

Neue Möglichkeiten in der Proteomforschung?

Dr. Christian Dauwe, Dr. Günter Reinhold, Mainz

In der Proteomforschung sind GPC-Untersuchungen von Proteinen ein wichtiger Baustein. Diese GPC-Untersuchungen werden in gepufferten wässrigen Eluenten wie auch in wässrig-organischen (verdampfbar) Eluentenmischungen durchgeführt. Hier präsentieren wir Neuentwicklungen von Protein-GPC-Trennungen in vollständig verdampfbar wässrig-organischen Eluenten. Vorteile liegen in der Gewinnung umfangreicher struktureller Daten in einer einzigen Untersuchung. Die Peakposition im GPC-Eluogramm beschreibt die molekulare Größe des Proteins im Eluenten, die vollständige Verdampfbarkeit des Eluenten erlaubt die Kopplung der GPC-Untersuchung mit modernen massenspektroskopischen Methoden. Somit können den Protein-GPC-Peaks, aus denen man die molekulare Größe gewinnt (Tertiärstruktur), ebenfalls die genauen Molmassen oder sogar die Identität bzw. Primärstruktur zugeordnet werden. Diese neue Analysenmethode erschließt somit umfangreiche neue Einsatzfelder, insbesondere für die Proteomforschung.



Die Proteomforschung bzw. die Proteomics sind das derzeit wahrscheinlich aktuellste Gebiet in der Biopolymerforschung. Seit Abschluss des Genomprojektes sind zahlreiche Arbeitsgruppen weltweit in diesem komplexen Forschungsgebiet tätig. Innerhalb der Proteomforschung kommt der Untergruppe Proteinanalytik eine bedeutende Rolle zu. Durch die Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Proteinen in unterschiedlichsten Umgebungen erhoffen sich die Wissenschaftler ein umfassendes Verständnis biologischer Prozesse. Langfristig sollen hierdurch

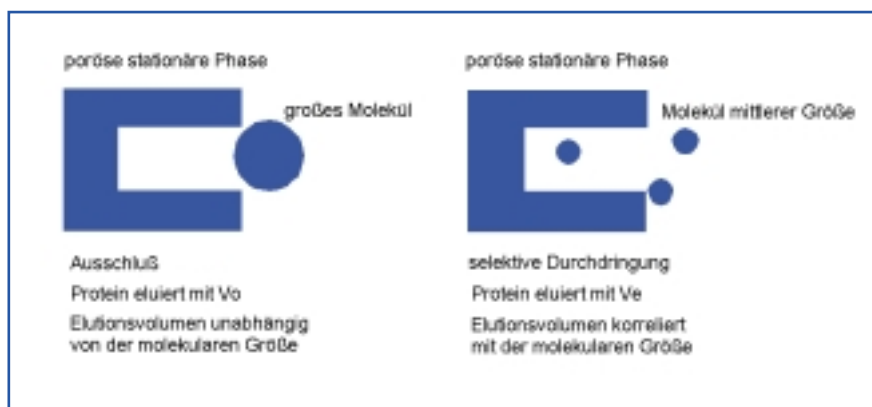


Abb. 1: Schematische Darstellung der Größenausschlusschromatographie (GPC) am Beispiel dreier unterschiedlich großer Proteine

systematisch und rationell Beiträge zur Vorhersagbarkeit von Krankheiten (Diagnose) und auch neue hochwertige Anwendungsfelder in den Biowissenschaften erschlossen werden.

Schon heute werden unterschiedlichste Proteine in wirtschaftlich bedeutenden Feldern eingesetzt. Etabliert haben sich Proteine insbesondere als Biokatalysator in den zahlreichen biotechnologischen Bereichen, z. B. in Lebensmitteltechnik, Pharmazie, Diagnostika und selbst als Waschmittelenzym.

Dank der neusten Methodenentwicklungen für Proteinuntersuchungen (GPC-Analysen, molmassensensitiven Detektoren, Möglichkeiten zur Größenbestimmung von Proteinen in wässrigen Lösungen, Massenspektroskopie ...) können jetzt Proteine vollständig in unterschiedlichsten Umgebungen untersucht werden.

Einzel Schritte der Proteinanalytik

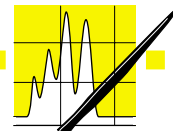
Die Probenvorbereitung gehört zum wichtigsten Basiselement für die reproduzierbare Untersuchung von Proteinen. Es geht um die Gewinnung von Proteinfractionen mit vergleichbaren chemischen Eigenschaften, insbeson-

dere Lösungseigenschaften (1a, 1b). Die gewonnenen Proteinfractionen sollen das zu untersuchende Protein enthalten. Die anschließende GPC (2) analysiert bzw. trennt die Proteinfraction/Proteinmischung nach den molekularen Größen der Einzelkomponenten. Schon der Vergleich der Position einer aufgetrennten Komponente mit einer Reihe von GPC-Kalibrationsstandards beziehungsweise mit der GPC-Kalibrationskurve (z. B. PSS-Pullulane oder PSS-Polyethylenglycole) erlaubt eine verlässliche Abschätzung der molekularen Größe des einzelnen Proteins.

Es ist darauf zu achten, dass die verwendeten Materialien und Prozesse – ab der Probenvorbereitung – biokompatibel sind, d. h., dass das Protein in seiner Funktionalität die ursprünglichen Eigenschaften, z. B. katalytische Aktivität, beibehält.

Aufeinander aufbauende Schritte in der Proteinanalytik

- 1a) Trennung/Fraktionierung nach Löslichkeit
 - Fällung des Proteins, z. B. aus wässriger Lösung mit Ammoniumsulfat oder mit Alkohol



1b) Chromatographische Trennung nach chemischen Eigenschaften

- Hydrophobe-Wechselwirkungs-Chromatographie (HIC)
- Reversed Phase Chromatographie (RP)
- Ionenaustauschchromatographie (IC)

2) Chromatographische Analyse nach Größe bzw. Tertiärstruktur

- Größenausschlusschromatographie (GPC bzw. SEC)

■ Struktur, Löslichkeit und Auftrennung von Proteinen

Die Fülle chromatographischer Trennungsmechanismen von Proteinen liegt in den komplexen Eigenschaften dieser Moleküle begründet. Bei Proteinen handelt es sich um polykondensierte Aminosäuren. Die Molmassen reichen von wenigen 1 000 D bis zu mehreren 1 000 000 D. Die Seitengruppen der Aminosäureeinheiten sind aliphatisch lipophil, aromatisch lipophil, phenolisch, carboxylisch oder basisch.

Durch Einstellung des Eluenten lassen sich unterschiedliche Effekte erzielen:

- organische Zusätze zum wässrigen Eluenten, auch Modifier genannt, erhöhen die Löslichkeit der lipophilen Komponenten und somit des gesamten Proteins.
- Zusatz von 0,1–0,5 % Trifluoressigsäure (TFA) zum Eluenten führt zur Gewinnung einer besser wasserlöslichen Polykationenstruktur (Carbonsäuren liegen in ihrer protonierten-ungeladenen Form vor, basische Gruppen erscheinen als hydrophile, gut wasserlösliche Kationen), lipophile Bestandteile der Proteine bleiben schlecht löslich, sodass dennoch nur einige Proteine gut gelöst werden.
- Verwendung einer Mischung von Wasser, organischen Modifiern, und Trifluoressigsäure als Lösungsmittel bzw. Eluent führt zur Bildung der wasserlöslichen Polykationenstruktur des Proteins, wobei auch die lipophilen Bestandteile gut gelöst werden. Bewährt hat sich insbesondere die Mischung von 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v. Dieser

Eluent weist sehr gute Löseeigenschaften für zahlreiche Proteine auf und eignet sich zudem gut als Eluent für GPC-Trennungen an PSS-Novema-Säulen.

- Eine hohe Ionenstärke bzw. ein hoher Salzgehalt (z. B. 0,1 oder 0,2 M NaCl) im Eluenten verringern ionische Wechselwirkungen vom Protein mit seiner Umgebung, sodass hiermit häufig eine gute Löslichkeit und ein guter chromatographischer Lauf erreicht werden.
- Ohne zusätzliche Ionenstärke bzw. ohne Zusatz von Salzen zum Eluenten sowie ohne Zusatz von organischen Modifiern und Säuren oder Puffern (Protein in destilliertem Wasser) überwiegen die ionischen und die hydrophoben Wechselwirkungen, sodass hier meist Proteinunlöslichkeit vorliegt.
- Eine sehr hohe Ionenstärke bzw. ein sehr hoher Salzgehalt (z. B. 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) im Eluenten führen häufig zum Aussalzen und zum Unlöslichwerden des Proteins.

Die zuvor aufgelisteten Parameter werden zur Steuerung der chromatographischen Trennung von Proteinen verwendet.

Im hier vorliegenden Artikel werden wir auf die Trennung von Proteinen nach deren molekularer Größe eingehen. Hierfür müssen die zu untersuchenden Proteine im chromatographischen Eluenten gut löslich sein. Die Wechselwirkungen vom Protein mit der stationären Phase werden durch entsprechende zuvor beschriebene Eluenteinstellungen verhindert [1, 2, 3, 4].

Wir verwenden hier ausschließlich den Eluenten 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v. Dieser ist vollständig verdampfbar und eignet sich deshalb bestens für die Kopplung der GPC mit der Massenspektrometrie.

■ GPC-Trennungen von Proteinen

GPC-Trennungen von Proteinen gelingen mit Proteinfraktionen, die im GPC-Eluenten bzw. GPC-Laufmittel gut löslich sind. Diese Trennungen erfolgen streng nach molekularer Größe, sofern Wechselwirkungen mit der stationären Phase ausgeschlossen werden (Abb. 1). Die molekulare Größe der

Proteine korreliert zwar mit deren Molmasse, diese Übereinstimmung ist aber aufgrund des komplexen und inhomogenen Charakters der Proteine weniger ausgeprägt als bei unverzweigten Polysacchariden oder bei technischen Polymeren. Zudem lässt sich die molekulare Größe bzw. die Tertiärstruktur von Proteinen durch die Wahl des Lösungsmittels stark beeinflussen. Daraus folgen für unterschiedliche Lösungsmittel/Eluenten auch unterschiedliche Größenausschlusschromatographische (GPC) Ergebnisse [5].

■ Stand der Technik bei GPC-Materialien

Für GPC-Proteintrennungen haben sich Polysaccharidphasen, Polymerphasen und hydrophil modifizierte Silicaphasen etabliert. Polysaccharidphasen weisen häufig eine geringe Druckstabilität auf. Dies bedingt teilweise geringe Lebensdauern der Säulen. Die benötigten geringen Flussraten (wegen der geringen Druckstabilität) bedingen häufig lange Analysenzeiten. Dafür zeigen diese Polysaccharidgele häufig sehr hohe chromatographische Auflösungen und eine extrem hohe Hydrophilie. Bei einigen etablierten Polymer- und Silicaphasen treten aufgrund geringer Druckstabilität ebenfalls häufig verkürzte Lebensdauern der GPC-Säulen auf. Hydrophil modifizierte Silicaphasen können bei hohen pH-Werten durch Silica-Abbau verändert werden.

Die Auswahl des geeigneten Eluenten für Protein-GPC-Analysen ist häufig schwierig. Es gilt, Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Säulenoberfläche auszuschalten. Etabliert haben sich folgende Eluente: Puffermischungen (pH 5–8) mit 0,1 oder 0,2 M NaCl, Puffermischungen mit SDS sowie Wasser mit unterschiedlich hohen Anteilen organischer Eluente (Acetonitril, Methanol, Isopropanol).

Aufgrund der Empfindlichkeit zahlreicher GPC-Säulenmaterialien und

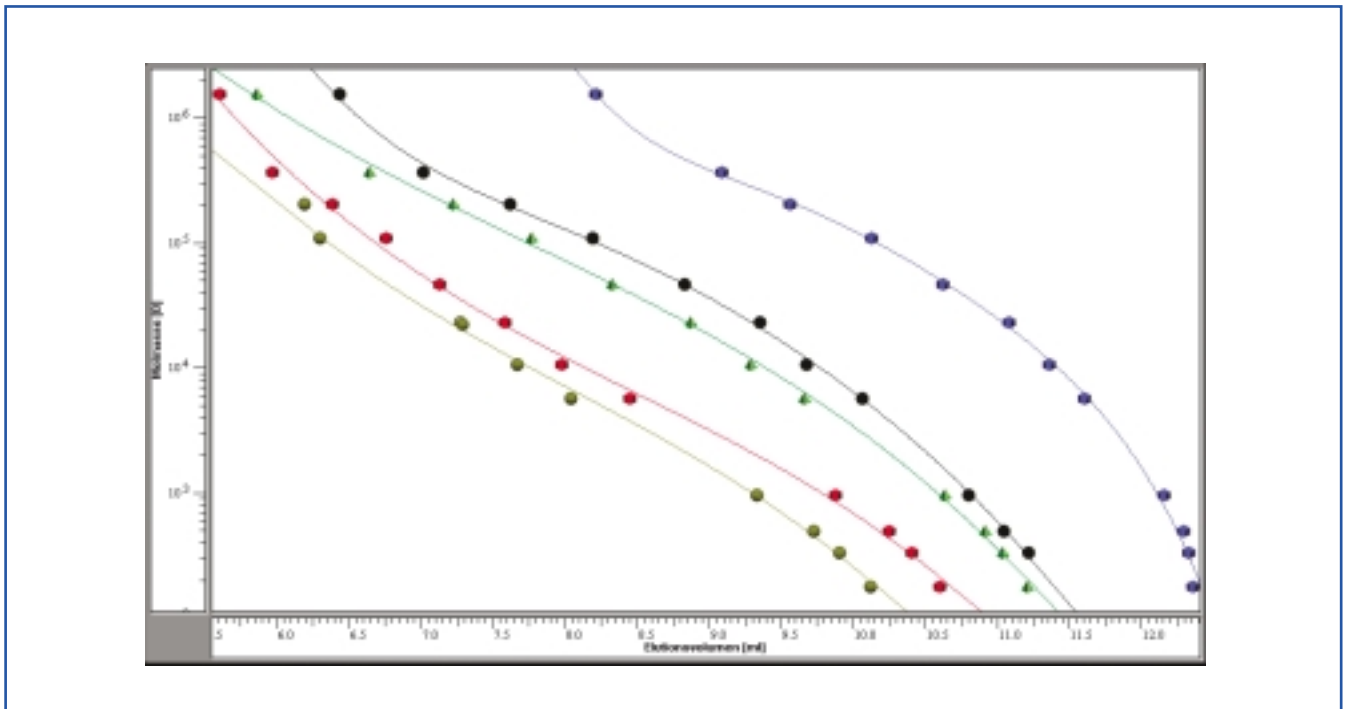


Abb. 2: Kalibrationskurven von Pullulanen (180–1 600 000 D), gemessen auf PSS-Novema-Säulen (8 x 300 mm)
 Eluent: 0,05 % Na₂S₂O₅ in Wasser, Probenkonzentration: 5 mg/ml Eluent, Injektionsvolumen: 20 µl, Fluss = 1,0 ml/min, Detektion: RI, Porositäten: 30 Å, 300 Å, 1 000 Å, 3 000 Å, 10 000 Å (aufgezählt von der unteren zur oberen Kalibrationskurve)

wegen der sehr unterschiedlichen chemischen und Lösungseigenschaften von Proteinen kann hier die Methodenentwicklung der GPC-Trennungen sehr komplex verlaufen.

Ziel unserer Untersuchung war die Entwicklung eines einfach handhabbaren und zudem robusten GPC-Materials für Proteinuntersuchungen sowie die Bereitstellung einer einfach, universell und robust handhabbaren Trennmethode.

Die Entwicklungsziele in Stichworten:

- einfache und universelle Methodenentwicklung für Proteinanalysen
- Verwendbarkeit vollständig verdampfbarer Eluenten zur Ermöglichung z. B. einer Massenspektroskopiekopplung
- hohe Druckstabilität (> 80 bar)
- geringer Säulengegendruck durch monodisperse Gelpartikel
- geringer bzw. nicht beobachtbarer Scherabbau großer Proteine durch monodisperse Gelpartikel
- hohe theoretische Bodenzahl durch 10 µm Gelpartikel (20–40 000 Böden/m)
- große zugängliche Porenvolumina

(> 50 %) für hohe GPC-Separationsleistungen

- definierte Porengrößen zur Trennung unterschiedlich großer Proteine
- hohe pH-Wert Stabilität

Diese Ziele wurden mit der Neuentwicklung des GPC-Säulenmaterials für Proteintrennungen (PSS-NovemaTM) erreicht. Details werden den folgenden Abschnitten präsentiert.

■ Experimentelles

Verwendete Proteine: Cytidin E (0,243 kD), Vitamin B12 (1,355 kD), Insulin bovin pancreas (5,733 kD), Cytochrom C (12,4 kD), Ribonuclease bovin pancreas (13,7 kD), beta-Lysozym hen egg white (14,6 kD), Lactalbumin bovin milk (17,5 kD), Myoglobin horse heart (17,8 kD), Trypsin bovine pancreas (23 kD), Trypsin hog pancreas (24 kD), Chymotrypsin A (25 kD), Proteinase Bacillus licheniformis (27 kD), Albumin hen egg white (45 kD – allerdings schwer im Eluenten löslich), Albumin bovin (67-kD-Monomer, 134-kD-Dimer), alpha-Lactalbumin bovin milk (142 kD), gamma-Globulin bovin heart (150 kD), Catalase Bovin (240 kD), Ferritin

horse (450 kD), Thyroglobulin bovin gland (660 kD), Fluka oder Serva.

Immunoglobulin: Host: Rabbit Anti-, Antigen: Human IgG (Fc), Label: Horseradish Peroxidase (Pierce company).

GPC-System: Die Software PSS WinGPC 6.20 steuert das isokratische HP1100-HPLC-System mit UV-Detektor (230 nm), extern: Shodex RI 71 Detektor, Injektionsvolumen: 20 µl.

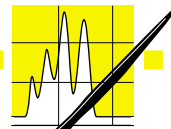
Probenkonzentration: 5 mg Protein/ml Eluent, Flussrate (sofern nicht anders beschrieben): 0,5 ml/min, Temperatur: 20 °C. PSS-Novema-Säulen 1 000 oder 3 000 Å Porosität, 10 µm Partikelgröße (8 x 300 mm).

Eluent: 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v.

■ Ergebnisse

Porenvolumina und Porengrößen von wässrigen GPC-Materialien werden durch GPC-Kalibrationskurven von Pullulanen – unverzweigten Zuckern – dargestellt. Für die neu entwickelten PSS-Novema-GPC-Materialien sind diese Kalibrationskurven in Abb. 2 zu sehen.

Deutlich erkennt man die gute Separationsleistung von PSS-Novema 30 Å



im Bereich vom Oligomer bis zu Molmassen von 30 000 D (bezogen auf Pullulane). PSS-Novema 300 Å erlaubt die Trennung von Oligomeren bis hin zu Molmassen von 1 600 000 D. Dieses Material weist für den untersuchten Bereich einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Molmasse und dem Elutionsvolumen auf. Das größerporige Gelmaterial mit 1000-Å-Porosität trennt den Bereich vom Monomer bis 1 600 000 D und das Gel mit 3.000Å-Porosität trennt den Bereich bis über 1 600 000 D. PSS-Novema 10 000 Å trennt sogar noch größere Moleküle. Die größerporigen Säulen PSS Novema 1 000, 3 000 und 10 000 Å verfügen allerdings über eine geringe chromatographische Auflösung für kleine Moleküle.

■ GPC-Trennungen in wässrig-organischen Lösungsmittelgemischen

Das neue PSS-Novema wurde in einer Eluentmischung untersucht, die sich für zahlreiche GPC-Protein-Trennungen auf Novema-Säulenmaterialien bewährt hat: 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v.

Untersucht wurden PSS-Novema-Säulen mit der Porosität 1000 Å sowie die PSS-Novema-Säulenkombination 1000 Å + 3000 Å zur Abdeckung eines größeren Molmassenbereiches. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 3 und in Abb. 4 dargestellt.

Die neu entwickelten GPC-Säulen PSS Novema zeigten für alle untersuchten Proteine (mit Ausnahme von Albumin hen egg white) gute GPC-Analysergebnisse im Eluenten 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v.

Deutlich zeigt sich, dass sich die GPC-Säule PSS Novema 1000Å hervorragend für die GPC-Trennungen der untersuchten Proteine eignet. Zur Erhöhung der Auflösung insbesondere für größere Proteine eignet sich die Kombination der PSS Novema 1000 Å mit der größerporigen PSS-Novema-3000-Å-Säule. Sollen auch kleinere Proteine eine bessere größenchromatographische Auflösung erfahren, empfiehlt sich dann die Kombination dieser Säulenkombination mit PSS Novema 30 Å.

Die vollständige Verdampfbarkeit dieses Eluenten erlaubt zudem die Kopplung der Methode mit der Massenspektrometrie. Für die Untersu-

chung von Proteinen in rein wässrigen gepufferten Eluenten (ohne organische Modifier) sei auf eine frühere Arbeit von uns verwiesen [5].

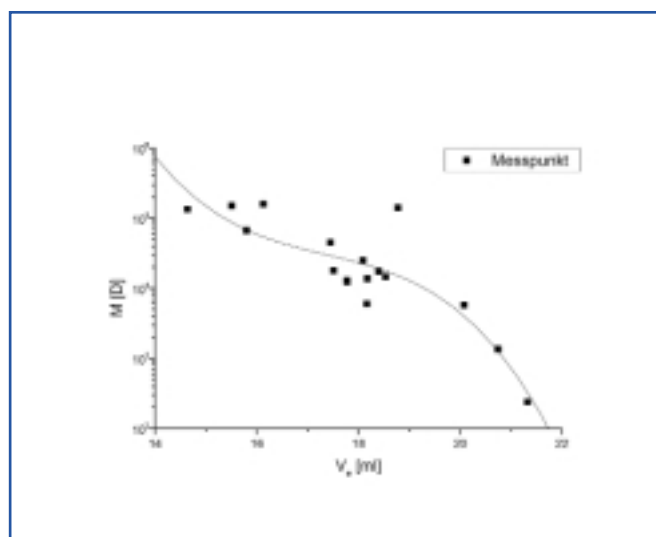
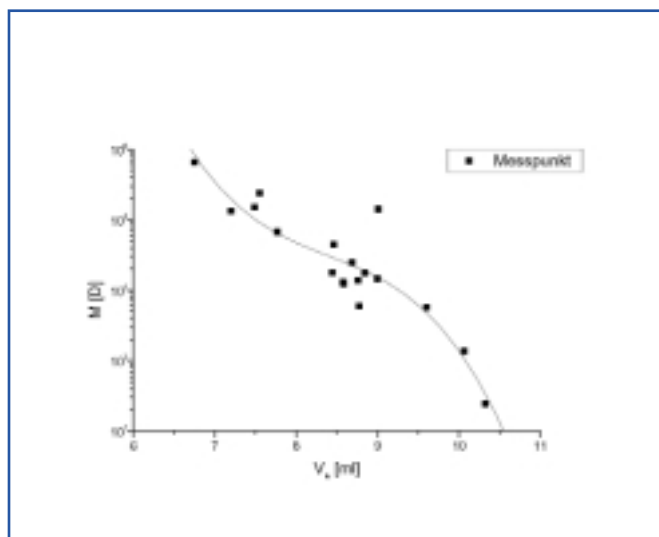
Es wurde eine relativ geringe Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Der Grund hierfür liegt in der deutlichen Zunahme der größenchromatographischen Auflösung (Peakschärfe bzw. Peakseparation) bei Verringerung der Flussgeschwindigkeit (z. B. von 1,0 ml/min auf 0,5 ml/min). Diesen Zusammenhang (van-Deemter Beziehung) haben wir in einer früheren Publikation [6] ausführlich erörtert.

■ Diskussion der Proteinuntersuchungen

Die neu entwickelte GPC-Trennmethode für Proteine erwies sich als robust und für zahlreiche untersuchte Proteine anwendbar. Man benötigt für

Abb. 3, links: Zusammenhang zwischen Proteinmolmasse und Elutionsvolumen
Proteine: Cytidin E (0,243 kD) bis Thyroglobulin bovin gland (660 kD) – Auflistung: siehe experimenteller Teil. Messungen auf PSS-Novema-1000-Å-Säule (8 x 300mm), Probenkonzentration: 5 mg/ml Eluent, Eluent: 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v, Injektionsvolumen: 20 µl, Fluss 0,5 ml/min; Detektion: UV 230 nm

Abb. 4, rechts: Zusammenhang zwischen Proteinmolmasse und Elutionsvolumen
Proteine: Cytidin E (0,243 kD) bis Thyroglobulin bovin gland (660 kD) – Auflistung: siehe experimenteller Teil. Messungen auf PSS-Novema-1000-Å- und -3000-Å-Säulenkombination (je 8 x 300mm). Eluent: 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v, Injektionsvolumen: 20 µl, Fluss 0,5 ml/min, Detektion: UV 230 nm



gute GPC-Trennungen im verwendeten Eluenten relativ großporige GPC-Säulenmaterialien (PSS Novema 1000 Å und 3000 Å). In einer früheren Arbeit, in der als Eluent ein Phosphatpuffer mit pH 6,8 mit Zusatz von 0,1 M NaCl verwendet wurde, genühten sehr kleinporige GPC-Materialien für gute GPC-Analysen.

Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten liegt in der komplexen Betainstruktur der Proteine. pH-Werte von 6,8 in rein wässrigen Eluenten führen zu einer kompakten Knäulung der Proteinhauptkette (hydrophobe Wechselwirkungen) und Proteine erscheinen als kleine Moleküle.

Überführt man die Proteine in Wasser mit deutlich saurem pH-Wert, so entstehen Polykationenseitengruppen, die sich abstoßen. Das Protein wird gestreckt. Zugabe einer hohen Menge von Acetonitril bewirkt zudem, dass die hydrophoben Wechselwirkungen, die zum kompakten Knäulen der Hauptkette führen, aufgehoben werden. Dies führt nochmals zu einer Streckung und somit Vergrößerung des Moleküls. Somit erscheinen die Proteine unter den hier verwendeten Bedingungen als sehr große Moleküle, die an großporigen GPC-Materialien mit hoher Auflösung getrennt werden.

■ Immunoglobuline

Immunoglobuline IgG's sind von zentraler Bedeutung für das Immunsys-

tem und somit auch von erheblichem therapeutischem Interesse. Immunglobuline weisen Strukturelemente auf, welche spezifisch über Nebenvalezenzen mit den Antigenen reagieren. Die Bildung von Immunglobulinen erfolgt durch Reaktion von z. B. Fremdproteinen auf den Organismus eines Menschen oder eines Wirbeltieres. Es bilden sich Antikörper gegen diese Fremdstoffe (Antigene). Antigen und Antikörper reagieren miteinander zu einem Komplex. Die Antikörper sind die Proteine des Blutplasmas und gehören zu den gamma-Globulinfraktionen. Sie werden auch Immunglobuline genannt.

Untersuchungen an Immunglobulinen erfolgen durch Funktions- bzw. Eigenschaftsprüfungen, aber auch mittels Chromatographie. Insbesondere die Größenausschlusschromatographie ist geeignet, strukturelle Informationen über das Gesamtmolekül zu erhalten. Eine entsprechendes Elugramm des kommerziell erhältlichen Antikörperkomplexes Rabbit Anti Human IgG an PSS Novema 1000 Å + 3000 Å wird in Abb. 5 vorgestellt. Deutlich erkennbar sind der UV (230 nm)- und RI-aktive Peak bei geringem Elutionsvolumen, die der UV-aktiven Globulinfraktion (ein großes Protein) zugeschrieben werden kann. Peaks bei größeren Elutionsvolumina sind nicht UV-, dafür aber RI-aktiv. Peaks bei größeren Elutionsvolumina (kleinere Moleküle)

sind nicht UV-, dafür aber RI-aktiv. Da bekannt ist, dass Immunglobulinkomplexe aus Proteinen und Oligosacchariden bestehen, kann man beide Bestandteile mit dieser GPC-Methode gut untersuchen und zuordnen.

■ Zusammenfassung und Ausblick

PSS-Novema-GPC-Säulen sind geeignet für GPC-Untersuchungen an Proteinen und Immunglobulinkomplexen. Im Eluenten bestehend aus 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v ließen sich nahezu alle untersuchten Proteine nach ihrer molekularen Größe trennen. Der Vergleich der Protein- bzw. Immunglobulinkomplex-Peakposition mit der Peakposition untersuchter GPC-Referenzmaterialien (z. B. Pullulane) erlaubt eine Abschätzung der molekularen Größe. Die vollständige Verdampfbarkeit dieses Eluenten erlaubt zusätzlich die Kopplung der GPC-Größenbestimmungsmethode online mit Massenspektrometern. Das Potenzial dieser Methode besteht damit in der vollständigen Analyse von Proteinen unbekannter Herkunft bezüglich der molekularen Größe (GPC) und der exakten Molmasse. Untersuchungen zur GPC-Massenkopplung sind weitere Erfolg versprechende Schritte im Sektor der Protein und Proteomforschung.

Literatur

- [1] K. K. Unger, Handbuch der HPLC, GIT-Verlag Darmstadt (1989)
- [2] C. S. Wu, Column Handbook for Size Exclusion Chromatography, Academic Press, San Diego (1999)
- [3] B. J. Hunt, S. R. Holding, Size Exclusion Chromatography, Blackie Publisher, Glasgow (1989)
- [4] P. Dubin, S. L. Edwards, M. S. Metha, D. Domalia, Quantification of non-ideal behavior in protein size-exclusion chromatography, *J. Chromatography*, 635 (1993) 51–60
- [5] C. Dauwe, G. Reinhold, Chromatographische Untersuchungen von Proteinen und Immunglobulinen – Trennung nach molekularer Größe, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, 52. Jahrgang, 176–180 (2001)
- [6] C. Dauwe, T. Hofe, G. Reinhold, PSS-MCX: GPC-Systeme für Analysen von Oligo- und Polysacchariden, *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, 51. Jahrgang, 174–179 (2000)

Kontakt:

Dr. Christian Dauwe
Polymer Standards Service GmbH
Postfach 3368
55023 Mainz.
E-Mail: cdauwe@polymer.de

Abb. 5: GPC-Analyse des Antikörperkomplexes Rabbit Anti Human IgG
Messungen durchgeführt auf PSS Novema 1000 Å + 3000 Å Säulenkombination, (je 8 x 300 mm),
Probenkonzentration: 5 mg/ml Eluent, Eluent: 0,1 % TFA in Wasser/Acetonitril//55/45//v/v, Injektionsvolumen: 20 µl, Fluss: 0,5 ml/min, Detektion: UV 230 nm + RI

