

HPLC-Chromatographiesäulen - Coreshell- oder sub-2- μ m-Phasen für die LC-MS-Peptidanalytik

Michael Müller, Eckhard Reh

Einleitung

Die Reversed-Phase HPLC-MS nach tryptischem Verdau ist in der Proteinanalytik zweifellos das Verfahren der Wahl. Hierbei ist die HPLC-Trennleistung der gravierende Schwachpunkt, wenn z.B. mehrere tausend Peptide einer biologischen Probe untersucht (shot-gun-Methode) oder Punktmutationen in einem Protein (z.B. Ile-Leu-Austausch) differenziert werden sollen. Seit einigen Jahre propagieren viele Hersteller Säulen mit Partikelgrößen kleiner 2 μ m. Die Verbesserung der Trennleistung geht jedoch einher mit gravierenden, technischen und applikativen Problemen (Druckabfall, Totvolumina, EingangsfILTER), warum insbesondere in einer robusten, validierten LC-MS-Analytik Alternativen gefragt sind.

Hier können Coreshell-Partikel eine Option sein, bei denen auf einem unporösen Kern eine sorptionsaktive, poröse Schicht aufgebracht ist. Durch die reduzierten Diffusionseffekte bieten diese Phasen eine vergleichbare Trennleistung bei größerem Teilchendurchmesser ($d_p \sim 3 \mu$ m) und deutlich reduziertem Druckabfall ($\Delta p < 300$ bar) [1,2]. Da zu Beginn des Jahres ein weiterer, etablierter Hersteller solche Säulen anbietet, erschien eine Bewertung dieser Phasen insbesondere für die 2D-LC-MS-Peptidanalytik angebracht. In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Coreshell-Phasen der bekanntesten Anbieter und eine sub-2- μ m-Phase evaluiert.

Säulen-Charakterisierung

Es wurden folgende Säulen eingesetzt:

Ascentis Express Peptide ES-C18, 2,6 μ m (Supelco); Kinetex XB-C18, 2,6 μ m (Phenomenex) Poroshell 120 SB-C18, 2,6 μ m (Agilent); Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT, 1,8 μ m (Agilent). Es liegen unterschiedliche Porengrößen vor, alle Säulen haben die Dimensionen 100 x 2,1 mm. Die Charakterisierung erfolgte nach Neue [3], bei dem aus der Elution von 7 Komponenten Trennstufenhöhe, Tailing, Silanol-Aktivität, Hydrophobizität, Hydrobe bzw. Hydrophile Selektivität ermittelt werden. Es muss nicht weiter ausgeführt werden, das hierbei größte Anstrengungen unternommen wurden, um Totvolumina zu minimieren.

Chromatographische Kennzahlen

Abbildung 1 vergleicht Trennstufenhöhe und Tailing der 4 Phasen. Die Asymmetrie wurde mittels USP-Tailing aus Amitryptilin bestimmt, die Trennstufenhöhe h wurde vom Naphthalin-Peak aus der Peakbasisbreite (Tangentenmethode) ermittelt (Anhang 3: Gleichungen). Manche Hersteller verwenden die Peakbreite in halber Höhe und erhalten so deutlich kleinere h -Werte, dies entspricht aber nicht der etablierten Vorgehensweise.

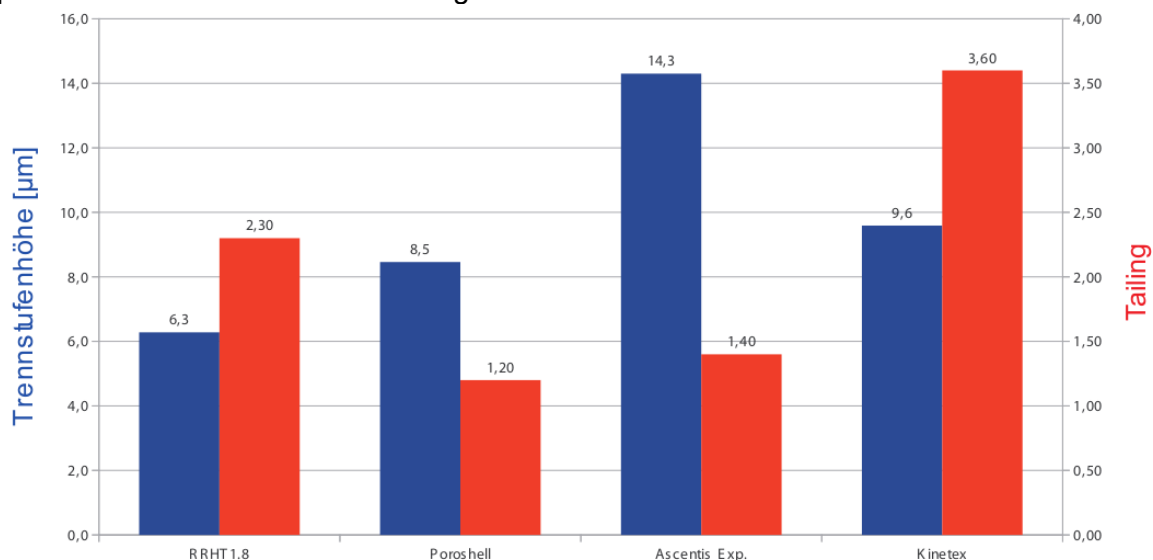


Abb. 1. Vergleich von Trennstufenhöhe und Tailing

Als Näherung für die Trennstufenhöhe gilt: $h \sim 3 d_p + 6/u + 0,05 d_p^2 u$
mit u : lineare Flussgeschwindigkeit [mm/s], d_p : Teilchengröße [μm]
Daraus folgt: $h \sim 7 \mu\text{m}$ bei $d_p = 1,8 \mu\text{m}$ ($u \sim 5 \text{ mm/s}$) bzw. $h \sim 11 \mu\text{m}$ für $d_p = 2,6 \mu\text{m}$ ($u \sim 3 \text{ mm/s}$)
Die ermittelten Resultate entsprechen den Erwartungen, lediglich die Ascentis Express-Säule fällt etwas ab (sie zeigt auch den niedrigsten Druckabfall).
Beim Tailing-Vergleich zeigt die Kinetex-Säule ein etwas ungünstigeres Verhalten.

Abb. 2 fasst die weiteren Neue-Parameter in einem Diagramm zusammen und gibt exemplarisch das Chromatogramm der Kinetex-Säule wieder.

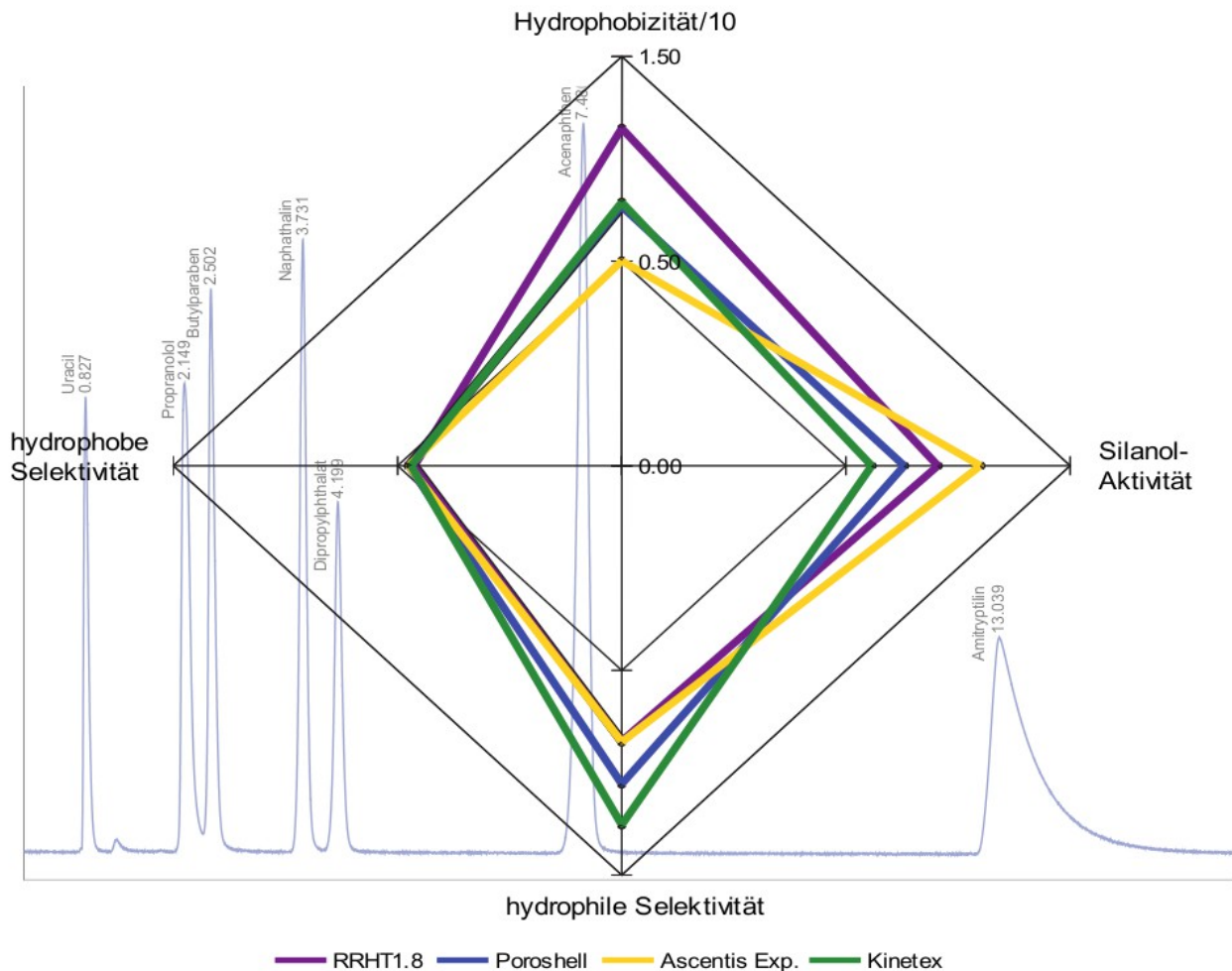


Abb. 2: Vergleich der Neue-Parameter (Mittelwert von je 2 Säulen)

Während die hydrophobe Selektivität bei allen Phasen vergleichbar ist, unterscheiden sich diese in den anderen Parametern deutlich. Hervorzuheben ist, dass Agilent gleiche Bindung der C-Ketten mit vergleichbaren Eigenschaften seiner beiden Phasen propagiert. Die Silanol-Aktivität (verbliebene OH-Gruppen) korreliert nicht mit dem gemessenen Tailing.

Belastungs-Untersuchung

Die Peptid-Elution erfolgt meist mit Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) zum Eluenten. Während früher die Phasen hierbei noch eine deutliche Instabilität durch Hydrolyse der C-Ketten zeigten [4], haben die Hersteller dieses Problem mit den aktuellen Phasen gut gelöst. Alternativ wird heutzutage aber oft ein Zusatz von Ameisensäure (FA) verwendet, da dies in der Electrospray-MS-Kopplung höhere Ionenintensitäten zeigt. Ameisensäure hat einen deutlich aggressiveren Einfluss auf die C-Bindung, daher wurde über die Säulen für 2 Wochen ein Eluent mit 25% aq. CH_3CN + 0,1 % FA bei einem Fluss von 0,25 ml/min im Kreislauf gefördert (Raumtemperatur).

Tabelle 1 gibt die prozentualen Veränderungen von Retention, Trennleistung und Asymmetrie nach Belastung wieder.

	Δt_R [%]	Δt_R [%]	Δh [%]	$\Delta \text{Tailing}$ [%]
	(Naphthalin)	(Amitryptilin)	(Naphthalin)	(Amitryptilin)
Ascentis Exp.	-2,7	-6,3	-1,8	19,2
Kinetex	-2,6	-5,4	1,5	25,1
Poroshell	-2,4	-6,9	3,0	-12,6
RRHT1.8	-1,8	-7,9	-3,1	66,9

Tab. 1: Auswirkung der Belastung mit Ameisensäure-haltigem Eluenten

Bemerkenswert ist, das durch die Belastung die Trennstufenhöhe von RRHT1.8 und Ascentis Express besser wird, auch die Asymmetrie der Poroshell-Phase wird günstiger.

Die deutliche Verringerung der Retention (t_R) von Naphthalin und noch drastischer beim Amitryptilin zeigt eine massive Reduktion des C-Anteils über 2 Wochen.

Dies ist für eine robuste, stabile Proteom-Analytik unzureichend.

Peptid-Elution

Zur Bewertung der Säulen hinsichtlich Peptid-Mapping wurden 25 definierte Peptide mit unterschiedlichen Molmassen, Hydrophobizitäten und Isoelektrischen Punkten (Anhang 1: Peptidliste) zuerst als Einzelsubstanzen in einer Doppelbestimmung im Gradienten eluiert (Anhang 2: Apparative Bedingungen).

Danach wurden Peptidmischungen von 8 - 9 Peptiden getrennt und ausgewertet.

Trennleistung und Selektivität

Aus der Doppelbestimmung folgte eine Verschleppung, wenn die Peakfläche des 2. Laufs größer als beim ersten Chromatogramm war. Die Asymmetrie wurde nach USP-Methode und die Peakbasisbreite nach der Tangentenmethode ermittelt. Die Peakkapazität ([5] Anhang 3) gibt an, wie viele Komponenten im Gradienten getrennt werden könnten. Tabelle 2 listet die Resultate auf.

	Ascentis Exp.	Kinetex	Poroshell	RRHT1.8
Verschleppung (max) [%]	3,3	3,4	9,7	5,7
Asymmetrie (mittel)	1,63	1,42	1,51	1,48
Peakbreite (mittel) [min]	0,124	0,114	0,116	0,113
Peakkapazität	246	270	265	273

Tab. 2. Peptid-Trennleistung der verschiedenen Säulen

Die Verschleppung liegt in der Regel unter 5 % und ist anders als bei Protein-RP-Trennungen unkritisch [6]. Lediglich die Poroshell-Säule fällt hier etwas ab. Die Gesamtfläche aller Peptidpeaks als Maß für die Wiederfindung ist bei allen Säulen nahezu identisch (Werte nicht angegeben). Peakbreite und Peakkapazität zeigen, dass die Coreshell-Säulen gegenüber der 1,8 μ m-Säule nicht signifikant schlechter abschneiden. Der Einsatz von sub-2 μ m-Phasen mit hohem Druckabfall ist daher in der Peptid-Gradientelution nicht zwingend notwendig.

Die Selektivität wird bewertet in Form der chromatographischen Auflösung R für die Trennung zweier Peptide, die sich nur durch Austausch einer Aminosäure unterscheiden. Insbesondere wurde hier der Tausch von Glycin-Alanin (A/G), Isoleucin-Leucin (I/L) und Asparaginsäure-Glutaminsäure (D/E) betrachtet. Die Auflösung der entsprechenden Peptidpaare ist in Abbildung 2 als A/G-, I/L- und D/E-Selektivität dargestellt. Exemplarisch ist hier auch das Chromatogramm einer Peptidmischung mit der Ascentis Express-Säule wiedergegeben.

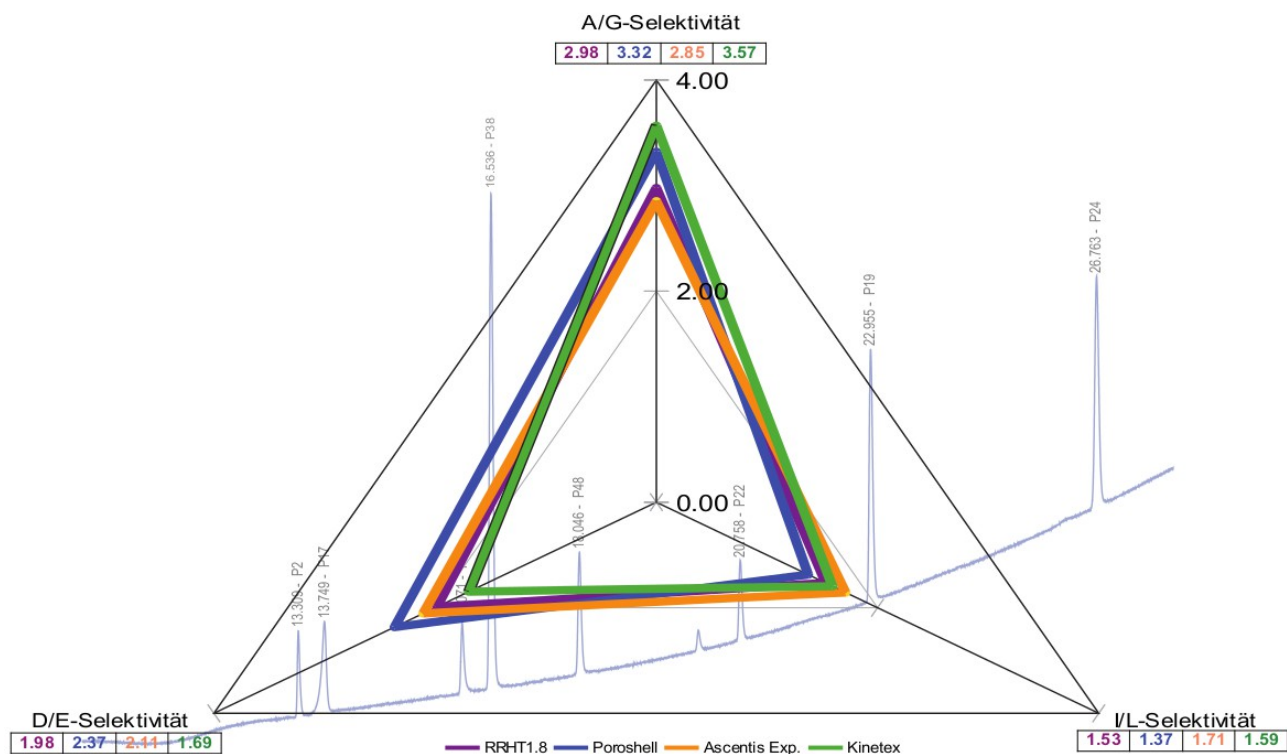


Abb. 3: Peptid-Selektivität der diversen Phasen

Wie erwartet geben die verschiedenen Säulen ein heterogenes Bild, auch die Poroshell- und RRHT1.8-Säule verhalten sich unterschiedlich.

Einfluss von Temperatur und Fluss

Für konventionelle, total poröse Silica-Partikel ist beschrieben, dass die Peptidtrennung bei höherer Temperatur besser wird. Tabelle 3 gibt die Resultate an.

	25 °C	40 °C	60 °C
Asymmetrie (mittel)	1,63	1,30	1,25
Peakbreite (mittel) [min]	0,124	0,114	0,131
Peakkapazität	246	268	234
A/G-Selektivität	2,85	3,66	4,68
D/E-Selektivität	2,11	3,11	3,59
I/L-Selektivität	1,71	1,45	1,50

Tab. 3: Einfluss der Trenntemperatur bei Peptid elution von der Ascentis Express-Säule

Das Tailing wird mit höherer Temperatur kontinuierlich besser, die Peakfläche (gesamt) steigt geringfügig um etwa 1 % (Werte nicht im Detail angegeben).

Die Trennleistung (Peakhöhe, -kapazität) zeigt aber bei 40°C optimale Bedingungen.

Optimale Trennleistung erfordert entsprechend der van Deemter-Gleichung eine optimale Flussgeschwindigkeit. Nach den h/u-Kurven liegt diese bei ~ 5 mm/s für sub-2µm-Phasen und ~ 3 mm/s bei 3 µm-Partikel. Die verwendete Flussrate von 0,25 ml/min entspricht einem linearen Fluss von 2 mm/s und ist nicht optimal.

Im Hinblick auf eine Electrospray-MS-Kopplung werden aber geringe Flussraten favorisiert, da hier die Ionenausbeute gravierend zunimmt, manifestiert in der weit verbreiteten Nanobore-HPLC der Proteom-Analyse. Nach eigenen MS-Untersuchungen mit den 25 Peptiden steigt die MS-Peakhöhe (basepeak-chromatogram) bei Reduktion von 0,5 auf 0,1 ml/min um den Faktor 6 (Ergebnisse nicht wiedergegeben).

Es war daher von Interesse, verschiedene Flussraten bei den Coreshell-Säulen zu testen, Tabelle 4 stellt die Ergebnisse zusammen.

	0,1 ml/min	0,25 ml/min	0,5 ml/min
Asymmetrie (mittel)	1,69	1,51	1,37
Peakbreite (mittel) [min]	0,180	0,116	0,096
Peakkapazität	167	265	321
A/G-Selektivität	2,08	3,32	1,35
D/E-Selektivität	2,00	2,37	2,32
I/L-Selektivität	0,57	1,37	0,09

Tab. 4: Einfluss der Flussrate bei Peptidelution von der Poroshell-Säule

Wie erwartet verbessert sich Asymmetrie und Trennleistung (Peakbreite,- kapazität) mit der Flussgeschwindigkeit, die Peakkapazität ist bei 0,1 halbiert gegenüber 0,5 ml/min.

Die Peptid-Selektivitäten sind aber bei 0,25 ml/min optimal.

Hier ist je nach Applikation ein Kompromiss gefragt, welcher auch durch die eingesetzte HPLC-Anlage bedingt wird.

In diesem Fall wurden alle Untersuchungen mit einer Agilent 1100-HPLC durchgeführt.

(Für 0,1 ml/min wurde Mischkapillare und Druckmesseinheit in den Kanal A integriert und die statische Mischkammer wesentlich verkleinert. Für Drücke über 300 bar wurde die Druckausgabe mit Hilfe eines Upgrade-Kit (Fischer Analytics, Bingen) heruntergeregel, so daß ein Druckabfall bis 600 bar faktisch möglich wird.)

Zusammenfassung

Im Vergleich zu einer total porösen sub-2µm-Phase ist bei isokratischen Trennungen die Trennleistung von guten Coreshell-Säulen wie erwartet geringer, bei der Gradientelution von Peptiden können aber keine Unterschiede mehr festgestellt werden.

Der Einsatz von sub-2µm-Phasen mit den bekannten technischen Schwierigkeiten ist beim Peptid-Map nicht zwingend nötig, so dass mit konventionellen HPLC-Systemen entsprechende Trennungen erreicht werden.

Eine Elutionstemperatur von 40°C ist optimal, Ameisensäure im Eluenten sollte nicht verwendet werden, da alle Phasen damit instabil sind. Im Hinblick auf eine MS-Kopplung bietet eine Flussrate von 0,1 ml/min beste Signalhöhen aber deutlich reduzierte Trennleistung. Hier wäre eine 1mm-Säule für die Peptidtrennung ideal, die aber z.Zt. von keinem Hersteller angeboten wird.

Danksagung

Wir danken den involvierten Firmen für Ihre Unterstützung und die angeregte, teilweise lebhaft Diskussion.

Literatur

- [1] F. Gritti, N. Tanaka, G. Guiochon; Comparison of the fast gradient performance of new prototype silica monolithic columns and columns packed with fully porous and core-shell particles; J. Chromatography A, 1236, 28-41 (2012)
- [2] N. Marchetti, G. Guiochon; High peak capacity separations of peptides in reversed-phase gradient elution liquid chromatography on columns packed with porous shell particles; J. Chromatography A, 1176, 1-2, 206-216 (2007)
- [3] U. D. Neue; Classification of reversed-phase packings, J. Chromatogr. A, 849, 101-116 (1999)
- [4] E. Reh, U. Kapfer; Evaluation of new Stationary Phases for RP-Separation of Peptides, Chromatographia, 30, 663-674, (1990)
- [5] U.D. Neue, Theory of peak capacity in gradient elution, J. Chromatogr. A, 1079, 153-161 (2005)
- [6] E. Reh, B. Hahn, S. Lamotte; Evaluation of stationary phases for 2D-HPLC of Proteins, 1. Validation of commercial RP columns; J. Chromatogr. B, 844/2 204-212 (2006)

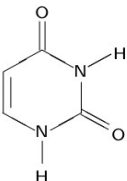
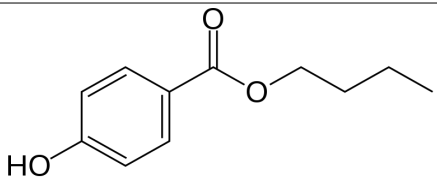
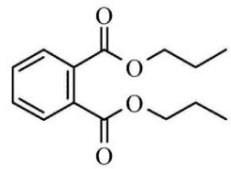
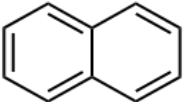
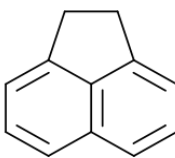
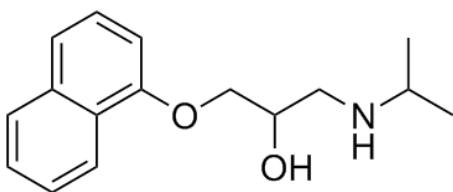
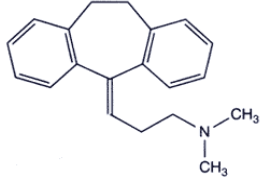
Kontakt

Michael Müller, Dipl. Ing (FH), Fachhochschule Bingen, Zentrum ProteinAnalyse, Bingen, muellermicha@fh-bingen.de

Anhang

1 Analyte

1.1 Neue-Test

Verbindung	Strukturformel	Kriterium
1. Uracil (10µg/ml)		Totzeit t_0
2. Butylparaben (20µg/ml)		Polare Selektivität
3. Dipropylphthalat (20µg/ml)		Polare Selektivität
4. Naphthalin (5µg/ml)		Hydrophobe Selektivität
5. Acenaphthen (10µg/ml)		Hydrophobizität
6. Propranolol (10µg/ml)		Silanol Aktivität
7. Amitriptylin (20µg/ml)		Silanol Aktivität

1.2 Peptide für Peptid-Map

Nr	Sequenz
1	H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH
2	H-Val-Gln-Gly-Glu-Glu-Ser-Asn-Asp-Lys-OH
3	H-Ala-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe-OH
4	H-Glu-Glu-Lys-Leu-Ile-Val-Val-Ala-Phe-OH
5	H-His-Asp-Met-Asn-Lys-Val-Leu-Asp-Leu-OH
8	H-Ala-Gly-Ser-Glu
11	H-Leu-Leu-Phe-Gly-Tyr-Pro-Val-Tyr-Val-OH
13	H-Met-Gln-Met-Asn-Lys-Val-Leu-Asp-Ser-OH
15	H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-OH
16	H-Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro-OH
17	H-Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro-OH
18	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Leu-His-Pro-Phe-OH
19	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH
20	H-Met-Gln-Met-Lys-Lys-Val-Leu-Asp-Ser-OH
22	H-Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-OH
24	H-Phe-Leu-Trp-Gly-Pro-Arg-Ala-Leu-Val-OH
25	H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH
26	H-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg-OH
28	H-Asn-Pro-Glu-Tyr(PO ₃ H ₂)-OH
31	RPDFCLEPPYTGPCCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA (Aprotinin)
38	Gly-Trp-Gly-Gly
43	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
47	H-Tyr(PO ₃ H ₂)-Val-Asn-Val-OH
48	Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg
51	H-Asp-Ala-Asp-Glu-Tyr(PO ₃ H ₂)-Leu-NH ₂

Konzentration: je 100µg/ml

2. Apparative Bedingungen

2.1 Säulen

Hersteller	Säule	Dimension [mm]	Partikelgröße [µm]	Porengröße [Å]	End-capping
Agilent	Poroshell 120 SB-C18	100 x 2,1	2,7	120	nein
Agilent	Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HT	100 x 2,1	1,8	80	nein
Phenomenex	Kinetex 2.6u XB-C18 100A	100 x 2,1	2,6	100	ja
Supelco	Ascentis Express Peptide ES-C18	100 x 2,1	2,7	160	nein

2.2 Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller	Modell/Version
HPLC	Agilent	1100 Series mit DAD
ChemStation	Agilent	Rev. B.04.02 SP1
MS	Bruker	microTOF
Hystar	Bruker	3.1

2.3 Messbedingungen

	Neue-Test	Peptid-Elution
Eluent	CH ₃ OH / 20mM Phosphat-Puffer pH 6,88; 65/35 (v/v)	A: H ₂ O + 0,1% TFA; B: CH ₃ CN + 0,1% TFA
Fluss	0,35 ml/min	0,25 ml/min *
Temperatur	40 °C	25 °C *
Detektor	DAD, 8µl Flusszelle, 210 nm	DAD, 8µl Flusszelle, 210 nm
Probenkonzentration	s. Neue-Test	100 µg/ml
Injektionsvolumen	1 µl	1 µl

*soweit nicht anders angegeben

Zeit [min]	B [%]
0,0	0,0
5,0	0,0
35,0	60,0
40,0	60,0
40,5	0,0
50,0	0,0

Gradient:

Anschlüsse:

Nadelsitz-Kapillare (0,005" ID); Verbindung Probengeber - Säule (0,005" ID, 30cm Kapillare) ohne Einbindung Thermostat-Heizblock; Verbindung Säule - Detektor direkt mit Kapillare der Semimikrozelle.

3 Gleichungen

3.1 Allgemein

Trennstufenhöhe: $h = \frac{L}{16} * \left(\frac{w}{t_R}\right)^2$

Peakkapazität: $1 + \frac{\text{Gradientendauer}}{\text{mittlere Peakbreite}}$

Asymmetrie (T_{USP}): $\frac{w_{0,05}}{2w_{0,05}^l}$ (Mittelwert aus $1 + \text{Absolutwert}(1 - T_{\text{USP}})$)

mit k : Kapazitätsverhältnis, α : relative Retention; L : Säulenlänge; w : Peakbasisbreite (tangential); $w_{0,05}$: Peakbreite in 5% Höhe, $w_{0,05}^l$: Peakbreite links vom Lot in 5% Höhe

3.2 Berechnungen nach Neue

Hydrophobizität: $k_{\text{Acenaphthen}}$

hydrophobe Selektivität: $\alpha_{\text{Naphthalin/Acenaphthen}}$

hydrophile Selektivität: $\alpha_{\text{Butylparaben/Propranolol}}$

Silanol Aktivität: $\ln(\alpha_{\text{Amitryptilin/Acenaphthen}})$