

Systematisches Screening kommerziell erhältlichen HILIC-Säulen

Gantenbein, Marco

Bachelor-Thesis, Molecular Life Sciences, Chemie

Auftraggeber: Dr. Mair, Peter, DSM Nutritional Products Ltd
Expert/in: Dr. Ehrat, Markus, EK Biosciences GmbH
Begleitdozent/in: Prof. Dr. Schlotterbeck, Götz, FHNW

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten vier verschiedener Substanzklassen auf fünf HILIC- und einer RP-Säule zu studieren. Die getesteten Substanzklassen umfassen: Metaboliten der Vitamin C Biosynthese, ausgewählte B-Vitamine, Nukleotidphosphate und kleine organische Säuren. Als HILIC Säulen dienten in dieser Arbeit eine BEH-Amid, Diol, Synchronis, ZIC-cHILIC und ZIC-HILIC Säule. Als RP-Säule, welche den Vergleich mit der HILIC Chromatografie ermöglichen sollte, wurde eine Atlantis T3 Säule verwendet. Zur Charakterisierung des Verhaltens der Substanzen wurde der Retentionsfaktor, die Auflösung, sowie die Peaksymmetrie bei zwei verschiedenen pH-Werten betrachtet. Diese berechneten Charakteristiken für jede Substanz auf der entsprechenden Säule wurden anschliessend in einer geeigneten Form für jede Substanzklasse und pH-Wert zur besseren Veranschaulichung der Unterschiede grafisch dargestellt. Aus den Resultaten ergab sich, dass die ZIC-cHILIC Säule die beste Trennleistung und Peaksymmetrie über alle getesteten Säulen und Substanzklassen erbringen konnte. Die RP-Säule konnte in keiner Substanzklasse bessere Resultate erzielen als eine HILIC Säule.

EINLEITUNG

Die DSM Nutritional Products Ltd. entwickelt Zutaten für die menschliche Ernährung, Tierernährung und Körperpflegeprodukte. Zunehmend müssen stark polare Analyte aus Metabolismusuntersuchungen von Wirkstoffen oder sogenannten Lebensmittelzusatzstoffen, sowie aus Proben der Prozessentwicklung durch LC/MS charakterisiert werden. Diese Analyte können allerdings oft nur unzureichend auf RP-Phasen mit rein wässrigen Eluenten aufgetrennt werden. Hydrophile Interaktionschromatografie (HILIC) ist darum die Methode der Wahl für solche stark polaren Analyten. Die HILIC kann als Kombination aus der stationären Phase der NP und der mobilen Phase der RP, welche einen Anteil an organischem Lösungsmittel von über 50 % aufweist, angesehen werden [1]. Durch die Verwendung von Eluenten, die reich an organischen Lösungsmitteln sind, wird die Ionisation im ESI-MS gegenüber entsprechenden RP Methoden erheblich verbessert. Das Ziel dieser Arbeit ist nun, die vier Substanzklassen auf den verschiedenen HILIC Systemen zu testen und das geeignetste System zu eruieren. Die Detektion soll dabei mittels LTQ/Orbitrap von statten gehen, welche eine hochauflösende Art der LC-MS darstellt. Dieses Gerät wird unter anderem auch häufig in diversen Metabolismusuntersuchungen verwendet.

RESULTATE

Im Folgenden wird nun genauer auf die Substanzklasse der kleinen organischen Säuren eingegangen. Damit eine Aussage über die Trennleistung gemacht werden kann, muss dazu die Auflösung betrachtet werden. Als untereinander aufgelöst gilt ein Peakpaar, wenn es eine Auflösung von mind. 1.4 erbracht hat. In der Abb. 1 und 2 sind die Anzahl aufgelöster Peakpaare pro Substanz in einem Netzdiagramm dargestellt, wobei zu beachten ist, dass für eine Substanz, die auf einer Säule nicht eluierte, die Auflösung auf Null gesetzt wurde. Die ZIC-cHILIC Säule weist dabei bei pH 5.8 das äusserste Polygon auf und erbrachte somit die beste Trennleistung. Im Gegensatz dazu fällt das Polygon für die Atlantis T3 bei

pH 5.8 auf die Mitte ein, was für eine schlechte Auflösung spricht, welche auf die geringe Retention der Moleküle auf der Säule zurückzuführen ist. Bei einem pH-Wert von 3.0 ergibt sich für die RP Säule ein besseres Bild. Ein weiterer Aspekt der betrachtet werden muss, ist die Peaksymmetrie, welche Aufschluss über die Peakform gibt. Obwohl die Auflösung der ZIC-cHILIC und ZIC-HILIC relativ ähnlich sind unterscheiden sie sich doch erheblich in der Peaksymmetrie, welche in Abb. 3 als logarithmierte Peaksymmetrie gemessen bei pH 5.8 dargestellt ist. Wobei ein Wert von unter -0.097 Fronting anzeigt und einer über 0.176 Tailing wiedergibt [2]. Für die beiden Substanzen MG-4009 und MG-4010 ist zu beachten, dass nur für die dargestellten Balken Werte ermittelt werden konnten. Die ZIC-cHILIC konnte die beste Peakform über die betrachteten Substanzen wiedergeben und die Synchronis Säule, die schlechteste.

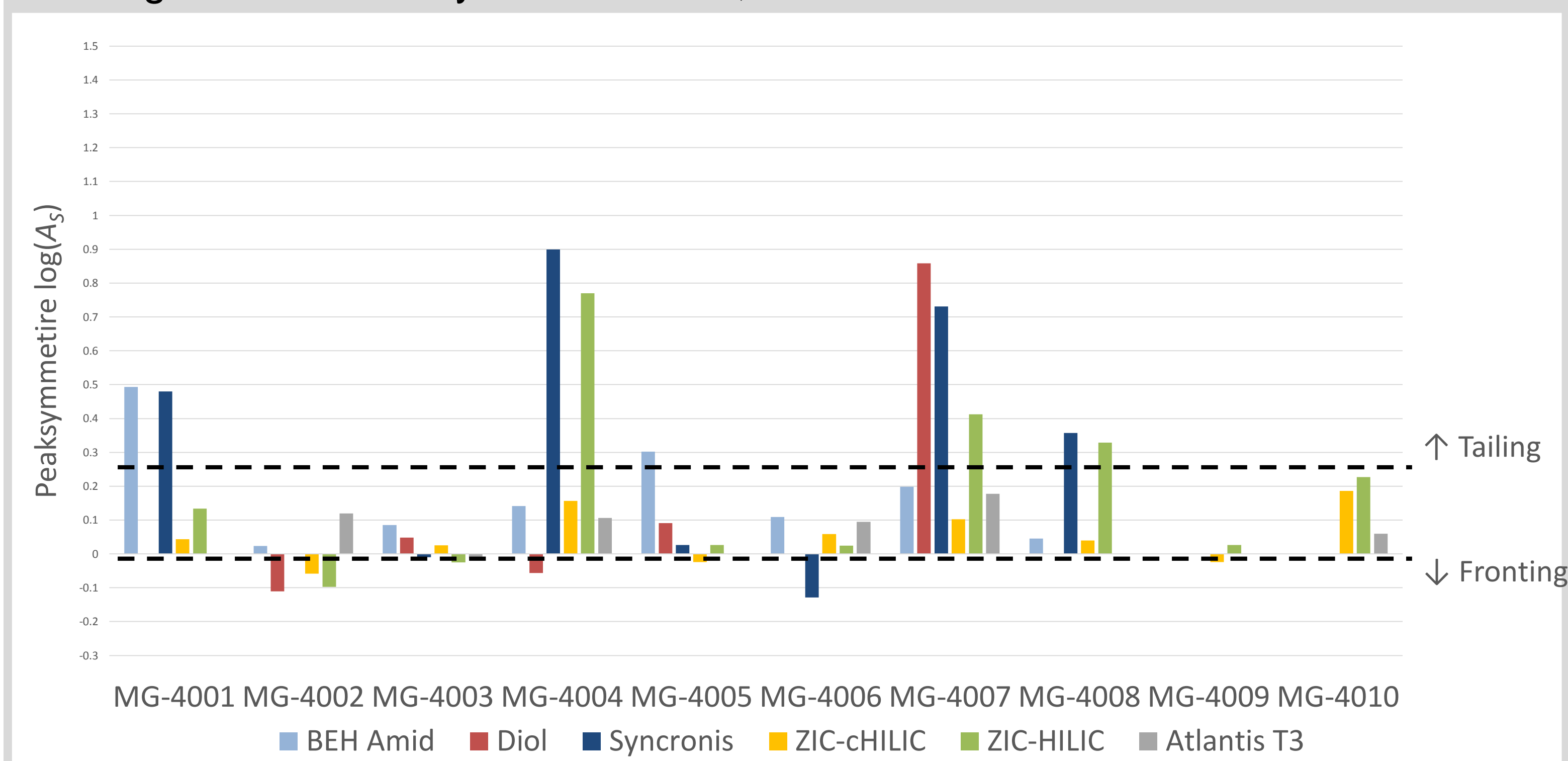


Abb. 3: Logarithmus der Peaksymmetrie bei pH 5.8

Legende für die Substanzabkürzungen:

MG-4001 3-Hydroxypropansäure	MG-4006 Bernsteinsäure
MG-4002 3-Nitrooxypropansäure	MG-4007 Malonsäure
MG-4003 α -Ketoglutaransäure	MG-4008 Milchsäure
MG-4004 Äpfelsäure	MG-4009 Oxalessigsäure
MG-4005 Brenztraubensäure	MG-4010 Zitronensäure

SCHLUSSFOLGERUNG

Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass die HILIC Chromatografie besonders bei kleinen polaren Substanzen gegenüber der RP Chromatografie vorzuziehen ist. Ein pH-Wert von 5.8 ist grundsätzlich einem pH-Wert von 3.0 vorzuziehen, wie dies auch nach der Literatur bei A. Periat, et. al [3] bestätigt wird. Die Detektion im MS erwies sich für die Substanzen in dem gewählten Polaritätsmodus als unproblematisch und kann somit zukünftig für diese Substanzklassen verwendet werden. Falls aber in einer Probe nur Phosphate gemessen werden sollten, könnte man diese anstatt im positiven Modus auch im negativen messen.

Wie aus dieser Arbeit hervorging, erwies sich die ZIC-cHILIC Säule als echte Allrounder Säule. Sie konnte in allen Substanzklassen die beste Trennung erbringen und auch die Peakform liegt bei den meisten Substanzen innerhalb der Spezifikationsbereichs. Weiter erwies sich die Säule anhand der Wiederholbarkeit der Retentionszeiten als wahrscheinlich die robusteste Säule von allen.

Im Vergleich zu den HILIC Säulen erbrachte die Atlantis T3 Säulen gerade bei kleinen polaren Substanzen keinen Erfolg. Dies ist besonders bei den Substanzklassen „Metaboliten der Vitamin C Biosynthese“ und „kleine organische Säuren“ der Fall. Eine gute Grundlage für eine weitere Methodenoptimierung lieferte sie in der Substanzklasse „Nukleotidphosphate“ bei pH 5.8, da sie die beste Peaksymmetrie und einen hohen Probendurchsatz lieferte.

REFERENZEN

- [1] P. Jandera, Anal. Chim. Acta, 692 (2011) 1–25.
- [2] Europäische Pharmakopöe 7.0 inklusive Supplement 7.1 und 7.2, The Stationery Office/Tso, 2010.
- [3] A. Periat, et. al, J. Chromatogr. A, 1282 (2013) 72–83.

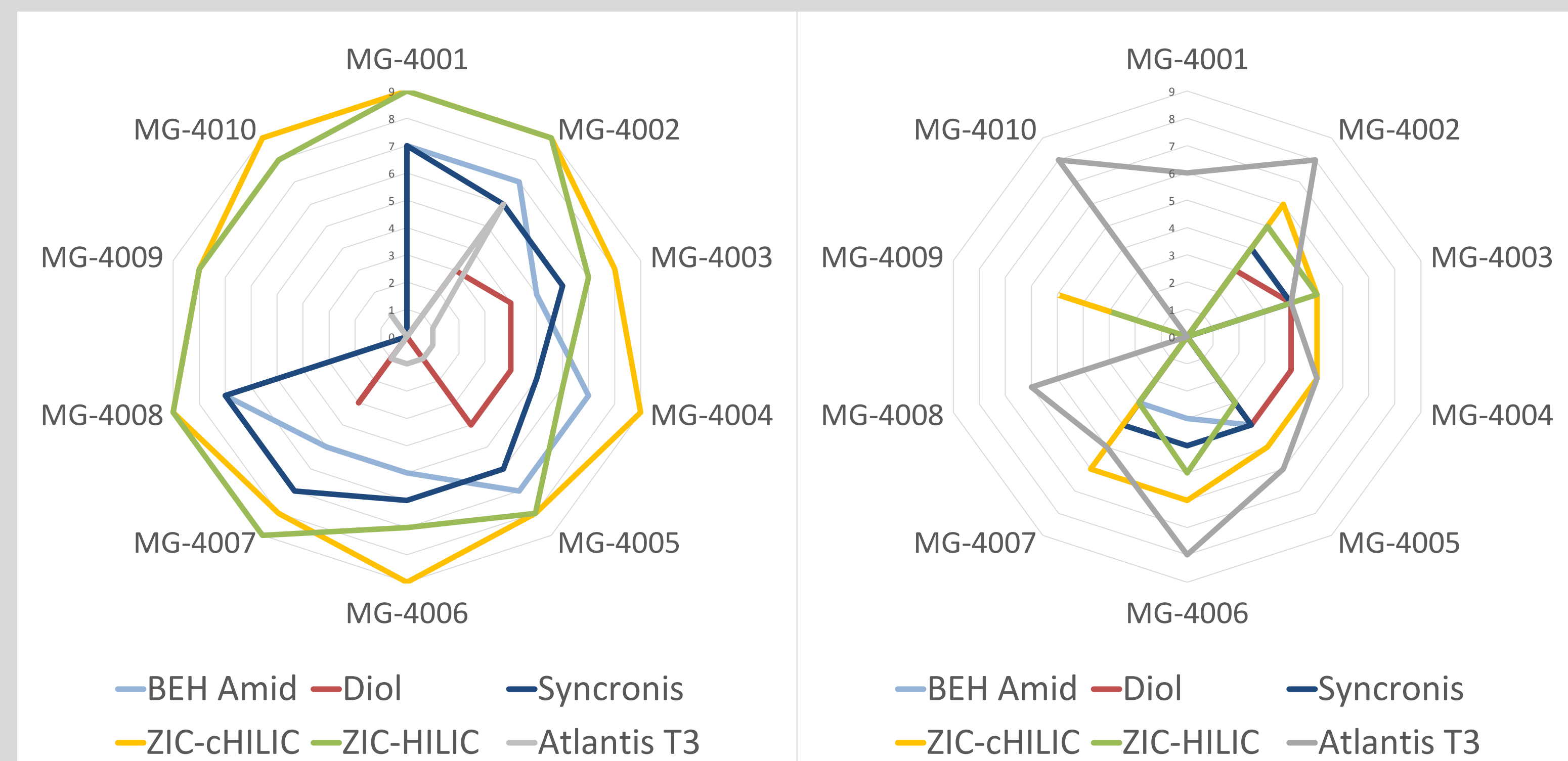


Abb. 1 und 2: Auflösung als Anzahl getrennter Peakpaare für pH 5.8 und 3.0