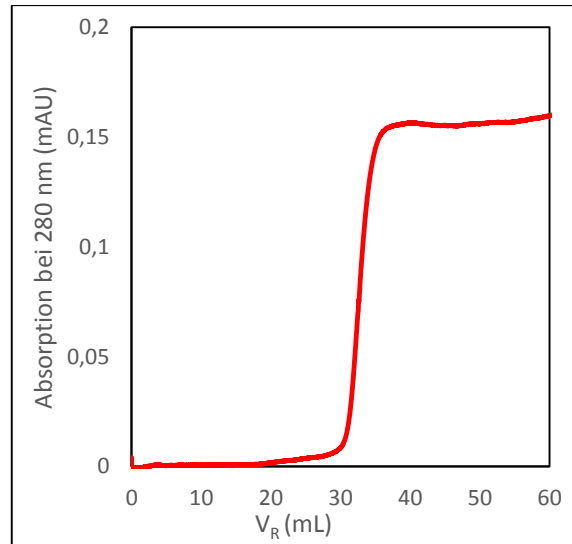
a.) 1,7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Flussrate 1,93 mL/min, HP.b.) 1,7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Flussrate 0,33 mL/min, HP.c.) 1,7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Flussrate 1,93 mL/min, 6FF (high sub).d.) 1,7 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Flussrate 0,33 mL/min, 6FF (high sub).

Abbildung 2: Übersicht über Durchbruchkurvenprofile von BSA mit Ammoniumsulfat.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP (oben) sowie 6FF low sub (unten), 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1,7 M Ammoniumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Entsprechend den jeweiligen chromatographischen Bedingungen unterscheidet man zwei Formen von Durchbruchkurven: eine flache (s. Kurve c) und eine steile S-förmige (s. Kurve b). Die auf der Durchbruchkurve (c) zu sehenen Schwankungen traten während der Messung

infolge eines kurzzeitigen Druckabfalls bei jedem Wechsel der beiden Kolben der Pumpe vom Ansaug- auf den Pumpmodus auf.

Die Adsorption und Desorption des Zielproteins (BSA) für die Durchbruchkurven mit Ammoniumsulfat bei 1,93 mL/min und 0,33 mL/min an Phenyl Sepharose HP lassen sich nachfolgend in Abbildung 3 illustrieren.

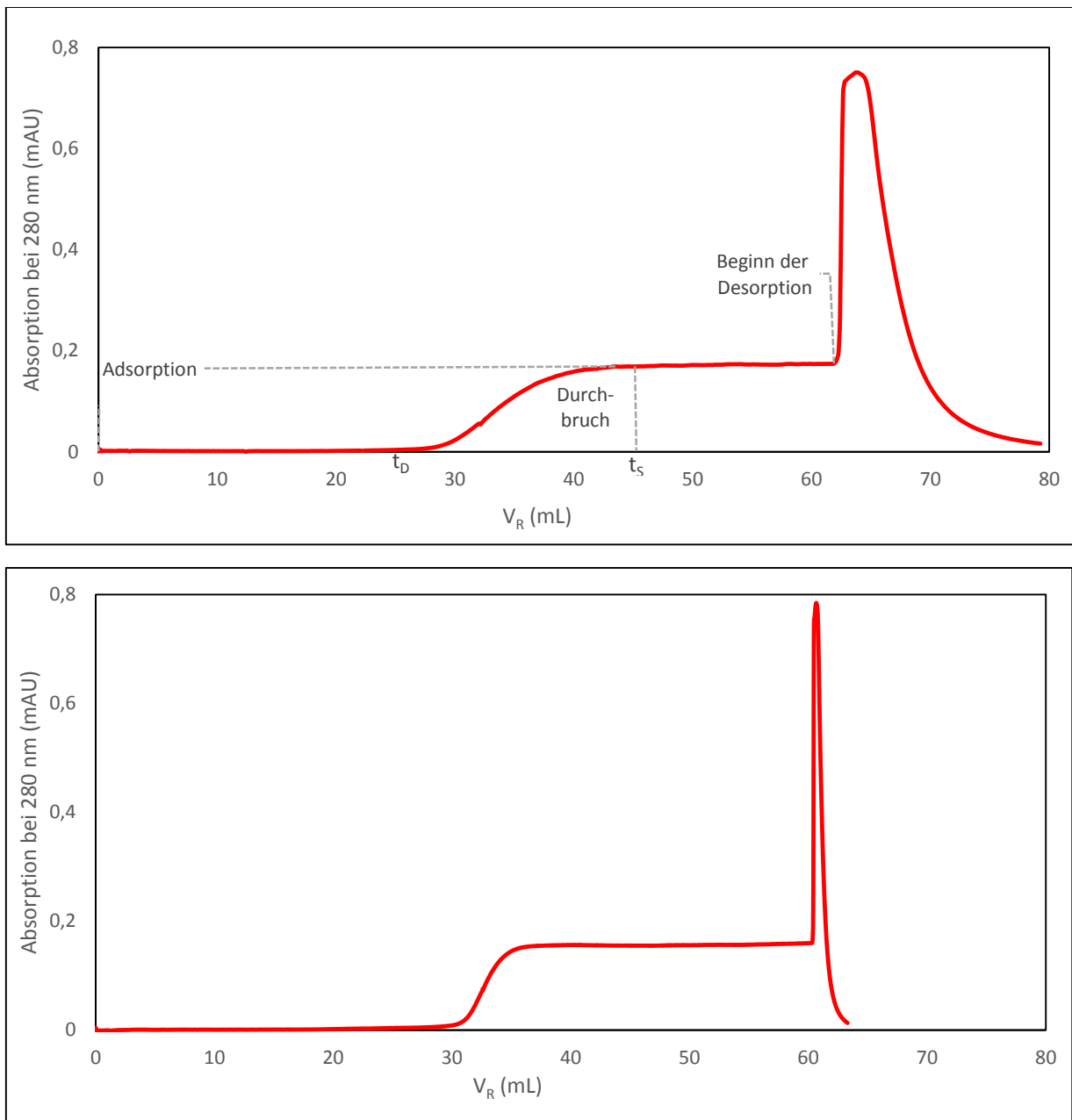


Abbildung 3: Graphische Darstellung einer Durchbruchkurve mit Ammoniumsulfat mit Adsorption und Desorption von BSA. Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP bei 1,93 mL/min (oben) sowie 0,33 mL/min (unten), 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1,7 M Ammoniumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

In der Graphik steht t<sub>D</sub> für die Durchbruchzeit und t<sub>S</sub> für den Sättigungspunkt.

---

**Dynamische Bindungskapazität**

Die dynamische Bindungskapazität bezeichnet die Bindungskapazität der Säule, bei der eine bestimmte Konzentration des Zielproteins im Durchbruch vorhanden ist. Sie beschreibt das Verhältnis zwischen der Eingangskonzentration des Adsorptivs und der Ausgangskonzentration im Durchbruch ( $c_A/c_E$ ). Die dynamische Kapazität wird von der Art und Zusammensetzung der mobilen Phasen beeinflusst wie z.B. der Fließmittelgeschwindigkeit, der Proteingröße und der Adsorptivkonzentration. Bei höheren Konzentrationen des zu adsorbierenden Stoffs wird die freie Adsorptionsstelle innerhalb des Adsorbentiens schneller besetzt. Es kommt zu einem vorzeitigen Durchbruch des Zielproteins. Die Durchbruchzeiten ( $t_D$ ) verringern sich und damit die dynamische Kapazität. Die Durchbruchskurve wird dann steiler.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Alle Materialien und deren Hersteller, die für diese Arbeit benötigt wurden, sind hier in Form einer Tabelle zusammengefasst.

#### 3.1.1 Chemikalien, chromatographische Medien und sonstiges Material

##### Chemikalien

Die in Tabelle 1 eingesetzte Chemikalien und Proteine wurden von der Firma Carl Roth GmbH erworben. (Reinheit p.a).

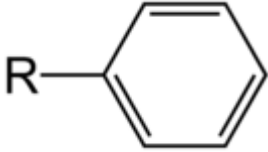
**Tabelle 1:** Chemikalien und Strukturformeln

Chemikalien	Formel
Ammoniumchlorid	$\text{NH}_4\text{Cl}$
Ammoniumcitrat	$\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$
Ammoniumsulfat	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Kaliumsulfat	$\text{K}_2\text{SO}_4$
Lithiumsulfat	$\text{Li}_2\text{SO}_4$
Natriumchlorid	$\text{NaCl}$
Trinatriumcitrat Dihydrat	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Natriumsulfat	$\text{Na}_2\text{SO}_4$
Natriumdihydrogenphosphat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Salzsäure	$\text{HCl}$
Natronlauge	$\text{NaOH}$
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid	Tris-HCl
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$

## Chromatographische Medien

Als HIC Trennmaterialien wurde das fertige gepackte HiTrap HIC Selection Kit der Firma GE Healthcare Bio-Sciences mit den Abmessungen 0,7 x 2,5 cm angewendet. Die HIC-Säulen haben ein Volumen von 1 mL und sind für einen Durchfluss von 1 mL/min ausgelegt. Auf ihrer Oberfläche sind sie mit hydrophoben Phenyl-Gruppen substituiert. Die Phenyl-Gruppen (s. Tab. 2), die aus Benzol-Rest bestehen, sind an eine quervernetzte Matrix (Agarose) gebunden. Sie weisen je nach Medien-Zusammensetzung unterschiedliche Substitutionsgrade auf (s. Tab. 3). Die Proteinbindung wird mit zunehmendem Substitutionsgrad des HIC-Adsorbens verstärkt.

**Tabelle 2:** Darstellung der HiTrap HIC Selection Kit.

HiTrap HIC Selection Kit	Abkürzung	Chemische Struktur von Phenylgruppen
Phenyl Sepharose High Performance	Phenyl Sepharose (HP)	 <p>Quelle: Internet (1)</p>
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low Substitution)	Phenyl Sepharose 6FF (low sub)	
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high Substitution)	Phenyl Sepharose 6FF (high sub)	

**Tabelle 3:** HIC-Säulen Merkmale Übersicht.

HIC-Säule	Substitutionsgrad [μmol/ml Gel]	Teilchengröße [μm]
Phenyl Sepharose HP	25	34
Phenyl Sepharose 6FF (low sub)	25	90
Phenyl Sepharose 6FF (high sub)	40	90



## Sonstiges Material

Zum Filtrieren der Pufferlösungen wurden Mikrofiltrationsmembranen mit einem Durchmesser von 50 mm auf der Basis von Celluloseacetat sowie mit Porendurchmesser 0,2 µm und 0,8 µm der Firma Sartorius Stedim Biotech verwendet.

### 3.1.2 Verwendete Proteine

**Tabelle 4:** Verwendete Proteine

Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Bestellnummer
BSA (>98%)		Roth, Karlsruhe	3737.1
α-Chymotrypsinogen A	bovine pancreas	Sigma, Steinheim	C4879
Cytochrome C	equine heart	Sigma, Steinheim	C7752
Lysozym	Hühnereiweiß	Merck, Darmstadt	1.05281.0010
RNase A > (70 U/mg)		Roth, Karlsruhe	7164.2

### 3.1.3 Puffer und Lösungsmittel

Alle Puffer- und Proteinlösungen wurden mit demineralisiertem Wasser bei pH 7 hergestellt und anschließend filtriert.

**Tabelle 5:** Pufferlösung Herstellung

Niedrigsalzpuffer (Elutionspuffer)	Hochsalzpuffer (Bindungspuffer)
0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 Liter	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + Salztyp in 1 Liter dH <sub>2</sub> O lösen
0,1 M Tris-HCl in 1 L dH <sub>2</sub> O lösen	0,1 M Tris-HCl + Salztyp in 1 L dH <sub>2</sub> O lösen

**Tabelle 6:** Herstellung der Proteinlösung für Standardprotein und BSA

Protein	Einwaage [mg/ml]	
α-Chymotrypsinogen A	1	In Hochsalzpuffer lösen, 1000 µl des Gemischs mit Hilfe einer Spritze in die Proben Schleife injizieren
Cytochrome C	1	
Lysozym	1	
RNase A	3	
BSA	1	In Hochsalzpuffer lösen und Probenlösung kontinuierlich auf die Säule geben

### 3.1.4 Gerät, Chromatographie Anlage und Software

#### Gerät

**Tabelle 7:** Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Biologic Duo Flow HPLC	Bio-Rad
P-500	Pharmacia
Analysenwaage	Sartorius
pH-Meter	Knick

#### Chromatographie Anlage und Software

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chromatographiesystem war eine Biologic Duo Flow vom Hersteller Bio-Rad mit zwei hochdruckseitig angebrachten Ventilen. Dabei wird das Eluent mit einem hohen Druck durch die Säule gefördert. Das Biologic Duo Flow System besteht hauptsächlich aus folgenden Teilen:

##### Pumpe F 10

Das Pumpensystem besteht aus zwei getrennt angetriebenen Pumpen und enthält jeweils zwei Kolben A und B. Die mobile Phase wird mittels einer Mischkammer vermischt. Der maximale Durchfluss liegt bei 10 mL/min und 3500 psi (233 bar).

##### Hochdruckprobenaufgabenventil

Das Hochdruckprobenaufgabenventil (AVR7-3) umfasst drei Positionen zum Injizieren der Probe, welche sich wie folgt zuweisen lassen:

Position 1 → Load

Position 2 → Inject

Position 3 → Purge

Die Probenaufgabe erfolgte manuell mit Hilfe einer Spritze über das Probeninjektionsventil mit der Probenschleife, die ein Volumen von 1 mL hatte. Bei größeren Probenvolumen kommt eine Hilfspumpe für die Probenbeladung zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Untersuchung von Rinderserumalbumin durch Frontalchromatographie eine P-500 Pumpe der Firma Pharmacia als Hilfspumpe an die Bio Rad Anlage angeschlossen (s. Abb. 4). Im Programm wird sie wie eine Econo Pumpe P-1 von Bio-Rad angesteuert.

Mittels des Injektionsventils SV5-4 ließ sich die Proteinlösung automatisch auf die Säule zuführen und erlaubte somit eine Durchführung in der Programmart „Queue“, bei der mehrere Programme nacheinander und automatisches Umschalten von Säulen möglich ist. Daher konnte man die Messung auch über einen längeren Zeitraum laufen lassen.

### Detektor

Es handelt sich hierbei um einen UV- Detektor, welcher mit einer Quecksilberlampe von Adsorptionslänge 280 nm und einem 254 nm Filter eingerichtet ist.

### Leitfähigkeitsdetektor

Er verfügt über einen maximalen Leitfähigkeitsbereich von 500 mS/cm.

Als Software diene das Programm „Biologic Duo Flow“ der Firma Bio-Rad. Die Auswertung erfolgte anschließend mittels Excel von Microsoft Office Corporation.

Abbildung 4 stellt den Aufbau der verwendeten Bio Rad Anlage mit zwei Ventilen dar. Die Probenaufgabepumpe P-500 ist im Vordergrund zu sehen.



Abbildung 4: Übersicht der verwendeten Bio Rad HPLC Anlage mit zwei Ventilen, drei Säulen und einer P-500 Hilfspumpe für die automatische Probenaufgabe.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Trennung von Standardproteinen durch Gradientenchromatographie

Zur Analyse der Löslichkeit und Selektivität von kosmotropen Salzen wurden Versuche mit Hilfe von Standardprotein mittels Gradientenchromatographie durchgeführt. Da die Art und Oberflächeneigenschaften der zu adsorbierenden Biomoleküle eine Wirkung auf die Bindung haben, sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften des gewünschten Proteins zu berücksichtigen.

Tabelle 8 gibt eine kurze Übersicht über einige Merkmale der verwendeten Proteine.

**Tabelle 8:** Übersicht über einige Merkmale der verwendeten Proteine.

Bezeichnung	MW [KDA]	PI	Eigenschaften
Cytochrome C	~12	~10,6	104 AS
RNase A	13,7	~9,45	124 AS
Lysozym	14,3	~11,8	129 AS
$\alpha$ Chymotrypsinogen A	25	~8,1	~245 AS

### Eigenschaften von verwendeten Salzen

**Tabelle 9:** Übersicht über Eigenschaften von verwendeten Salzen.

Name	M [g/mol]	Löslichkeit in H <sub>2</sub> O
Ammoniumsulfat	132,14	gut
Ammoniumchlorid	53,49	gut
Lithiumsulfat	109,94	gut
Kaliumsulfat	174,26	temperaturabhängig
Natriumchlorid	53,49	gut
Natriumsulfat	142,04	gut
Tri-Ammoniumcitrat	243,22	gut
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	290,10	gut

## Strukturformeln von ausgewählten kosmotropen Salzen

### Ammoniumchlorid

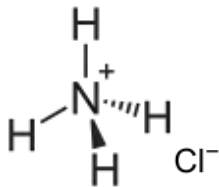


Abb. 5: Strukturformel von Ammoniumchlorid.  
Quelle: Internet (2).

### Lithiumsulfat

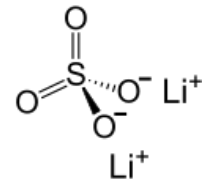


Abb. 6: Strukturformel von Lithiumsulfat.  
Quelle: Internet(3).

### Ammoniumsulfat

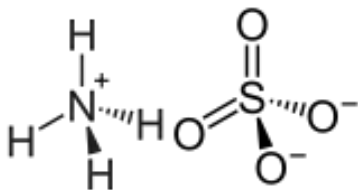


Abb. 7: Strukturformel von Ammoniumsulfat.  
Quelle: (Internet 4)

### Tri-Ammoniumcitrat

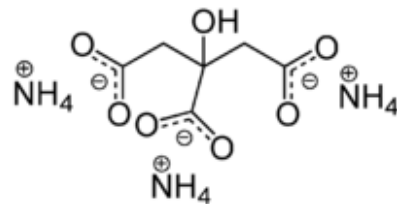


Abb. 8: Strukturformel von Tri-Ammoniumcitrat.  
Quelle: (Internet 5).

### Natriumsulfat

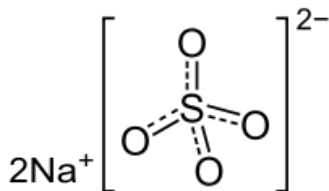


Abb. 9: Strukturformel von Natriumsulfat.  
Quelle: (Internet 6).

### Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

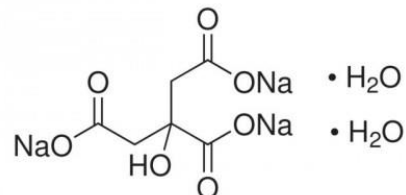


Abb. 10 : Strukturformel von Tri-Natrium-Dihydrat.  
Quelle: (Internet (7)).

### Experimentelle Arbeit mit Standardprotein (Gradientenchromatographie)

Ziel dieses Versuches war es, die Bindung und Selektivität von kosmotropen Salzen bezogen auf das Standardprotein zu untersuchen, um den kosmotropen Effekt von Anionen und Kationen zu prüfen, wie er in der Literatur beschrieben ist. Die eingesetzten Salzkonzentrationen sind in der nachstehenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 10:** Verwendete Salzkonzentrationen für die Gradientenchromatographie.

Name	Konzentration (M)
Ammoniumsulfat	1,7
Tri-Ammoniumcitrat	1,7
Natriumchlorid	3
Ammoniumchlorid	3
Natriumsulfat	1
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	1
Lithiumsulfat	1
Kaliumsulfat	0,6

Das Standardproteingemisch setzte sich aus 4 Proteinen zusammen: Cytochrome C, Lysozym und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A jeweils mit 1 mg/ml sowie die RNase A mit 3 mg/ml.

Als Elutionspuffer diente 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 7 sowie 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7. Die Herstellung von Bindungspuffern erfolgte entsprechend dem kosmotropen Salztyp mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer oder aber mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer für Kalium- und Lithiumsulfat, da diese beiden Salze schwer löslich beziehungsweise unlöslich in Dinatriumhydrogenphosphat (0,1 M) waren. Aufgrund seiner extrem schweren Löslichkeit in Wasser musste deswegen für die Weiterführung des Versuchs die Konzentration des Kaliumsulfats auf 0,6 M herab gesetzt werden. Zum Filtrieren von Puffern kam normalerweise ein Membranfilter mit Porengrößen von 0,2  $\mu\text{m}$  zum Einsatz. Hingegen musste bei Lithiumsulfat ein Cellulose Acetate Filter der Firma Sartorius mit Porengröße von 8,0  $\mu\text{m}$  verwendet werden. Es wurde 1 mL des Proteingemischs im konvenierenden Bindungspuffer gelöst und dies mittels einer Spritze mit der Probenschleife auf eine Phenyl Sepharose HP Säule (s. Abb. 11) aufgetragen. Die Proteintrennung erfolgte anschließend durch eine Gradientenelution. Hierbei ändert sich die Zusammensetzung der Fließmittelgeschwindigkeit während der Trennung. Die Durchführung der Messung an die Biorad-Anlage resultierte mit dem Programm Biologic Duo Flow wie im folgenden Protokoll beschrieben.

### Versuchsprotokoll für die Trennung des Standardproteins (Gradientenchromatographie)

- HPLC Anlage starten
- Computer einschalten
- Programm Biologic Duo Flow auswählen
- UV-Lampe einschalten, Messung bei 280 nm, Leitfähigkeit mS/cm
- Säule vor der Benutzung mit 20% Ethanol regenerieren
- Pumpe mit Puffern spülen
- Säule equilibrieren mit 5 CV 100% Hochsalzpuffer bei Flussrate 1 mL/min.
- Isokratischer Fluss mit 100% Hochsalzpuffer bei Flussrate 1 mL/min für 5 min.
- UV zero Baseline
- Injektion von 1 mL Probenvolumen über 1,5 min
- Isokratischer Fluss mit 100% Hochsalzpuffer bei Flussrate 1 mL/min für 2 min
- Linearer Gradient von 0% auf 100% Niedrigsalzpuffer bei Flussrate 1 mL/min für 20 min
- Isokratischer Fluss mit 0% Hochsalz, 100% Niedrigsalz bei Flussrate 1 mL/min für 5 min.
- Ende des Versuchs 33,5 min bzw. 35,5 mL

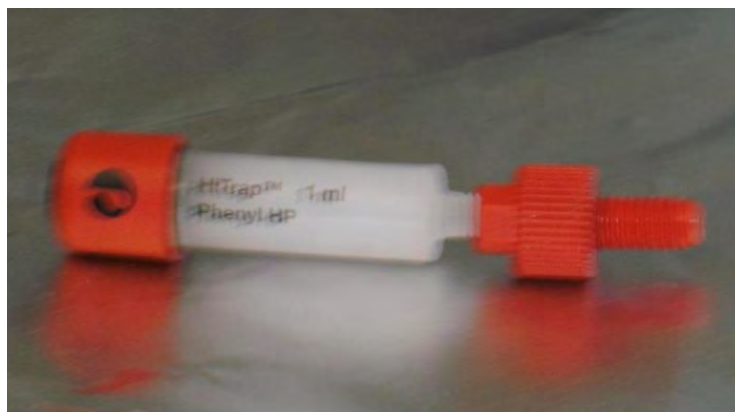


Abbildung 11: HiTrap Phenyl Sepharose HP Säule mit angeschlossenem Adapter auf der rechten Seite.

### 3.2.2 Adsorption von Rinderserumalbumin durch Frontalchromatographie.

Unter Frontalchromatographie versteht man ein chromatographisches Verfahren, bei dem die Probe kontinuierlich auf die Säule gebracht wird. Ziel der vorliegenden Methode war es, das Adsorptionsverhalten von BSA bei Phenyl-Phasen in der hydrophoben Interaktionschromatographie, bei kontinuierlicher Auftragung auf die Säule zu beschreiben. Mit diesem Teil des Kapitels hatte sich bereits 2003 Jungbauer et al. im Rahmen seines Aufsatzes „Hydrophobe Interaktion Chromatographie von Proteinen II. Binding capacity, recovery and mass transfer Properties“ [6] befasst. Er verglich die dynamischen Bindungskapazitäten verschiedener HIC-Medien unter anderem auf der Basis von Sepharose bezogen auf die Bindungseigenschaften ausgewählter Proteine am Beispiel von BSA. Die Untersuchung erfolgte mit Ammoniumsulfat bei variierten Konzentrationen und Fließmittelgeschwindigkeiten. Der Vergleich beider Ergebnisse soll in einem späteren Kapitel erfolgen.

#### **Darstellung des verwendeten Proteins für die Frontalchromatographie**

Rinderserumalbumin ist ein Protein, das zur Familie der Albumine gehört. Aufgrund seiner kugelförmigen Struktur wird es als globuläres Protein bezeichnet. Im Gegensatz dazu weisen fibrilläre Proteine eine gestreckte Struktur auf. Mit einer molekularen Masse von etwa 65 KDA besteht es aus ca. 584 Aminosäuren. Sein isoelektrischer Punkt liegt bei ca. 4,8. BSA kommt in Blutplasma vor und ist gut löslich in Wasser. Es besitzt auf seiner Oberfläche viele Bindungsstellen und ist somit in der Lage, Wasser abstoßende Substanzen im Blut zu transportieren.

#### **Darstellung von verwendeten Säulen, Salzkonzentrationen und Flussraten.**

Bei den hier eingesetzten Säulen handelte es sich um die 3 oben bereits beschriebenen Phenyl-Sepharose Säulentypen des HiTrap Selection Kits (vgl. Tab. 3). Der vorliegende Versuch wurde bei diversen kosmotropen Salzkonzentrationen und Fließmittelgeschwindigkeiten durchgeführt.



Die in der Tabelle aufgeführten Flussraten wurden jeweils bei allen Salzen und Salzkonzentrationen angewandt.

**Tabelle 11:** Verwendete Salzkonzentrationen und Flussrate für die Frontalchromatographie.

Bezeichnung	Konzentration (M)	Flussrate (mL/min)
Ammoniumsulfat	1; 1,3; 1,7	2,57
Tri-Ammoniumcitrat	0,7; 0,9; 1	1,93
Natriumchlorid	2; 2,5; 3	1,29
Ammoniumchlorid	2; 2,5; 3	0,97
Natriumsulfat	0,7; 1; 1,2	0,65
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	0,7; 0,9; 1	0,33
Lithiumsulfat	0,7; 1; 1,2	0,20
Kaliumsulfat	0,6	

### Experimentelle Arbeit mit BSA (Frontalchromatographie)

Die Pufferzusammensetzungen (Elutions- und Bindungspuffer) blieben wie bei der Gradientenchromatographie bereits dargestellt unverändert. Für die Herstellung der Proteinlösung wurde 1 g/l des Adsorptivs (BSA) im jeweiligen Bindungspuffer gelöst und anschließend filtriert. Die Probe wurde dann mit Hilfe der an die Biorad-Anlage angeschlossene Pumpe P-500 durchgehend auf die Säule zugeführt. Die 3 Phenyl HIC-Säulentypen wurden hier automatisch nacheinander angeschaltet, so dass die Messung im Schleifenmodus (genannt Queue im Programm) durchlaufen konnte. Hierfür wurde die Reihenfolge der Säulen im Hochdruckprobenaufgabenventil (AV7-3 Valve Port 5) wie in der unten stehenden Tabelle beschrieben, zugeordnet:

**Tabelle 12:** HIC-Säule Position im Hochdruckprobenaufgabenventil.

Bezeichnung	Position	
Phenyl Sepharose HP	1	Load Sample
Phenyl Sepharose 6FF (low sub)	2	Inject Sample
Phenyl Sepharose 6FF (high sub)	3	Purge

Die Elution des BSA erfolgte wie im nachfolgenden Protokoll dargestellt durch einen Sprung von Hochsalz- auf Niedrigsalzbedingungen.

### **Protokoll für die Frontalchromatographie**

**Beispiel für eine Flussrate von 2,57 mL/min und ein Probenvolumen von 60 mL.**

- Säulen Auswählen Change AV7-3 Port 5
- Position 1: Load Sample → Phenyl Sepharose HP
- Position 2: Inject Sample → Phenyl Sepharose 6FF (low sub)
- Position 3: Purge → Phenyl Sepharose 6FF (high sub)
- Isokratischer Fluss mit 100% Hochsalz, 0% Niedrigsalz bei 1 mL/min für 7 Min
- UV Zero Baseline
- Direct Inject: Inject 60 mL Sample bei 2,57 mL/min für 23,3 Min
- Isokratischer Fluss mit 0% Hochsalz, 100% Niedrigsalz bei 1 ml/min für 10 Min
- Ende des Versuchs: Dauer: 40,3 Min

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Vergleich der Löslichkeit verwendeter Proteine in verschiedenen HIC-Puffersystemen

Gemäß ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften wirken Salze in unterschiedlicher Weise auf die Proteine ein. Die Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Reste an der Oberfläche des Proteinmoleküls bestimmt die Lage der Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln (Scopes, 1987, 42) [8]. Lewith berichtete bereits 1887 über die Fähigkeit ausgewählter Salze bei einer gewissen Konzentration, Proteine in ihrer aktiven biologischen Form aus einer Lösung auszufällen (Aussalzen). Später gelang es Hofmeister (1888) [3], die Salz-Ionen nach ihrer Wirkung in Aussalzen (kosmotrope Ionen) und Einsalzen (chaotrope Ionen) einzuordnen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorversuche durch Gradientenchromatographie konnten zeigen, dass die Löslichkeit der verwendeten Proteine mit den ausgesuchten kosmotropen Salzen kein Problem darstellte. Eine Ausnahme bildete der Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Puffer (1,5 M), bei dem RNase A [3mg/ml] schwer löslich war. Um das Experiment mit RNase A zu ermöglichen, musste die Konzentration des Tri-Natriumcitrat-Dihydrats auf 1 M herab gesetzt werden. Außerdem machte der Bindungspuffer des Tri-Natriumcitrat-Dihydrats einen sehr viskösen Eindruck. In einem späteren Kapitel wird dieser Eindruck durch Messungen mittels Frontalchromatographie mit BSA bestätigt.

### 4.2 Einfluss von Kationen und Anionen auf die Selektivität

Zur Untersuchung des Einflusses von Kationen und Anionen auf die Selektivität wurde 1 mL des Standardproteingemischs in den jeweiligen Bindungspuffern gelöst und anschließend auf eine Phenyl Sepharose HP Säule gegeben. Die Auftrennung des Proteingemischs geschah durch eine Gradientenelution. Die Zugehörigkeit der einzelnen Peaks eines Chromatogramms zu den Substanzen eines Gemischs konnte durch Injektion der einzelnen Substanzen sichtbar gemacht werden. Die resultierten Chromatogramme mit den jeweiligen ausgesuchten Bindungspuffern sind untenstehend dargestellt.

## Trennung mit Ammoniumsulfat

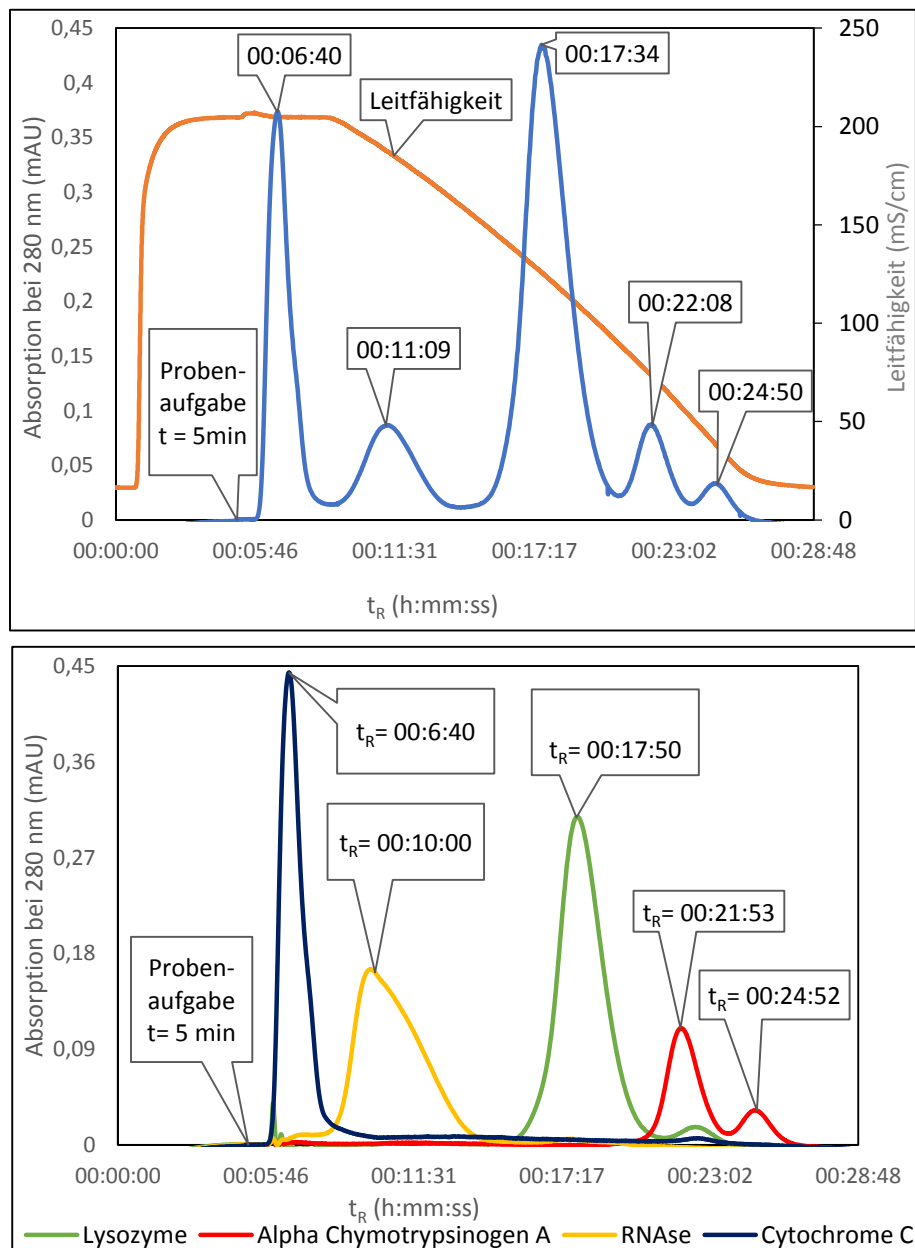


Abbildung 12: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Ammoniumsulfat (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1,7 M Ammoniumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000  $\mu$ l, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Das obige Chromatogramm illustriert die Wirkung des Ammoniumsulfats bezogen auf die Trennung des Standardproteingemischs. Hierbei sind 5 verschiedene Peaks dargestellt, jeweils mit unterschiedlichen Retentionszeiten und Adsorptionslängen. Vergleich man die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen mit denen vom Proteingemisch miteinander, stellt man fest, dass Cytochrome C gleich nach der Probenaufnahme von der Säule eluiert wird und weist somit die kürzeste Retentionszeit auf.

RNase A, die aufgrund der schlechten Trennung einen breiten Peak aufweist, erscheint als zweiter auf dem Chromatogramm, während Lysozym mit einer Retentionszeit von ca. 17 min etwas länger verzögert wird.  $\alpha$ -Chymotrypsinogen hingegen tritt stark in Wechselwirkung mit der stationären Phase ein und kommt erst nach einer längeren Durchlaufzeit von der Säule heraus. Außerdem tritt es als Doppel-Peak auf dem Chromatogramm mit unterschiedlichen UV-Absorption sowie einer leichten Differenz in der Durchlaufzeit auf. Möglicherweise hatte sich das verwendete  $\alpha$ -Chymotrypsinogen mit der Zeit teilweise in Chymotrypsin zersetzt, so dass diese beiden Proteine getrennt werden können. Die große Distanz zwischen den getrennten Komponenten des Proteingemischs deutet auf die gute Qualität der Trennung und damit die gute Selektivität hin.

Da die Probeinjektionszeit  $t = 5$  min im oben dargestellten Chromatogramme bereits geschildert wurde, wird diese im weiteren Verlauf nicht mehr gezeigt.

## Trennung mit Tri-Ammoniumcitrat

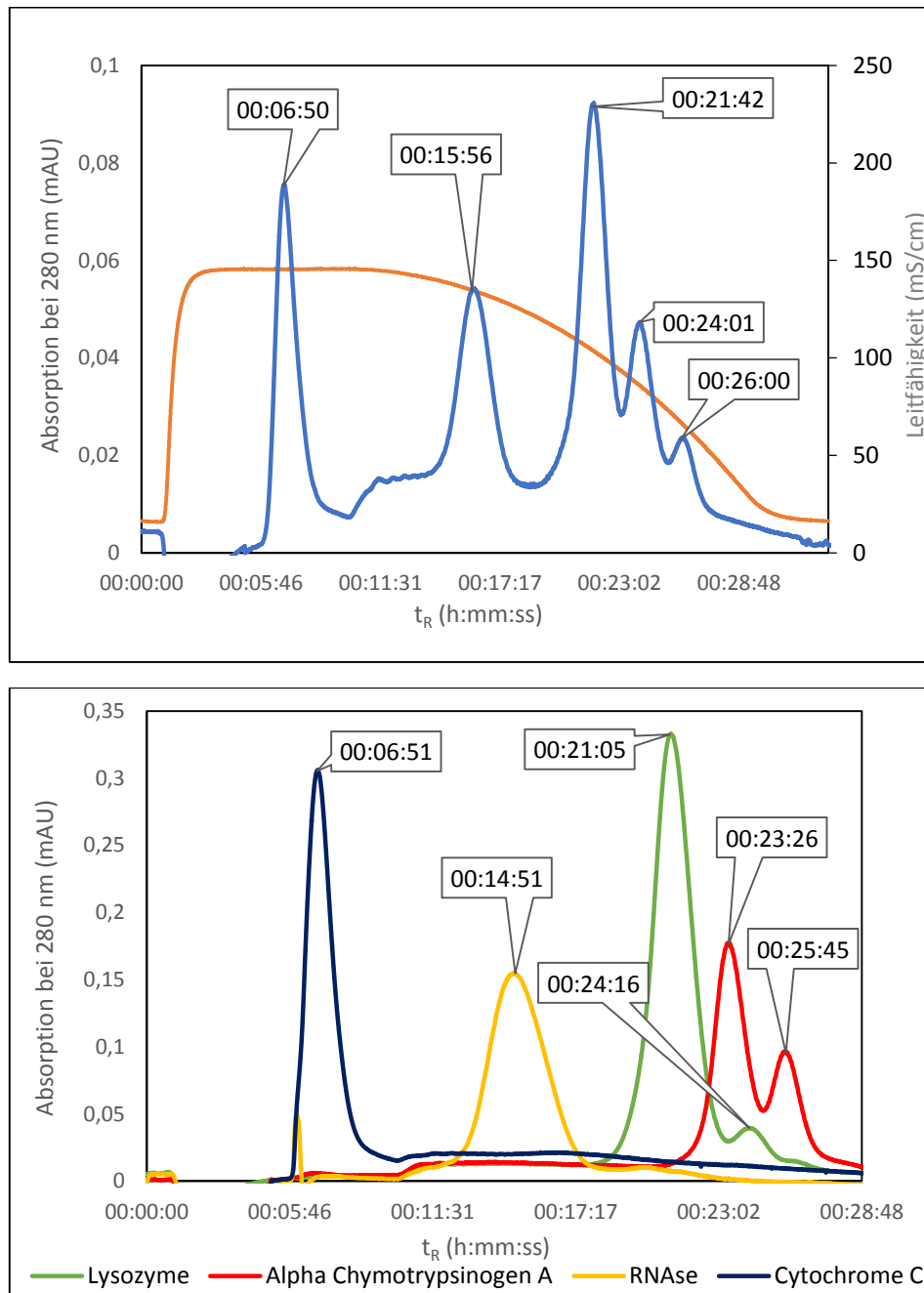


Abbildung 13: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Tri-Ammoniumcitrat (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1,7 M Tri-Ammoniumcitrat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000  $\mu$ l, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Hier sind wie bei Ammoniumsulfat 5 Peaks zu sehen, die dennoch mehr oder weniger schlecht getrennt sind. Cytochrome C wird ebenso schon bei niedriger Retentionszeit eluiert. RNase A hingegen wird etwas länger retardiert. Die Interaktion zwischen Lysozym und dem Trägermaterial nimmt zu.  $\alpha$ -Chymotrypsinogen bindet noch stärker und wird auch als Doppel-Peak getrennt.

## Trennung mit Natriumsulfat

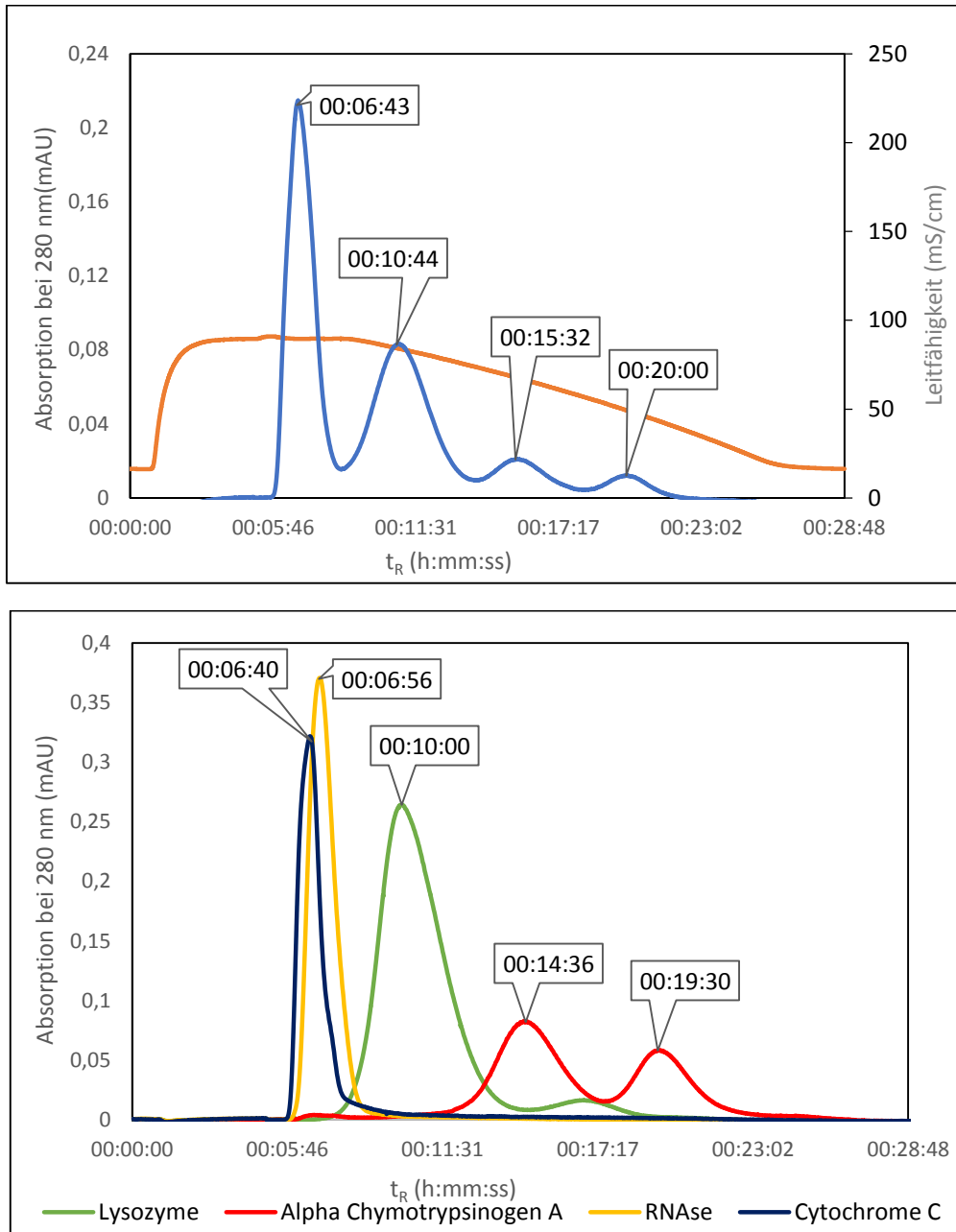


Abbildung 14: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Natriumsulfat (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1 M Natriumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000  $\mu$ L, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Die Auftrennung des Standardproteinmischs mit Natriumsulfat ergab 4 Peaks. Cytochrome C wechselwirkte weiterhin nur sehr schwach mit der Säulenmatrix, gefolgt von Lysozym. Durch Vergleich mit den Retentionszeiten der einzelnen Substanzen ließ sich erkennen, dass RNase A, welche auf dem Chromatogramm des Proteingemischs nicht zu sehen ist, überlappt sich mit Cytochrome C. Die Selektivität mit Natriumsulfat lässt sich nur schwer einschätzen.

## Trennung mit Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

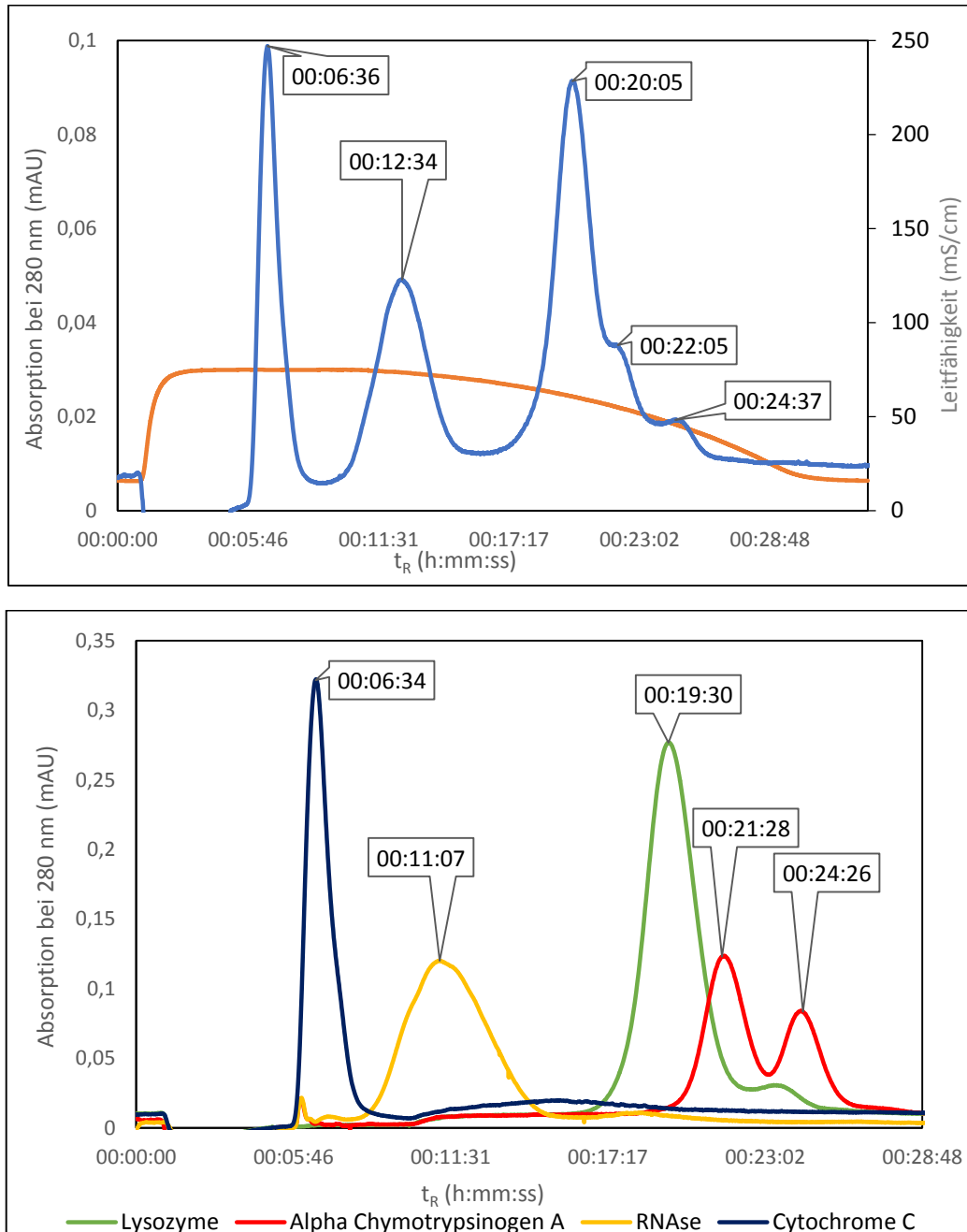


Abbildung 15: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000  $\mu$ L, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Im Gegensatz zu Natriumsulfat wurden alle einzelnen Komponente des Proteingemischs aufgetrennt. Die getrennten Substanzen zeigten in einem gewissen Maße eine gute Trennung bis auf Lysozym und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A. Die Durchlaufzeiten der jeweiligen Substanzen nehmen zu.



## Trennung mit Natriumchlorid

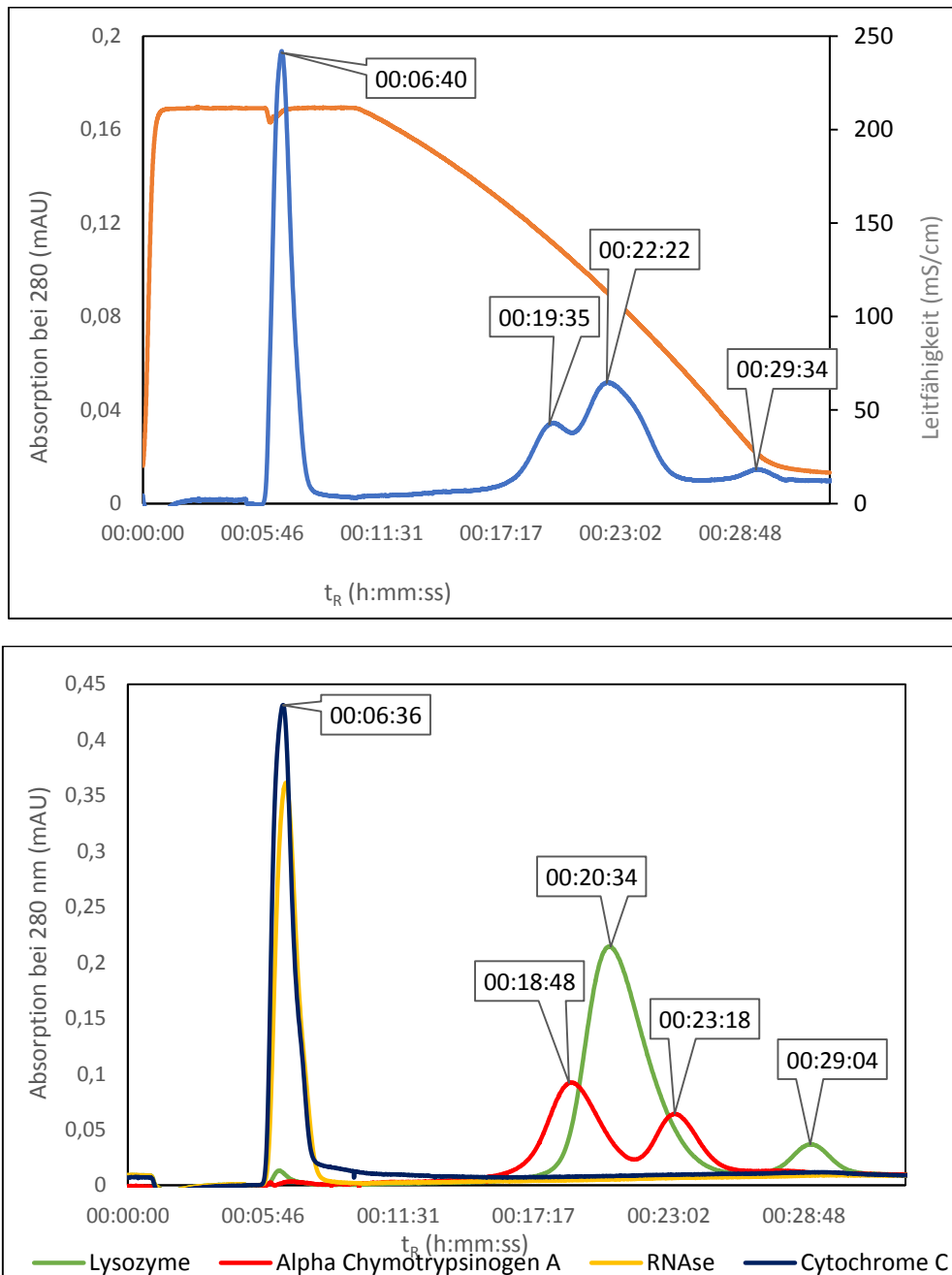


Abbildung 16: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Natriumchlorid (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogen-phosphatspuffer pH 7 + 3 M NaCl zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatspuffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000  $\mu$ l, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Abbildung 16 zeigt das Chromatogramm der aufgetrennten Proteine mittels Natriumchlorid. Cytochrome C wird schon bei niedriger Retentionszeit eluiert. RNase A hingegen wurde nicht isoliert. Lysozym und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A weisen beide keine gute Selektivität auf.

## Trennung mit Ammoniumchlorid

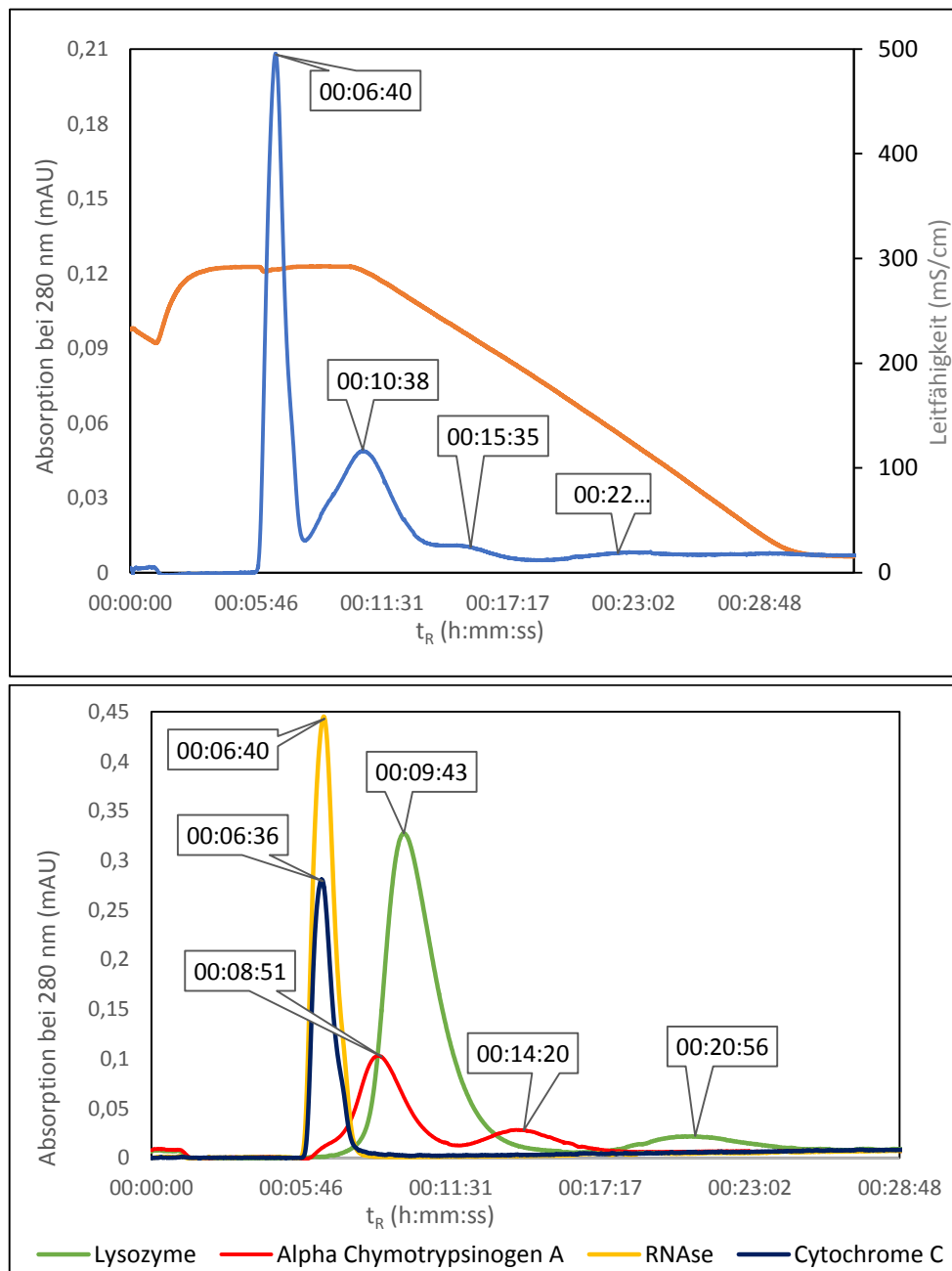


Abbildung 17: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Ammoniumchlorid (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 3 M Ammoniumchlorid zur Bindung, lineares Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000  $\mu$ L, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Das Chromatogramm der Analyse von Standardproteinen anhand von Ammoniumchlorid zeigt schlechte getrennten Peaks. Die Elutionsreihenfolge ist der Natriumchlorid ähnlich, allerdings ist die Selektivität noch schlechter als bei Natriumchlorid. Dennoch besitzen die mit Natriumchlorid gebundene Proteine eine höhere Durchlaufzeit. Im Vergleich zu den anderen Salzen besitzt Ammoniumchlorid die schlechtesten Bindungs- und Trennungseigenschaften.

## Trennung mit Lithiumsulfat

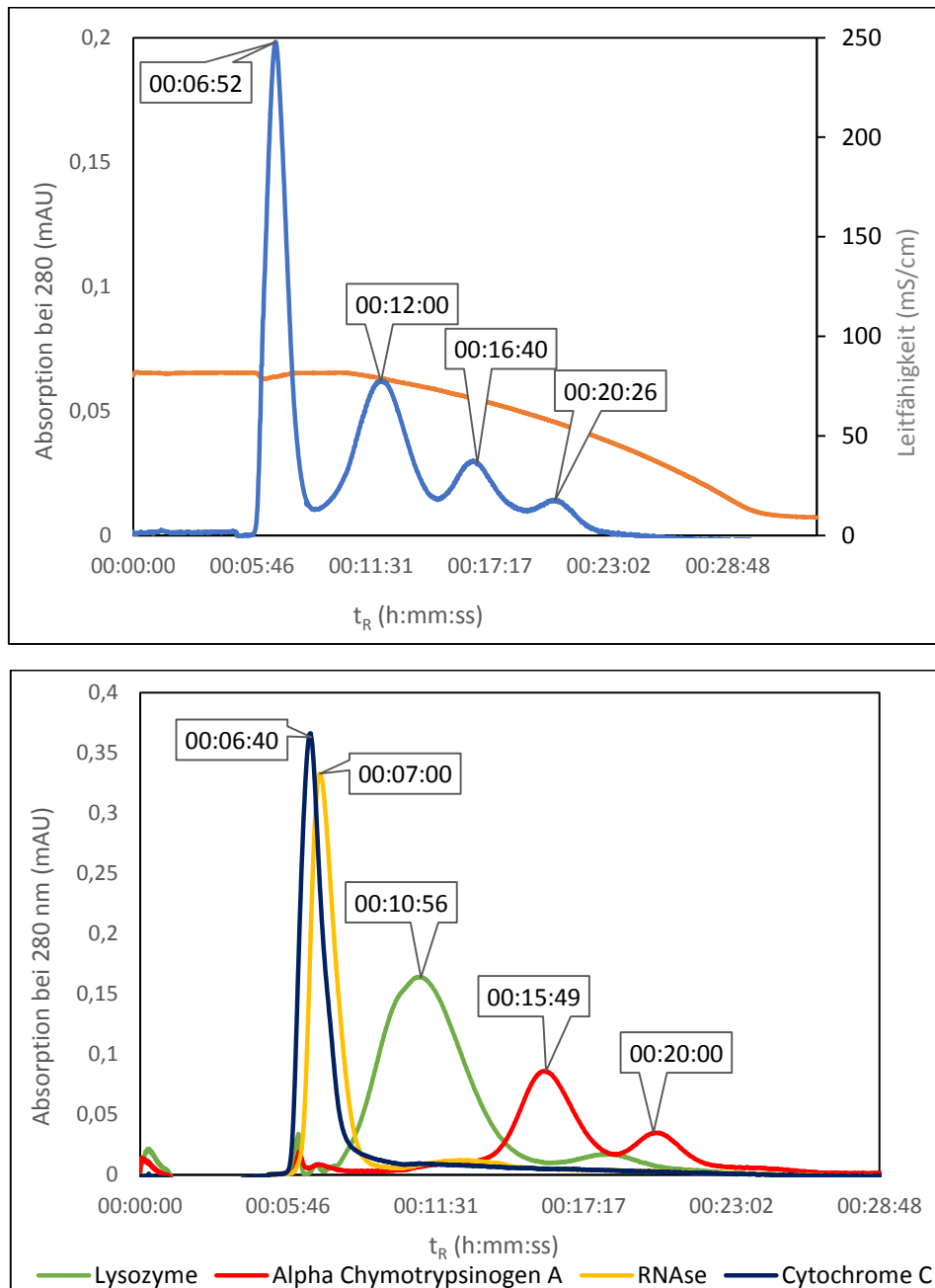


Abbildung 18: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Lithiumsulfat (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Tris-HCl, pH 7 + 1 M Lithiumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000  $\mu$ l, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Die Proteintrennung mit Lithiumsulfat ist mit der von Natriumsulfat vergleichbar. Cytochrome C und RNase A weisen mit beiden Salztypen fast die gleiche Retentionszeiten auf. Die Trennung von Lysozym ist auch der von  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A ähnlich.

## Trennung mit Kaliumsulfat

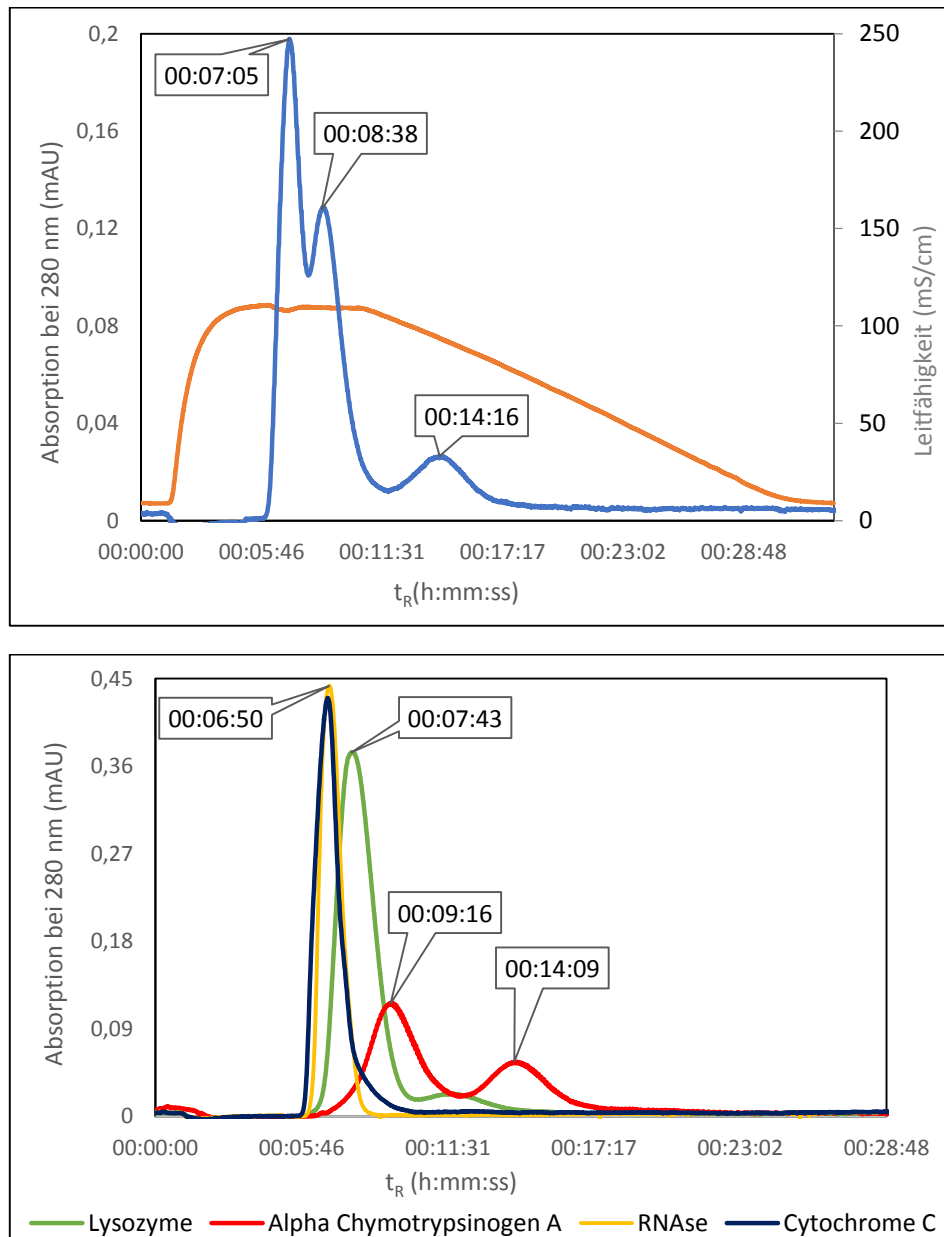


Abbildung 19: Chromatogramm eines Gemischs aus 4 Proteinen mit Kaliumsulfat (oben) sowie Summe von 4 Chromatogrammen der einzelnen Proteine (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Tris-HCl, pH 7 + 0,6 M Kaliumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, über 20 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, Schleifenvolumen 1000 µl, Probenkonzentration 1 mg/mL.

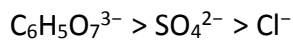
Mit 0,6 M Kaliumsulfat konnten nur Cytochrome c, Lysozym und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A isoliert werden. Die Qualität der Trennung und die Auflösung sind im Vergleich zu anderen Sulfatsalzen schlecht, aber im Vergleich zu Ammoniumchlorid etwas besser. Die Trennung könnte theoretisch vielleicht noch gesteigert werden, wenn eine höhere Löslichkeit von

Kaliumsulfat vorliegen wäre. Allerdings sind höhere Konzentrationen wegen der begrenzten Löslichkeit nicht möglich.

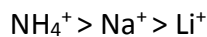
### 4.3 Vergleich starker und schwacher Ionen

Die experimentellen Messungen des Standardproteins durch Gradientenchromatographie zeigte unterschiedliche Bindungseigenschaften und Selektivität. Vergleicht man die Wirkungsweise der kosmotropen Salze, so lassen sich deren Kationen und Anionen nach ihrem chaotropen Effekt, wie in nachfolgendem Schema geschildert, einordnen.

**Anionen:**



**Kationen:**



In obenstehendem Schema steigt der kosmotrope Effekt von Kationen überraschenderweise von rechts nach links. Das Ergebnis widerspricht der Beschreibung der Hofmeister-Serie.

### 4.4 Einfluss von Kationen und Anionen auf die Form der Durchbruchkurve

Zur Beschreibung des Einflusses von Ionen auf den Durchbruchkurvenverlauf wurden zahlreiche Versuche mit BSA mittels Frontalchromatographie bei verschiedenen Salzkonzentrationen und Fließmittelgeschwindigkeiten durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 1 g des Zielproteins im ausgewählten HIC-Bindungspuffersystem gelöst und über die P-500 Pumpe kontinuierlich auf die Trennsäule gegeben. Die Desorption erfolgte durch einen Sprung von Hochsalz- auf Niedrigsalzbedingungen. Die Messungen lieferten Durchbruchkurven mit unterschiedlichen Verläufen. Um eine bessere Übersicht zu erhalten wurden für jede Salzkonzentration und Säulentyp alle einzelnen Messungen in einer einzigen Abbildung bei verschiedenen Flussraten zusammengestellt.

## Durchbruchskurve mit 3 M Natriumchlorid

- 3 M Natriumchlorid Mit Phenyl Sepharose 6FF (low sub) und 6FF (high sub)

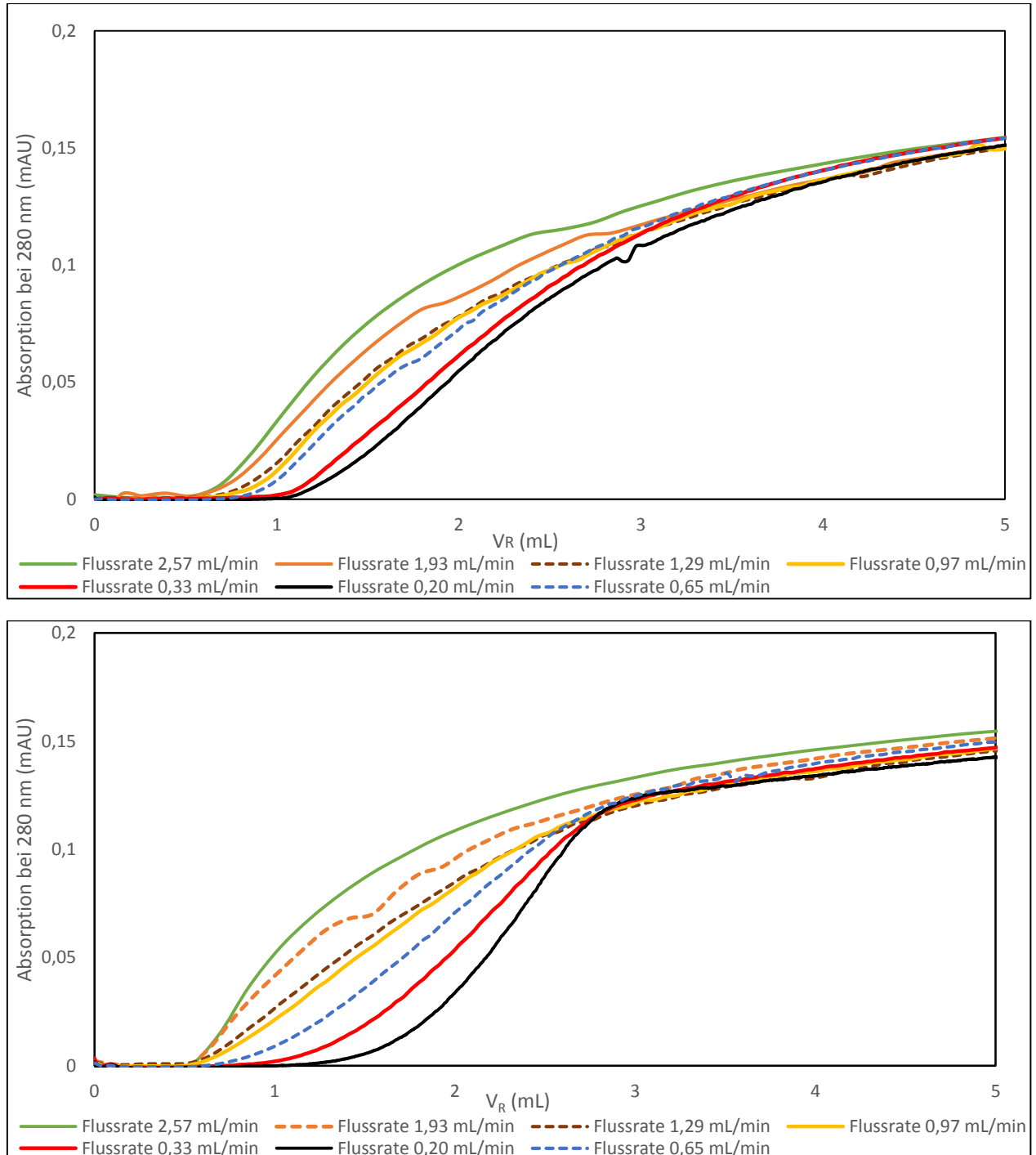


Abbildung 20: Durchbruchkurven mit 3 M Natriumchlorid mit Phenyl-Sepharose 6FF (low sub) (oben) und 6FF (high sub) (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF (low sub) (oben) bzw. (high sub) (unten), 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 3 M Natriumchlorid zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

- **3 M Natriumchlorid Mit Phenyl Sepharose HP**

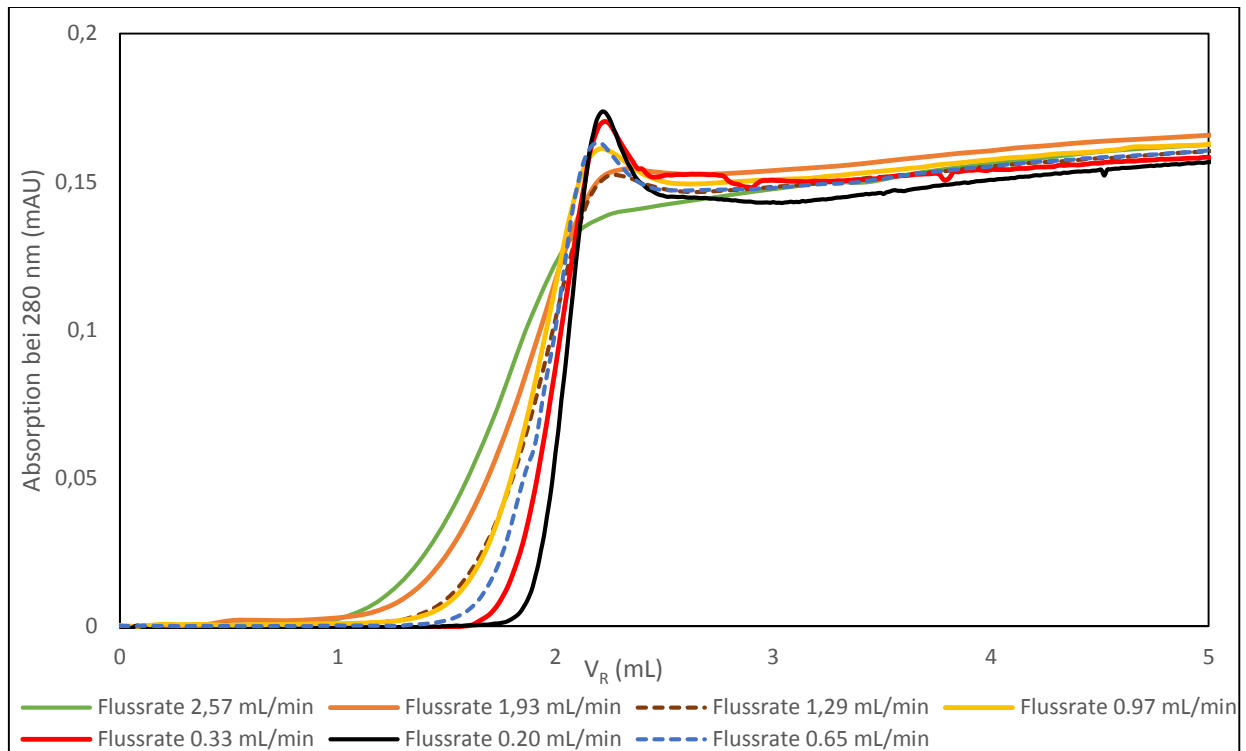


Abbildung 21: Durchbruchskurven mit 3 M Natriumchlorid mit Phenyl-Sepharose HP.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 2 M Natriumchlorid zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Während die mit Natriumchlorid erhaltenen Durchbruchskurven mit beiden Phenyl Sepharose 6FF low- und 6FF high sub (vgl. Abb. 20) insgesamt eine flache Form aufweisen, verlaufen diese mit Phenyl Sepharose HP bei abnehmenden Flussraten eher steiler. Auffallend hierbei ist, dass die Durchbruchskurven besonders bei niedrigeren Flussraten nach Erreichen der maximalen Beladung erst leicht abfallen und dann gleichmäßig auf hohem Niveau verlaufen.

Da die mit niedrigeren Salzkonzentrationen (2,5M und 2 M) gemessenen Durchbruchskurven mit Natriumchlorid eine einheitliche Kurvenart aufwiesen, wird darauf verzichtet, sämtliche einzelnen Messungen dieser beiden Salzkonzentrationen an dieser Stelle abzubilden. Diese Vorgehensweise wird auch bei den weiteren kosmotropen Salzen angewendet .

## Durchbruchskurve mit Ammoniumchlorid

- 3 M Ammoniumchlorid Mit Phenyl Sepharose 6FF (low sub) und 6FF (high sub)

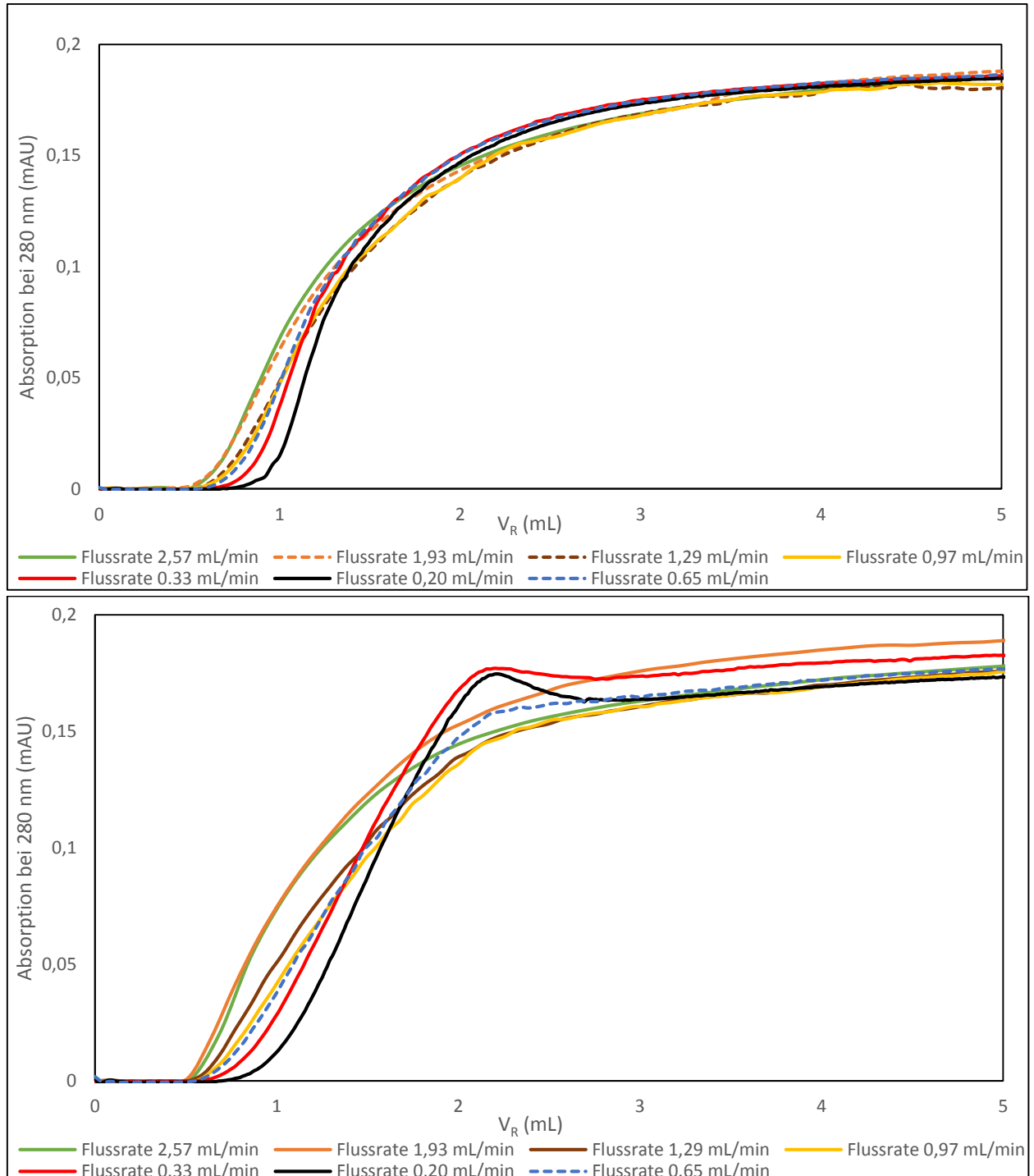


Abbildung 22: Durchbruchskurven mit 3 M Ammoniumchlorid mit Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) sowie 6FF high sub (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. high sub (unten), 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 3 M Ammoniumchlorid zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.



- **3 M Ammoniumchlorid mit Phenyl Sepharose HP**

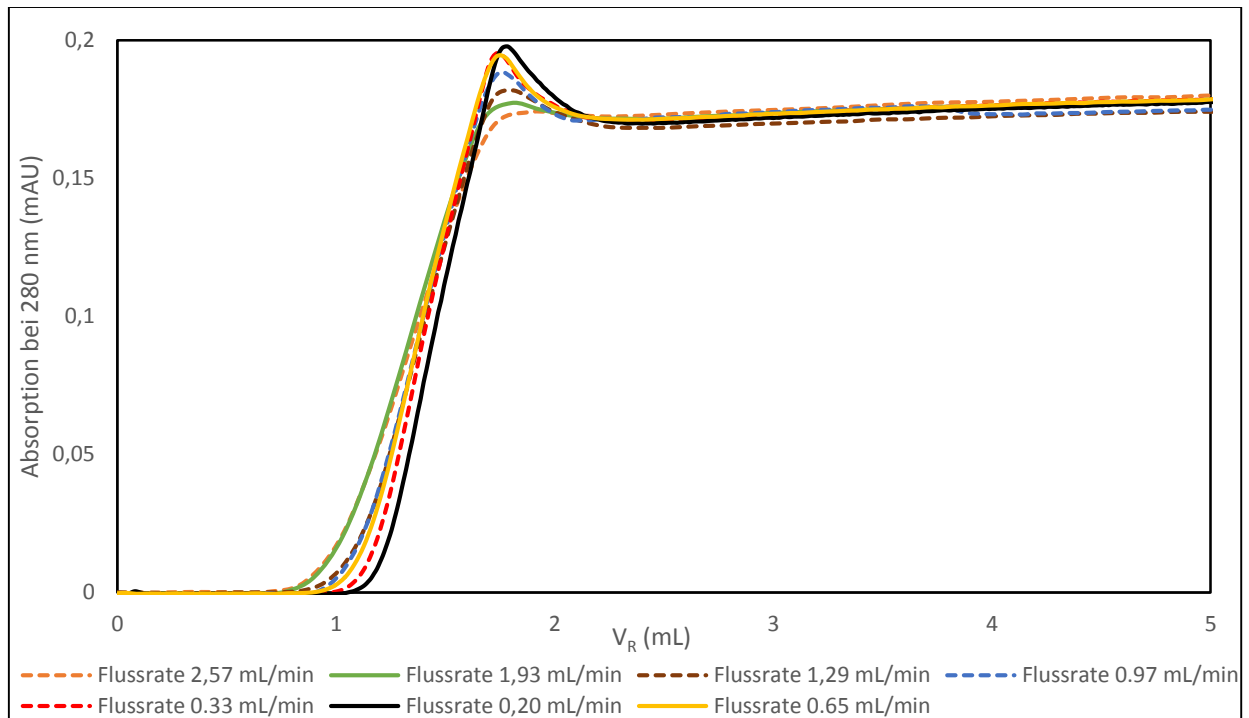


Abbildung 23: Durchbruchskurven mit 3 M Ammoniumchlorid mit Phenyl-Sepharose HP. Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogen-phosphatspuffer pH 7 + 3 M Ammoniumchlorid zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatspuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Vergleicht man die mit Ammoniumchlorid gewonnenen Durchbruchskurven mit den mit Natriumchlorid gewonnenen, so lässt sich erkennen, dass sie ähnlich verlaufen. Im Gegensatz zu Ammoniumchlorid bindet Natriumchlorid jedoch stärker.

## Durchbruchskurve mit 0,6 M Kaliumsulfat

- Mit Phenyl Sepharose 6FF low- und 6FF high sub

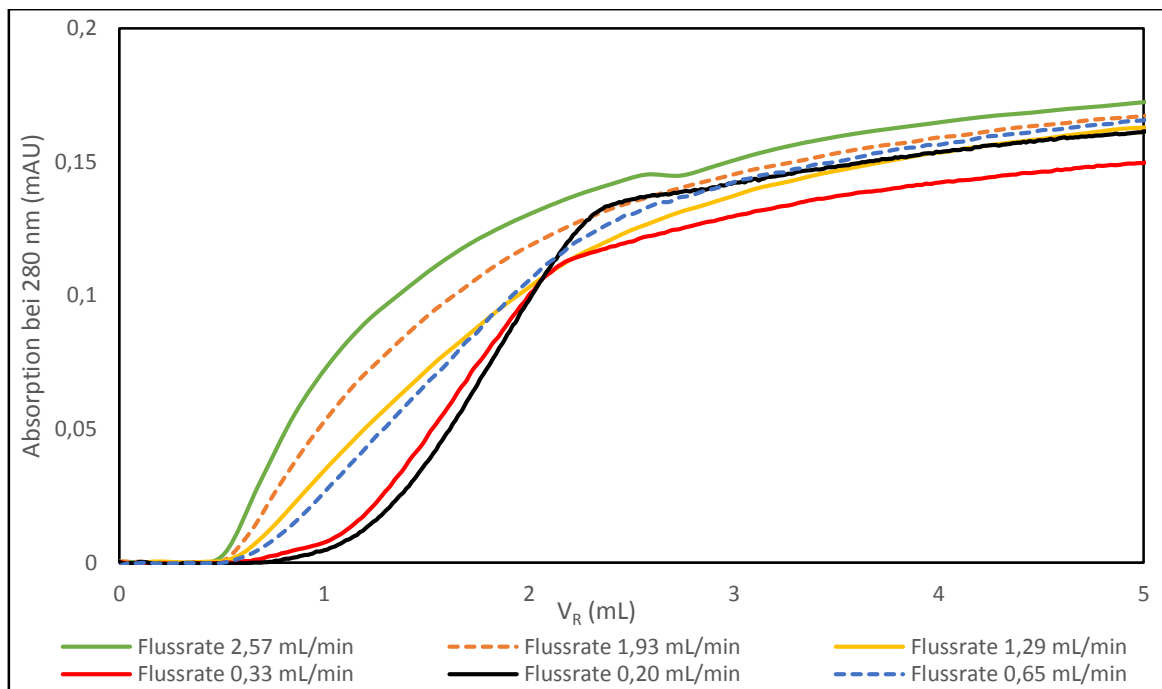
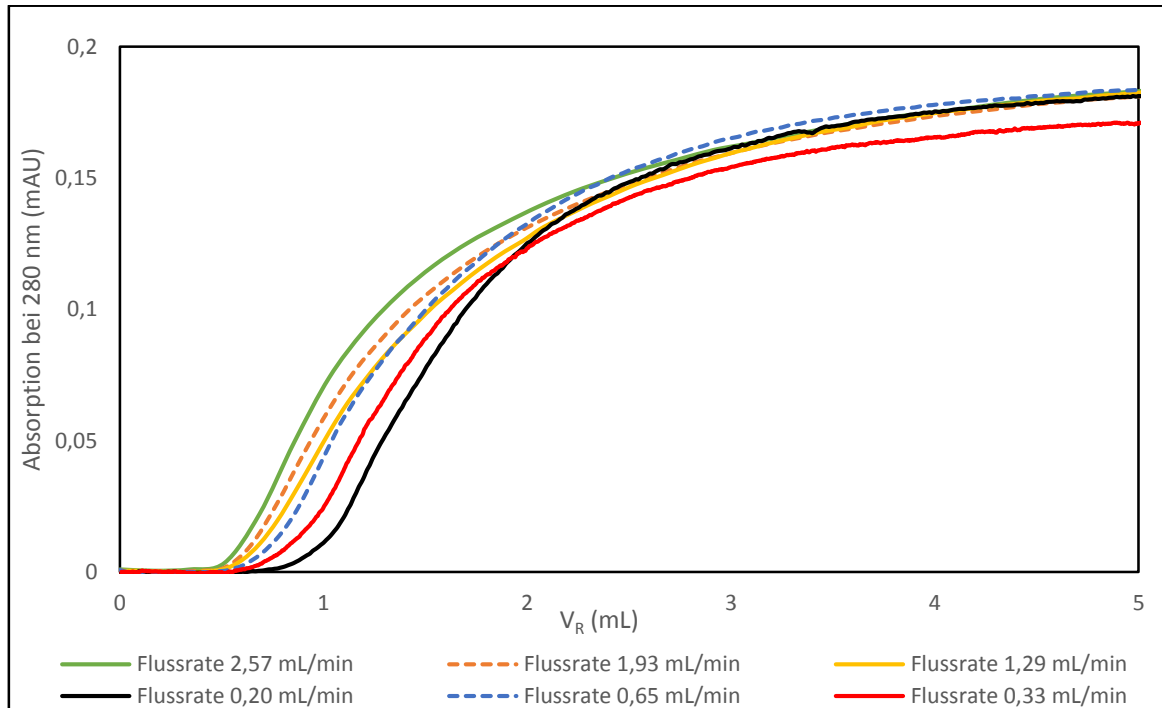


Abbildung 24: Durchbruchskurven mit 0,6 M Kaliumsulfat bei Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) sowie 6FF high sub (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6FF high sub (unten), 0,1 M Tris-HCl, pH 7 + 0,6 M Kaliumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

### 0,6 M Kaliumsulfat mit Phenyl Sepharose HP

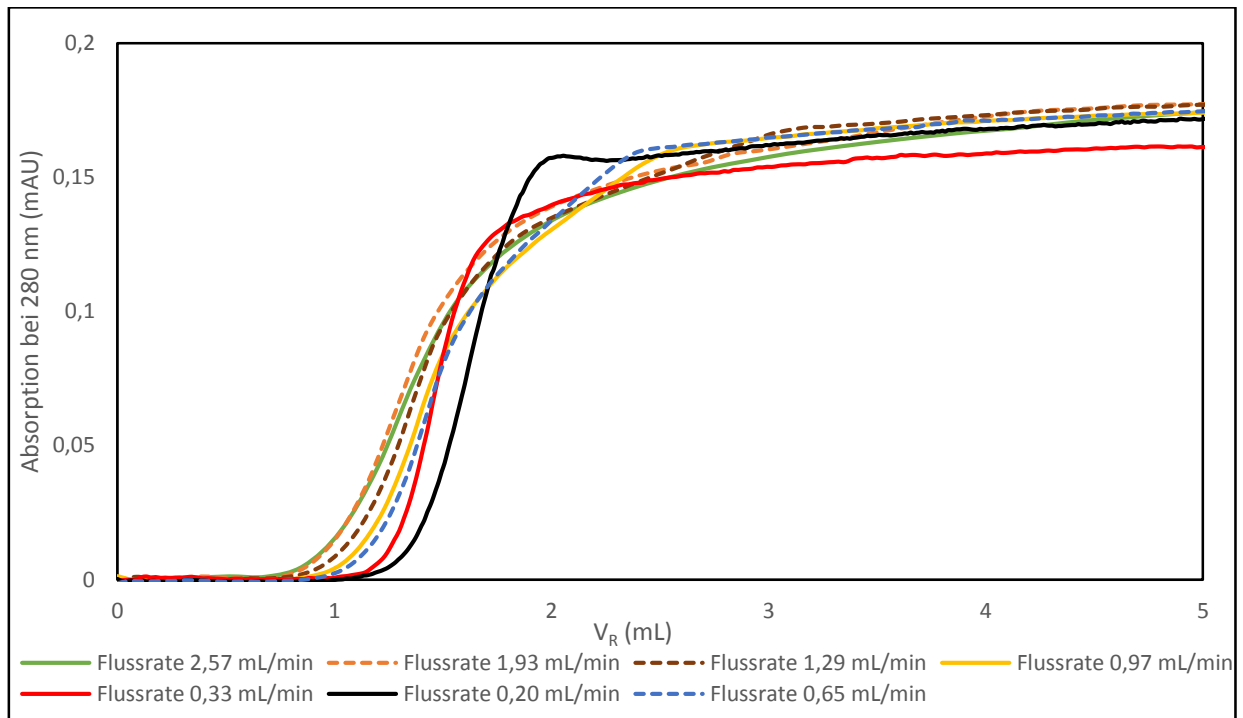


Abbildung 25: Durchbruchskurven mit 0,6 M Kaliumsulfat mit Phenyl-Sepharose HP.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Tris-HCl, pH 7 + 0,6 M Kaliumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Die Messungen mit Kaliumsulfat lieferten mit beiden Phenyl Sepharose FF low- und high sub auch Kurven, die mit steigenden Flussraten bereits zu Beginn durchbrechen (Abb. 24). Dieser Effekt ist besonders mit FF low sub ausgeprägter. Aufgrund der höheren Flussraten werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen fließender mobiler Phase und stationärer Phase geringer. Interessanterweise ist dabei festzustellen, dass selbst mit einer Konzentration von 0,6 M bei Kaliumsulfat eine gewisse Bindungskapazität stattfindet, welche mit zunehmenden Fließmittelgeschwindigkeiten absinkt.

## Durchbruchskurve mit 1 M Natriumsulfat

- 1 M Natriumsulfat mit Phenyl Sepharose 6FF low- und 6FF high sub

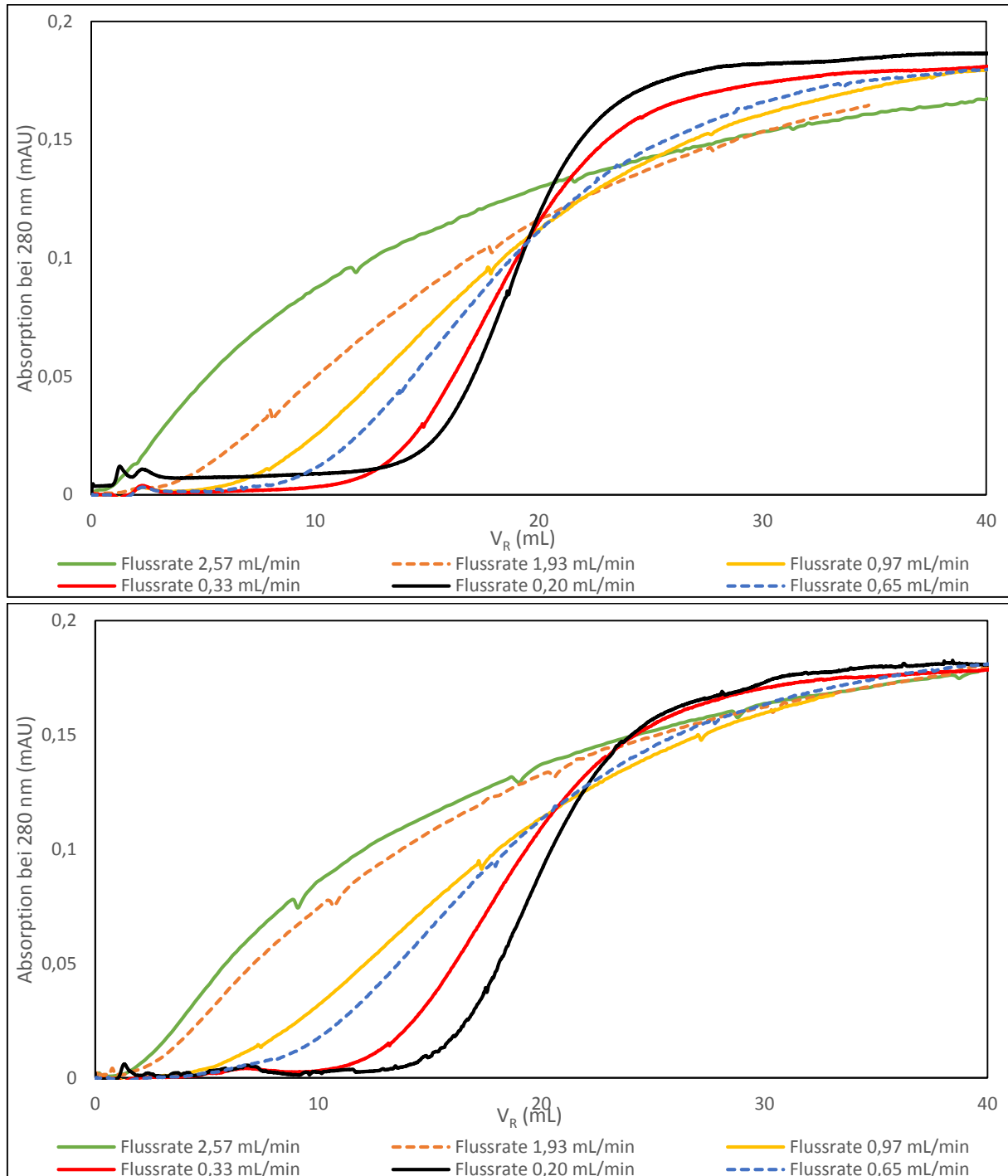


Abbildung 26: Durchbruchskurven mit 1 M Natriumsulfat bei Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) sowie 6FF high sub (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6 FF high sub (unten), 0,1 M Dinatriumhydrogen-phosphatspuffer pH 7 + 1 M Natriumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatspuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

- **1 M Natriumsulfat mit Phenyl-Sepharose HP**

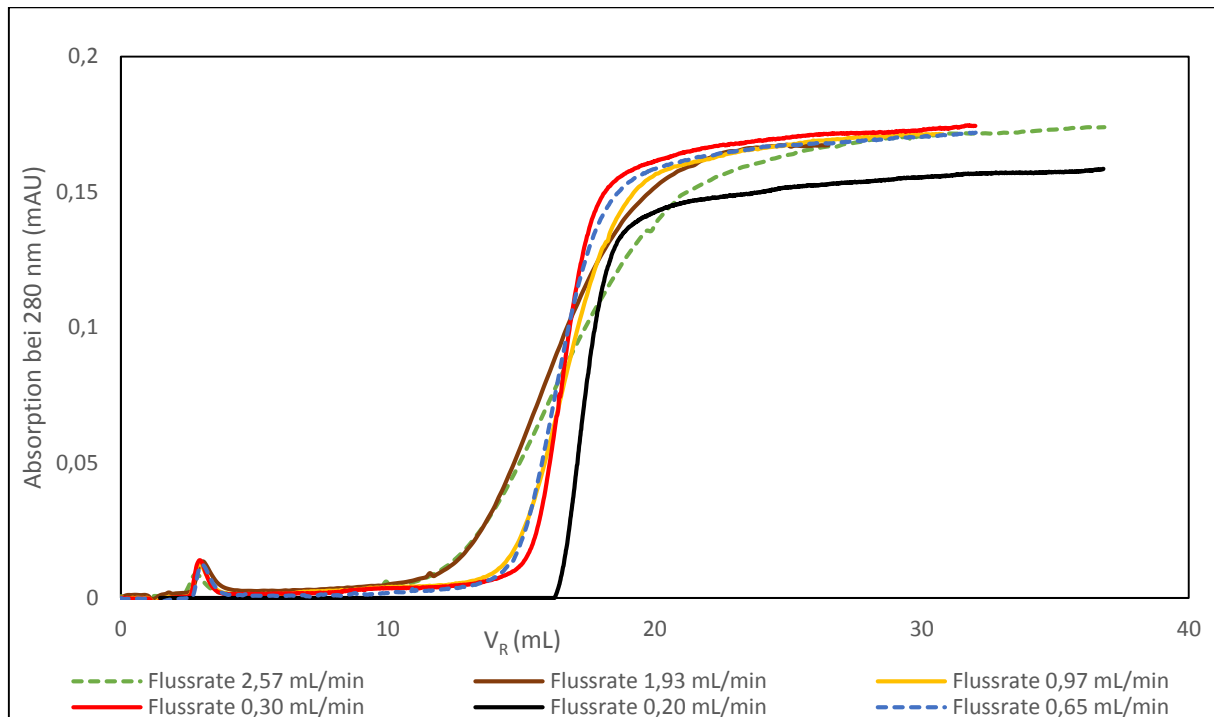


Abbildung 27: Durchbruchskurven mit 1 M Natriumsulfat mit Phenyl Sepharose HP.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1 M Natriumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Das obige Diagramm mit Phenyl Sepharose HP zeigt Durchbruchskurven mit einem sehr steilen Anstieg. Das ist auf die kleinere Partikelgröße der HP-Adsorbentien im Vergleich zu den FF-Adsorbentien zurückzuführen.

Das Ergebnis mit Phenyl Sepharose 6FF low- und 6FF high Sub ist in Abb. 26 dargestellt. Bestimmt man beispielweise die dynamische Bindungskapazität bei 2% der Durchbruchskurve, so erhält man das an die beiden Säulen gebundene Zielprotein (BSA), dessen Menge bei absinkenden Flussraten ansteigt. Dies liegt z.B. bei ca. 2,50 mg für die höchste (2,57 mL/min) und bei 14,90 mg für die niedrigste (0,33 mL/min) Fließgeschwindigkeit mit Phenyl Sepharose 6FF low sub sowie bei 3,43 mg und 16,25 mg mit Phenyl Sepharose 6FF high sub. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Substitutionsgrad beider Säulen überein (s. Tab. 3). Die Proteinbindung wird mit erhöhtem Substitutionsgrad des HIC-Adsorbens verstärkt.

## Durchbruchskurve mit 1 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat

- 1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Phenyl Sepharose 6FF low- und 6FF high sub

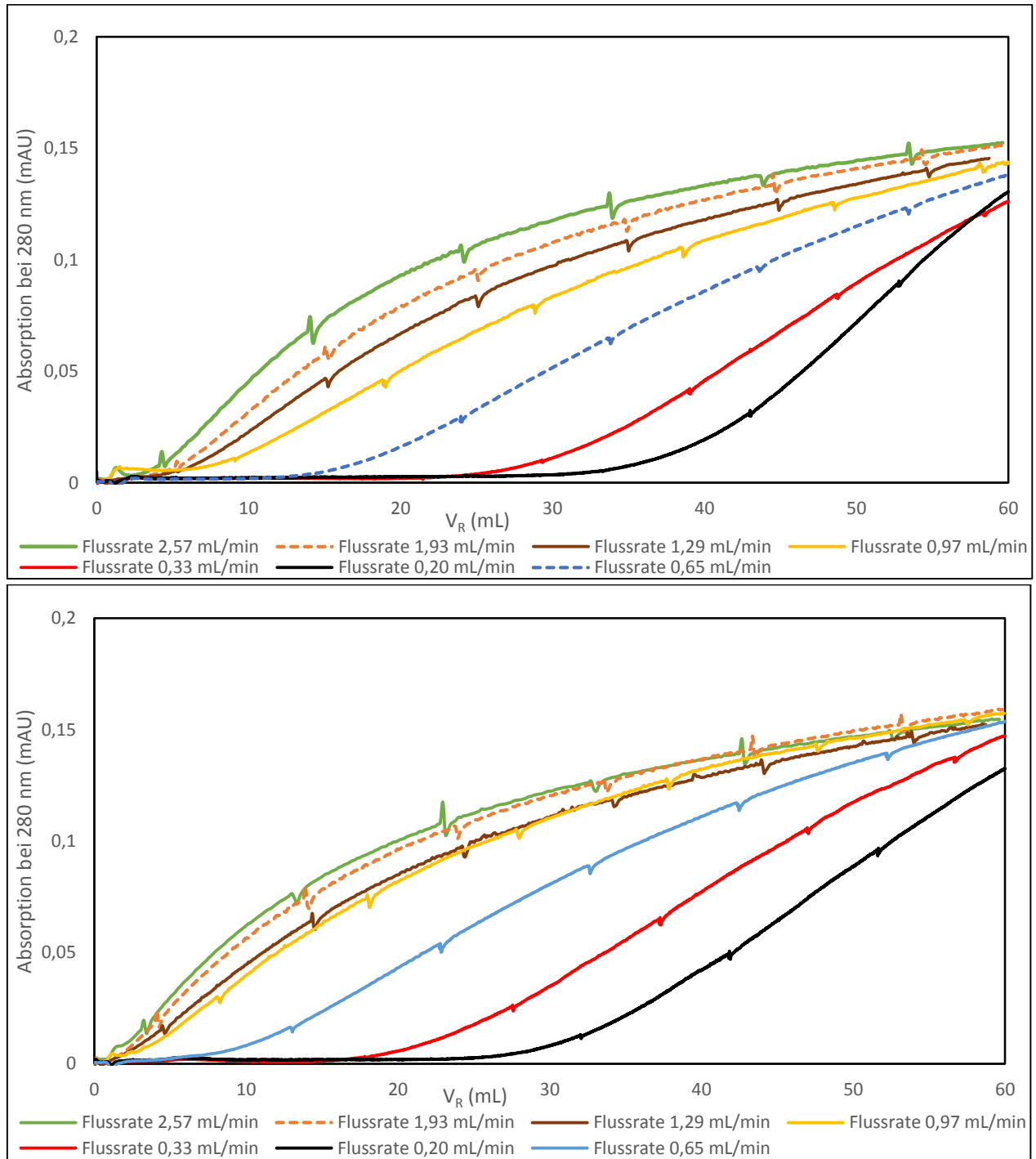


Abbildung 28: Durchbruchskurven mit 1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) sowie 6FF high sub (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6 FF high sub (unten), 0,1M Dinatriumhydrogen-phosphatspuffer pH 7 + 1 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatspuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

- 1 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit HP

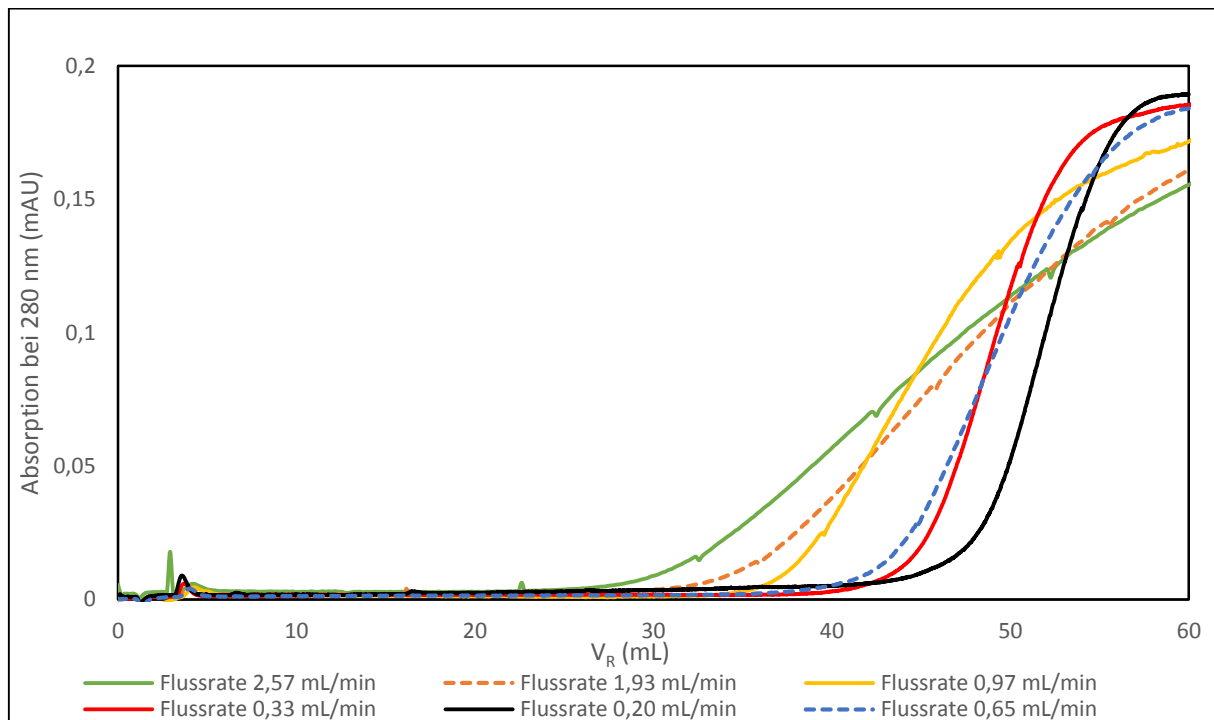


Abbildung 29: Durchbruchskurven mit 1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Phenyl-Sepharose HP.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Abbildung 28 zeigt stark links- und rechtsgekrümmte Formen von Durchbruchskurven (s. niedrigere und höhere Flussraten). Betrachtet man die dynamische Bindungskapazität der HIC-Trägermaterialien bei 2% der Durchbruchskurve, so stellt man fest, dass Phenyl Sepharose HP immer am stärksten bindet. Bei den Flussraten 2,57 mL/min, 0,33 mL/min und 0,20 mL/min beträgt die Menge des gebundenen BSA jeweils 33,5 mg, 43,8 mg und 47,6 mg mit Phenyl Sepharose HP sowie 6,2 mg, 33,2 mg und 40 mg mit Phenyl Sepharose 6FF low sub sowie 3,60 mg, 26 mg und 34,5 mit Phenyl Sepharose 6FF high sub. Die resultierenden dynamischen Bindungskapazität-Werte sind mit Phenyl Sepharose 6FF high sub überraschenderweise etwas geringer als mit 6FF low sub.

Im Vergleich mit Natriumsulfat lässt sich erkennen, dass Tri-Natriumcitrat-Dihydrat viel stärker bindet. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich Tri-Natriumcitrat-Dihydrat aus 3 Kationen ( $\text{Na}^+$ ) und 1 Anion ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$ ) zusammensetzt. Es besitzt aufgrund seines Valenztyps eine große Hydratationsfähigkeit. Je größer die stöchiometrische Wertigkeit, desto höher ist die Ionenstärke.

## Durchbruchskurven mit 1 M Lithiumsulfat

- 1 M Lithiumsulfat mit Phenyl Sepharose 6FF low- und 6FF high sub

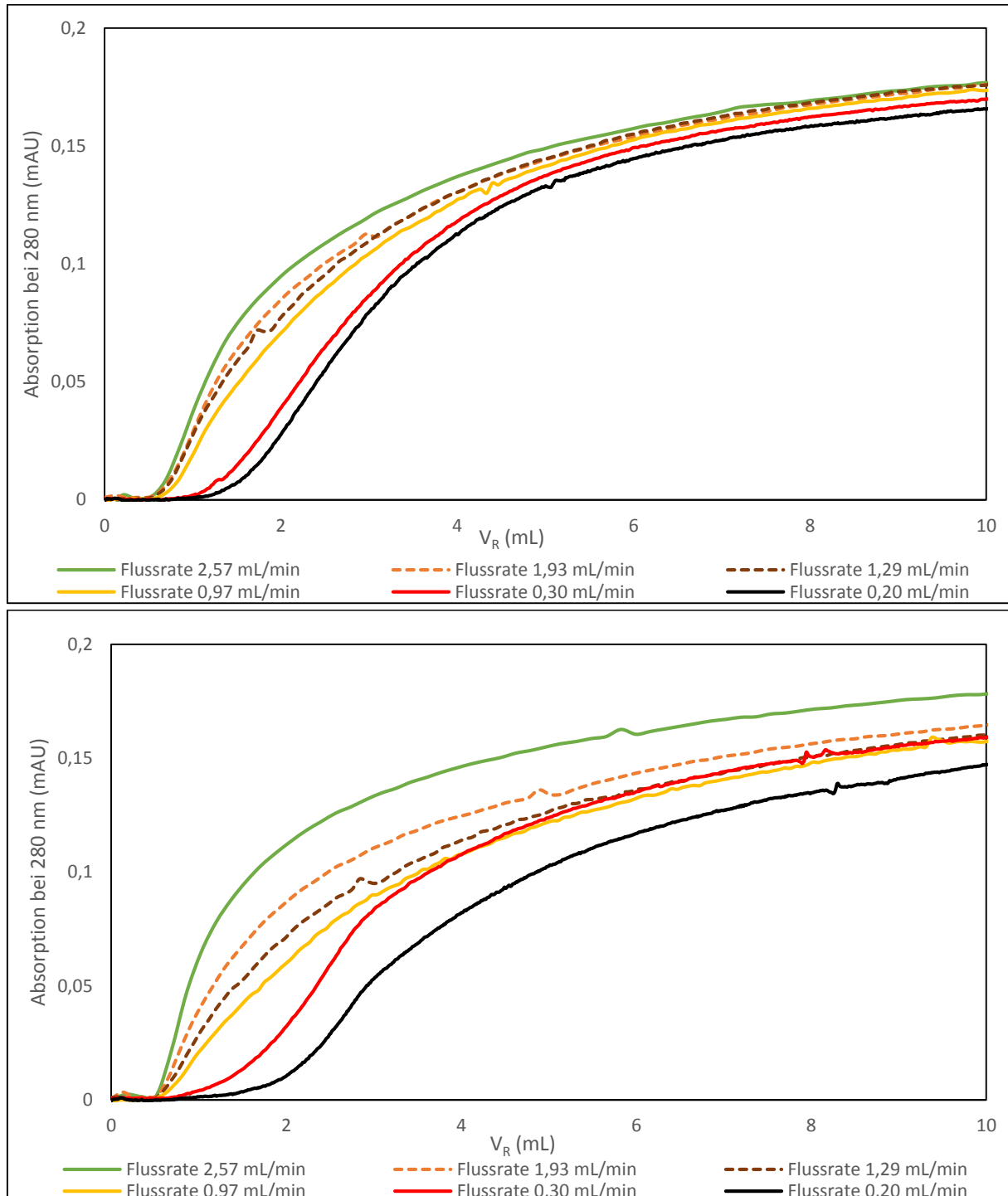


Abbildung 30: Durchbruchskurven mit 1 M Lithiumsulfat mit Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6FF high sub (unten). Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6FF high sub (unten), 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7 + 1 M Lithiumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.



- 1 M Lithiumsulfat mit HP

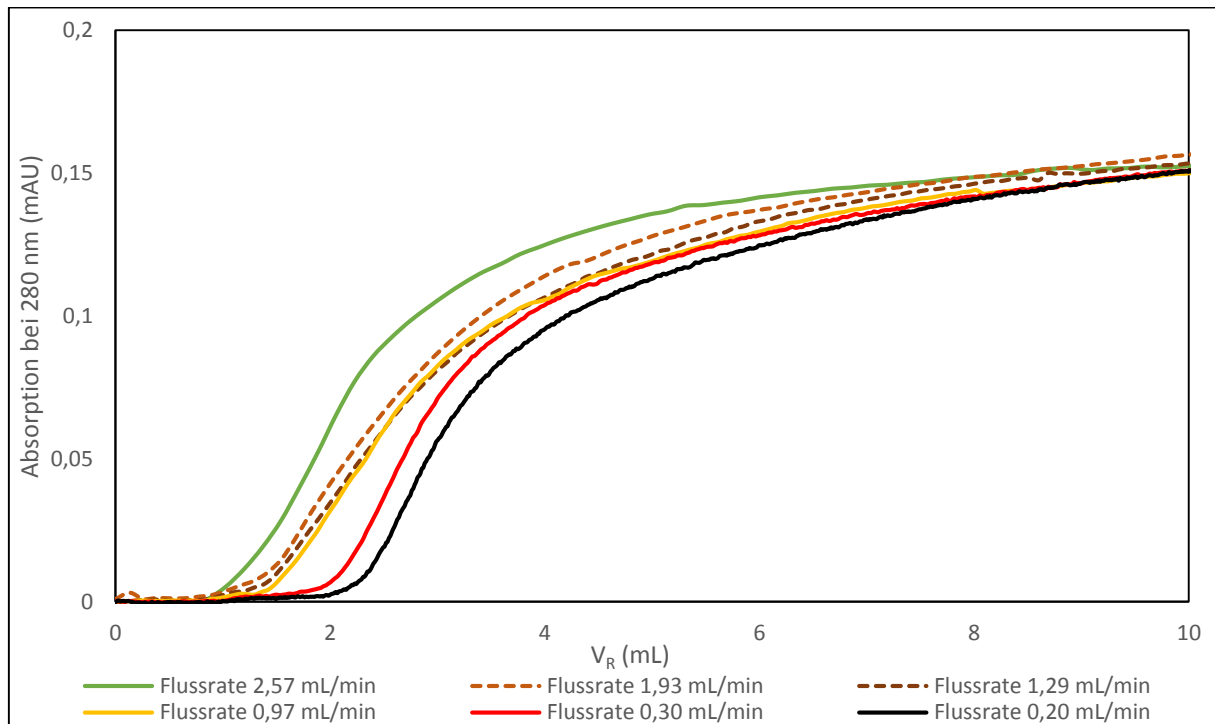


Abbildung 31: Durchbruchskurven mit 1 M Lithiumsulfat mit Phenyl-Sepharose HP.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7 + 1 M Lithiumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Die in Abbildung 30 erhaltenen Durchbruchskurven mit Lithiumsulfat zeigen eine sehr stark nach oben gebogene Form, was auf eine schlechte Adsorption hindeutet. Mit Phenyl-Sepharose hingegen verlaufen die Kurven etwas steiler und es lässt weiterhin die höchste dynamische Bindungskapazität erkennen.

## Durchbruchskurven mit 1 M Ammoniumsulfat

- 1 M Ammoniumsulfat mit Phenyl Sepharose 6FF low- und 6FF high sub

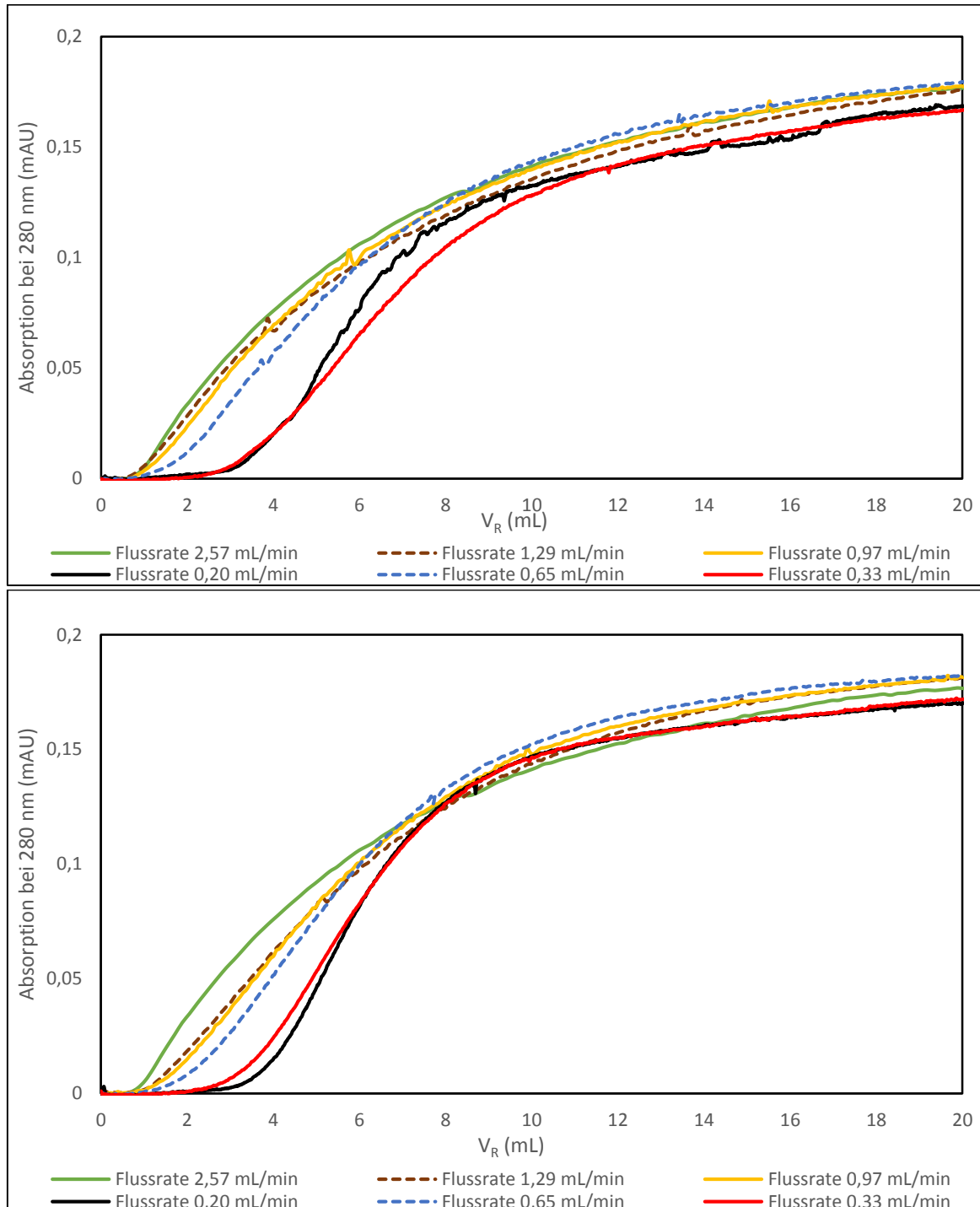


Abbildung 32: Durchbruchskurven mit 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mit Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) sowie 6FF high sub (unten). Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6 FF high sub (unten), 0,1M Dinatriumhydrogen-phosphatpuffer pH 7 + 1 M Ammoniumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

### 1 M Ammoniumsulfat mit HP

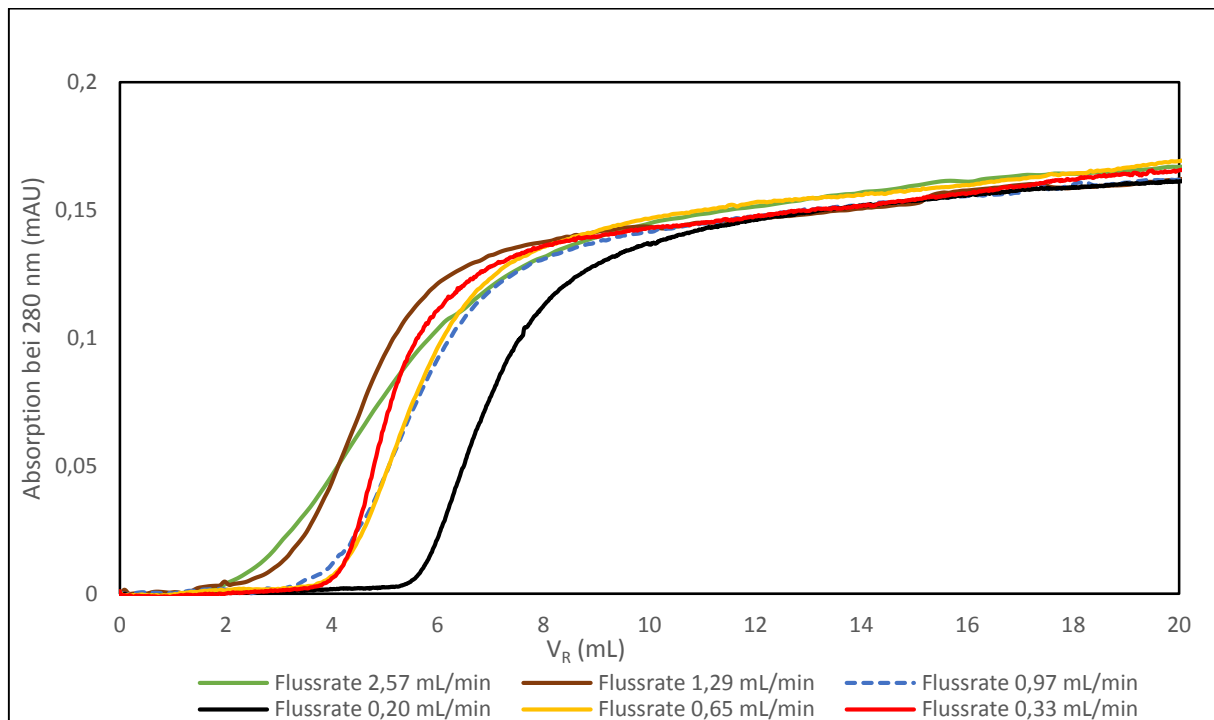


Abbildung 33: Durchbruchskurven mit 1 M Ammoniumsulfat mit Phenyl-Sepharose HP.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1 M Ammoniumsulfat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Die an die HIC-Adsorbens gebundene Menge von BSA bei höchster (2,57 mL/min) und kleinster (0,20 mL/min) Durchflussrate entsprach jeweils 3 mg und 5,97 mg mit Phenyl Sepharose Hp sowie 1,50 mg und 4 mg mit Phenyl Sepharose 6FF low sub sowie 1,50 mg und 4,25 mg mit Phenyl Sepharose 6FF high sub. Phenyl-Sepharose HP hingegen wies weiterhin steilere Durchbruchskurven und damit höchste dynamische Bindungskapazität auf.

Der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denen von Jungbauer zeigt, dass die Analyse mit Phenyl Sepharose HP aufgrund des kleineren Partikeldurchmessers im Allgemeinen zu schärferen Durchbruchskurven und damit zur höchsten dynamischen Bindungskapazität führt.

## Durchbruchskurven mit Tri-Ammoniumcitrat

- 1 M Tri-Ammoniumcitrat mit Phenyl-Sepharose 6FF low- und 6FF high sub

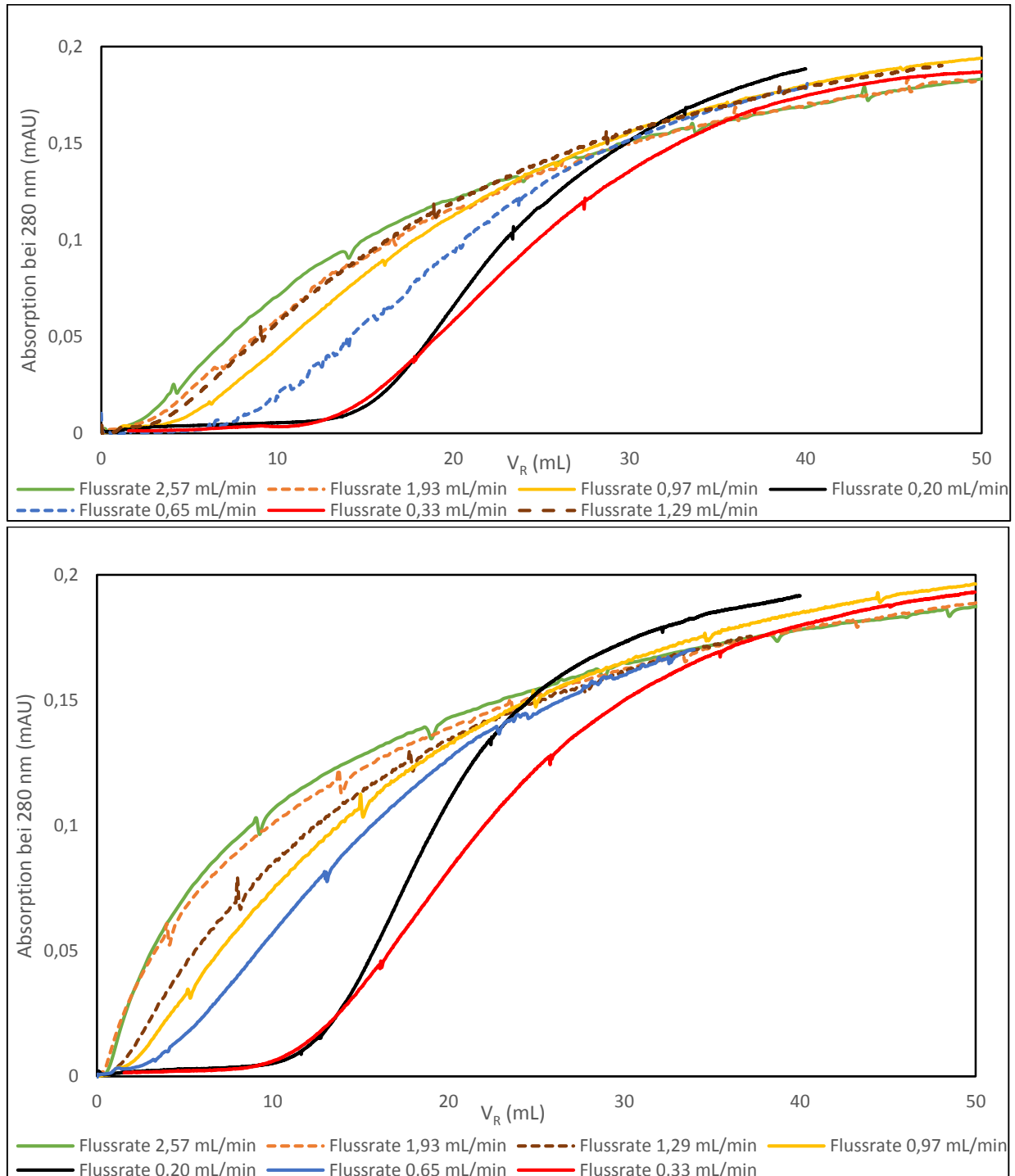


Abbildung 34: Durchbruchskurven mit 1 M Tri-Ammoniumcitrat mit Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6FF high sub (unten).

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose 6FF low sub (oben) bzw. 6 FF high sub (unten), 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1 M Tri-Ammoniumcitrat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

### 0,9 M Tri-Ammoniumcitrat mit Phenyl Sepharose HP

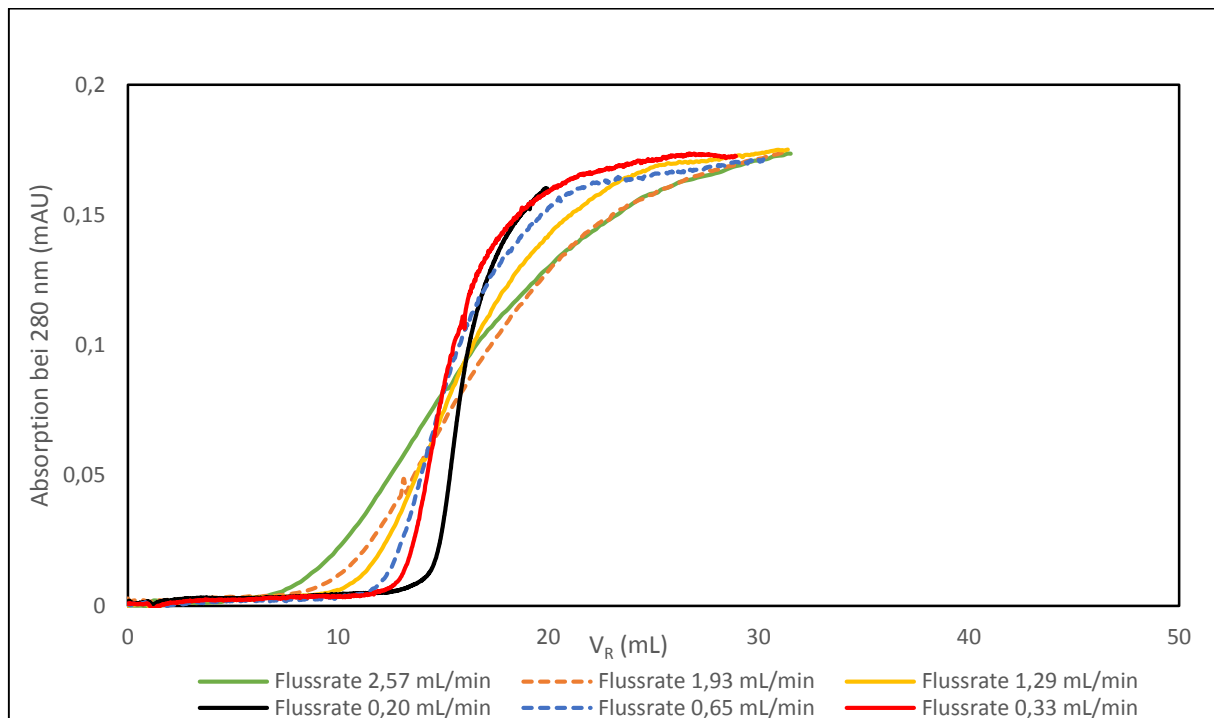


Abbildung 35: Durchbruchskurven mit 0,9 M Tri-Ammoniumcitrat bei Phenyl-Sepharose HP.

Chromatographische Bedingungen: Phenyl-Sepharose HP, 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer pH 7 + 1 M Tri-Ammoniumcitrat zur Bindung, linearer Gradient mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer über 10 Säulenvolumina, Flussrate 1 mL/min, direkte Injektion, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Da der Versuch mit 0,9 M Tri-Ammoniumsulfat mit HP besser verlief als der mit 1 M und beide gewonnenen Durchbruchskurven einen einheitlichen Verlauf aufwiesen, wird hier zur besseren Übersichtlichkeit die Messung mit 0,9 M Tri-Ammoniumcitrat dargestellt. Selbst bei niedrigerer Salzkonzentration von 0,9 M erzielt das Phenyl Sepharose HP weiterhin die höchste dynamische Bindungskapazität im Vergleich zu beiden Sepharose FF Adsorbentien.

#### 4.5 Einfluss von Kationen und Anionen auf die Bindungskapazität von Serumalbumin

Die experimentelle Arbeit mit kosmotropen Salzen durch die Frontalchromatographie bei variierten Konzentrationen und Flussraten mit hydrophoben substituierten Phenylgruppen-Säulen zeigten bei bestimmten Salztypen eine deutlich höhere Bindungskapazität. Dies lässt sich durch eine Zusammenstellung der resultierten Messungen mit entsprechenden Salztypen klar erkennen. Ein Beispiel bei niedrigerer und höherer Fließmittelgeschwindigkeit unter gleichen chromatographischen Bedingungen soll dies in nachfolgenden Abbildungen besser veranschaulichen.

##### Durchbruchskurven mit 1 M ausgewählten HIC-Puffersystemen bei Flussrate 2,57 mL/min an Phenyl Sepharose HP.

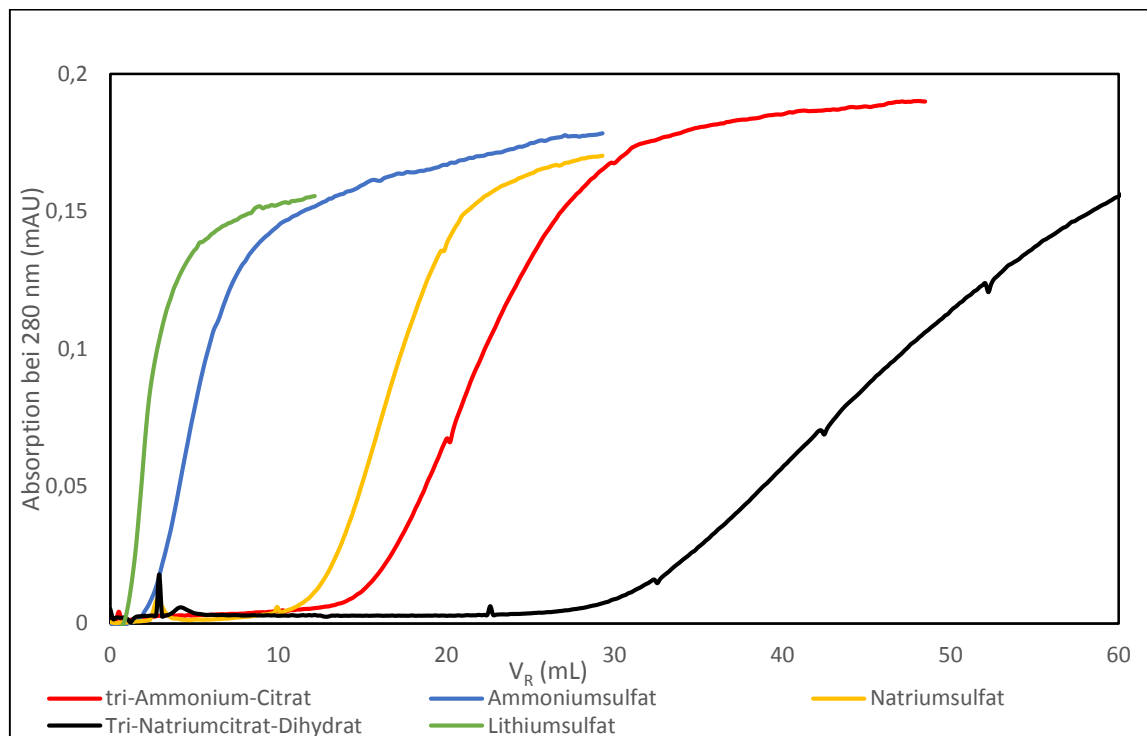


Abbildung 36: Durchbruchskurven mit 1 M ausgewählten HIC-Puffersystemen mit Phenyl-Sepharose HP, Flussrate 2,57 mL/min, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Stellt man beispielweise die bei 2,57 mL/min gemessenen Durchbruchskurven mit entsprechenden kosmotropen Salzen gegenüber, so lässt sich klar feststellen, dass Tri-Natriumcitrat-Dihydrat eine höhere Bindungskapazität mit der Phenyl Säulenmatrix hat. Für eine ermittelte Bindungskapazität z.B. bei Punkt 0,02 der Durchbruchskurve wird ca. 33,5 mg BSA mit Tri-Natriumcitrat-Dihydrat gebunden, gefolgt von Tri-Ammoniumcitrat mit 16,2 mg, danach Natriumsulfat mit 13,10 mg, Ammoniumsulfat mit 3 mg und Lithiumsulfat mit der geringsten gebundenen Menge an BSA von 1,40 mg.

**Durchbruchskurven mit 1 M ausgewählten HIC-Puffersystemen bei Flussrate 0,33 mL/min an Phenyl Sepharose HP.**

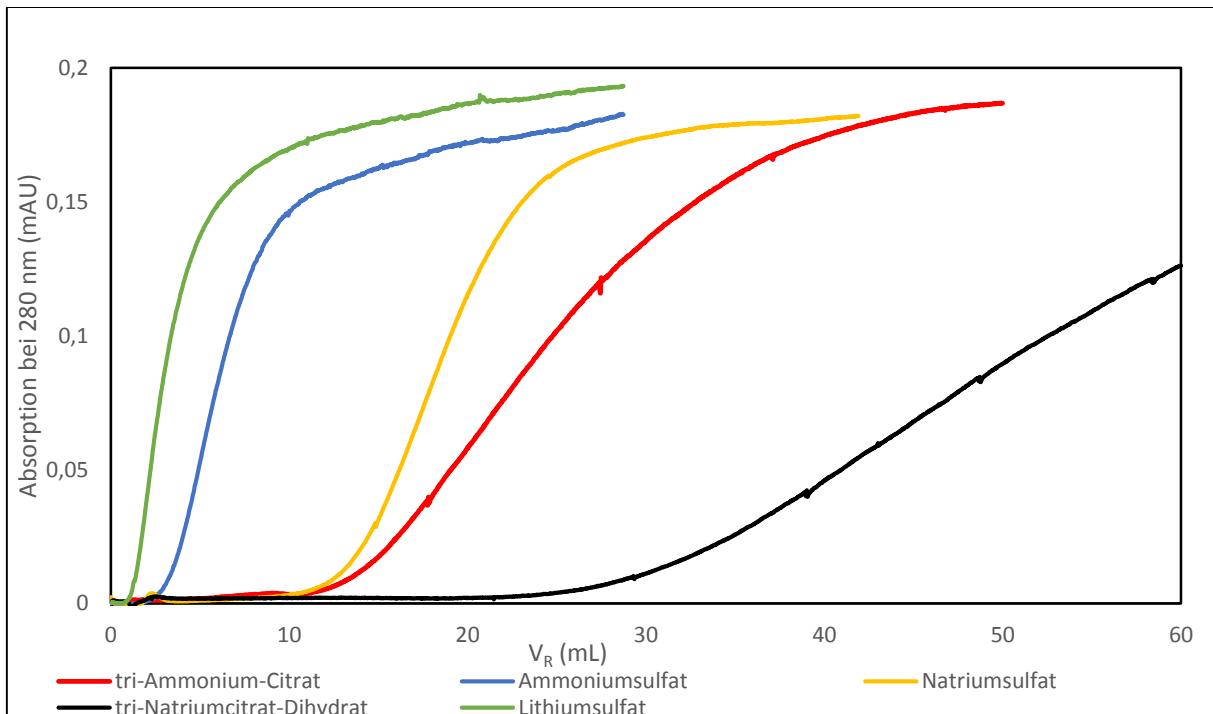
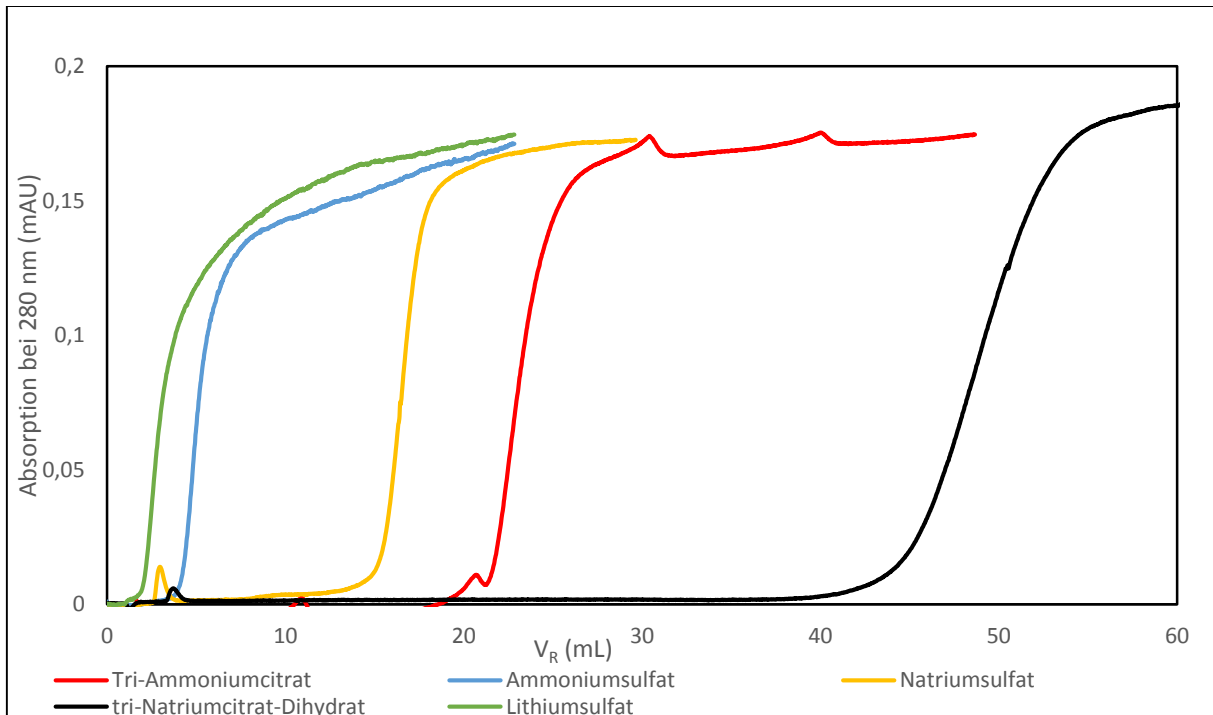


Abbildung 37: Durchbruchskurven mit 1 M ausgewählten HIC-Puffersystemen, Phenyl-Sepharose HP (oben) bzw. Phenyl-Sepharose FF low (unten), Flussrate 0,33 mL/min, Probenkonzentration 1 mg/mL.

Betrachtet man nun das Ergebnis mit niedrigerer Flussrate, so gelangt man zum gleichen Ergebnis bezüglich der Wirkung der Salz-Ionen auf die Bindungskapazität des BSA.

In Anwesenheit von Citrat Ionen sind die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Adsorptiv und Adsorbens stärker, BSA wird da am längsten retardiert und weist daher die höheren Retentionsvolumina auf. Somit lassen sich die Kationen und Anionen nach ihrer Wirkungsweise auf die Bindungskapazität von BSA mit Phenyl Sepharose HIC-Medien wie folgt klassifizieren:

**Anionen:**  $C_6H_5O_7^{3-} > SO_4^{2-}$

**Kationen:**  $NH_4^+ > Na^+ > Li^+$

Die Bindungskapazität von Anionen und Kationen nimmt von rechts nach links zu, was mit den Ergebnissen der Vorversuche in Bezug auf die Selektivität übereinstimmt.

Wie bereits im Abschnitt der Vorversuche angekündigt, sollte durch den Vergleich der Drücke die Viskosität von kosmotropen Salzen besser beurteilt werden.

**Tabelle 13:** Übersicht über Drücke von kosmotropen Salzen vor der Probenaufgabe mit Phenyl Sepharose HP bei 1 mL/min

Bezeichnung	Druck (PSI)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	36,31
Natriumsulfat	23,92
Lithiumsulfat	27,35
Kaliumsulfat	30,31
Tri-Ammoniumcitrat	30,04
Ammoniumsulfat	22
Ammoniumchlorid	24,34
Natriumchlorid	23,88

Die erhaltenen Drücke bestätigen erwartungsgemäß, dass Tri-Natriumcitrat-Dihydrat tatsächlich ein sehr visköses Salz ist. Je höher der Druck, desto visköser ist die Lösung.



#### 4.6 Einfluss der Fließmittelgeschwindigkeit

Die experimentelle Arbeit mit BSA durch die Frontalchromatographie diente zur Beschreibung der Wirkung der Fließgeschwindigkeit auf die Form der Durchbruchskurve. Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente ließen deutlich erkennen, dass die Fließmittelgeschwindigkeit erheblich die Form der Durchbruchskurve beeinflusst und damit die dynamische Bindungskapazität. Bei höheren Fließmittelgeschwindigkeiten weist die Durchbruchskurve eine flachere Form auf während sie bei niedrigeren Fließmittelgeschwindigkeiten eher steiler verläuft. Eine mögliche Hypothese dafür lässt sich durch das Adsorptionsgleichgewicht erklären. Bei höherer Fließmittelgeschwindigkeit ist die Verweilzeit innerhalb der Säule kurz und es bleibt wenig Zeit für die Proteine in das Porensystem hinein zu diffundieren. Da die Adsorption im Porensystem durch Diffusion kontrolliert wird, ist dieser Vorgang relativ langsam und es entsteht ein Art Stau. Dies führt dazu, dass ein Teil der Proteine nicht gebunden werden kann und die Säule ungebunden verlässt. Der Stauereffekt nimmt zu, wenn die Viskosität zunimmt, da die Diffusionsgeschwindigkeit in den Poren mit steigender Viskosität abnimmt, während dieser Effekt keinen Einfluss auf den Transport durch die Säule hat. Dabei nimmt die Breite der Massenübergangszone und damit die dynamische Kapazität ab. Die Durchbruchzeit wird also kürzer, was zu einem flacheren Verlauf der Durchbruchskurven führt. Bei niedrigen Fließmittelgeschwindigkeiten wird der Einfluss der Salzionen auf die Bindungskapazität besonders deutlich. Hier liegt eine lange Verweilzeit in der Säule vor. Dadurch wird auch bei langsamer Adsorptionsgeschwindigkeit eine gute Belegung der Bindungsstellen im Porensystem des Adsorbens möglich. Starke kosmotrope Salze wie Citrate zeigen dann, dass mit ihnen eine besondere hohe Kapazität am HIC-Adsorbent erreicht werden kann. Die Dicke der Massenübergangszone nimmt mit Zunahme der Durchbruchzeit zu und damit auch die dynamische Kapazität. Die Durchbruchskurve wird also schärfer (steiler). Dieser Effekt der Fließmittelgeschwindigkeit war mit Phenyl Sepharose HP-Säule weniger ausgeprägt als bei den anderen Phenyl-Säulen. Die Untersuchungen mit Phenyl Sepharose HP zeigten im Allgemeinen infolge der kleinen Teilchengrößen bei der Trennung des Proteingemischs eine höhere Selektivität sowie schärfere Kurvenverläufe und somit die höhere dynamische Bindungskapazität bei der BSA-Adsorption.

## 5 Zusammenfassung

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit umfassende Untersuchungen mit ausgewählten kosmotropen Salzen mittels Rinderserumalbumin bei Phenyl Sepharose Medien in der hydrophoben Interaktionschromatographie durchgeführt. Hierbei wurden Vorversuche zur Löslichkeit und Selektivität durch Gradientenchromatographie durchgeführt, um festzustellen, ob die verwendeten Proteine mit den ausgesuchten kosmotropen Salzen löslich sind. Der Zweck dieser Analyse war es, die Selektivität der ausgewählten Salze, so wie sie in der Literatur dargestellt ist, zu prüfen. Die Löslichkeit der untersuchten Salze in 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (Elutionspuffer) erfolgte ohne Probleme mit Ausnahme von Lithium- und Kaliumsulfat. Es wurde dabei festgestellt, dass Lithiumsulfat schwer löslich in Phosphatpuffer ist. Daher wurde es schließlich in 0,1 M Tris-HCl-Puffer gelöst. Kaliumsulfat dagegen konnte nur in einer Konzentration von 0,6 M und bei ca. 43°C in 0,1 M Tris-HCl-Puffer gebracht werden. Das Standardproteingemisch setzte sich aus 4 Proteinen zusammen: Cytochrome C, Lysozyme, RNase A und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen. Die Proteine waren in allen eingesetzten HIC-Puffersystemen löslich bis auf RNase A (3 mg/mL). Da sie in 1,5 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat schwer löslich war, musste für die Weiterführung der Analyse die Konzentration von Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1 M herab gesetzt werden. Die Auftrennung des Proteingemischs erfolgte anschließend mit Phenyl Sepharose HP durch eine Gradientenelution. Die Elutionsreihenfolge verlief bei allen Salztypen nach dem nachstehenden Schema:

### **Cytochrome C -> RNase -> Lysozym -> $\alpha$ -Chymotrypsinogen A**

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die kosmotropen Salze tatsächlich in unterschiedlicher Weise die Selektivität und Bindungseigenschaften von Proteinen beeinflussen. Die antichatrophe Wirkung von Kationen stieg aber in umgekehrter Richtung zur von Hofmeister in der Literatur angegebenen Hofmeister-Serie an (von rechts nach links, s. Kapitel 4.3). Dabei erwies sich, dass das Aussalzen von Proteinen im wässrigen Milieu nicht nur durch die Hydratationsfähigkeit des Salzes bestimmt wird, sondern auch durch andere Einflussparametern wie z.B. die Eigenschaften der beteiligten Ionen. Damit stellt sich das grundsätzliche Prinzip der Hofmeister-Serie zur direkten Übertragung auf die HIC in Frage.

Die Untersuchung von kosmotropen Salzen auf die Adsorptionseigenschaften von Rinderserumalbumin an Phenyl-substituierte chromatographische Medien erfolgte durch Frontalchromatographie bei variierten Konzentrationen und Flussraten. Hierbei ließ sich deutlich erkennen, dass Kationen und Anionen einen Einfluss auf die Bindung von BSA an HIC-Adsorbentien ausüben. Salze mit Citrat Ionen (Anionen) banden viel stärker als die mit Sulfat Ionen. Das Zielprotein wies eine etwas höhere Durchbruchzeit bei Citrat Ionen als bei den anderen Ionentypen auf und damit auch eine höhere dynamische Bindungskapazität.

Bezogen auf die Fließmittelgeschwindigkeit konnte herausgestellt werden, dass sie unabhängig von Salztypen auf die Durchbruchkurve den gleichen Einfluss zeigt.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Arakawa T. Und Nahri, L. O. (1991) Solvent Modulation in Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13, 151-172 (1991).
- [2] Hofmeister F. (1887) 11. Zur Lehre von der Wirkung der Salze (Ueber die Regelmäßigkeiten in der eiweissfällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben). *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.*, 24,247-260.
- [3] Hofmeister F. (1888) 12. Zur Lehre von der Wirkung der Salze (Ueber die Wasserentziehende Wirkung der Salze). *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.*, 25, 1-30.
- [4] Janson J-C. and Rydén .L. (1997) Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications. 2nd edition, WILEY-VCH United States of America.
- [5] Jungbauer et al. (2002) Hydrophobic Interaktion chromatography of Proteins I. Comparison of Selectivity. *Journal of Chromatography A*, 972 (2002) 3-19. Elsevier Science B. V.
- [6] Jungbauer et al. (2002) Hydrophobic Interaktion chromatography of Proteins II. Binding capacity, recovery and mass transfer Properties. *Journal of Chromatography B*, 790 (2003) 99-114. Elsevier Science B. V.
- [7] Myers. J. A. And Regnier F. E. (1989) Adsorption Phenomena in Hydrophobic Interaction Chromatography. *Biotechnology Progress* (Vol. 5, No.3).
- [8] Scopes R. K. (1987) Protein purification. Principles and practice. 2nd edition, Springer-Verlag, New York.
- [9] Senczuk A. M. et al. (2009) Hydrophobic interaktion chromatography in Dual Salt System Increases Protein Binding Capacity. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 103, No 5.
- [10] Shiaw-L.W. et al. (1996) Hydrophobic Interaction Chromatography of Proteins. Academic Press. Inc.

## 7 Quellenverzeichnis

Internet <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/49/150px-Phenyl-group.png>.

(1):

Internet <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/65/Ammonium.svg> (links),

(2): <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/67/Cl-.svg> (rechts).

Internet [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5f/Lithiumsulfat.svg/120px-](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5f/Lithiumsulfat.svg/120px-Lithium_sulfate.svg.png)

(3): [Lithium\\_sulfate.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5f/Lithium_sulfate.svg.png).

Internet <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/65/Ammonium.svg> (links),

(4): <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/83/Sulfat-Ion.svg> (rechts).

Internet <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/65/Ammoniumcitrat.png>.

(5):

Internet <http://de.academic.ru/pictures/dewiki/52/42px-Na%2B.svg.png>.

(6):

Internet [http://www.s3-](http://www.s3-chemicals.de/images/product_images/info_images/natriumcitrat_dihydrat_s_original.jpg)

(7): [chemicals.de/images/product\\_images/info\\_images/natriumcitrat\\_dihydrat\\_s\\_original.jpg](http://www.s3-chemicals.de/images/product_images/info_images/natriumcitrat_dihydrat_s_original.jpg).